



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**LA SUBUNIDAD B NO TÓXICA DE LA TOXINA DEL CÓLERA ES UN ADYUVANTE  
Th1/Th17 QUE INDUCE MIGRACIÓN A PIEL EN UN MODELO DE INFECCIÓN EN PIEL**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**LAURA ANTONIO HERRERA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. LAURA C. BONIFAZ ALFONZO**

**CMN S XXI**

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. GLORIA SOLDEVILA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DRA. INGEBORG BECKER FAUSER**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2018**



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.

## **RECONOCIMIENTOS:**

A continuación, quisiera extender mis más profundos agradecimientos a las siguientes personas que colaboraron en la realización de este trabajo:

Dr. Oscar Badillo-Godinez: Por la realización de los experimentos de infección con rotavirus.

M. en C. Alberto García-Lozano: Por la realización de los experimentos de DTH e infección con *S. schenkii*.

Dr. Oscar Medina-Contreras: Por su ayuda en los experimentos de análisis de células infiltrantes del intestino.

M. en C. Araceli Tepale-Segura: Por su ayuda en los experimentos de análisis de DCs por microscopia confocal y apoyo en general.

Dra. Gloria Soldevila: Por proporcionarnos los ratones OT-II CD45.1+.

Dra. Juliana Idoyaga: Por proporcionarnos los anticuerpos anti-DEC205-OVA y su ayuda en general en la realización de este proyecto.

Dra. Laura Bonifaz: Por la dirección y revisión crítica del proyecto.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>MARCO TEÓRICO</b>	
1. <i>La subunidad B no tóxica de la toxina del cólera como potencial adyuvante para el desarrollo de vacunas</i> .....	8
1. 1 <i>Activación del sistema inmune innato inducido por la CTB</i> .....	9
1. 2 <i>Inducción de protección y activación de células del sistema inmune adaptativo utilizando a la CTB como adyuvante</i> .....	10
2. <i>El direccionamiento de antígenos a DCs es un sistema altamente eficiente para el desarrollo de respuestas de linfocitos T y de inmunidad protectora</i> .....	11
3. <i>Diferenciación de linfocitos T cooperadores Th1 y Th17</i> .....	13
3.1 <i>Diferenciación de linfocitos Th17</i> .....	14
3.2 <i>Diferenciación de linfocitos Th1</i> .....	15
4. <i>Los linfocitos T CD4+ de memoria constituyen una población heterogénea que provee de inmunidad protectora</i> .....	17
5. <i>Participación de los linfocitos TCD4+ en las respuestas inmunes contra melanoma</i> .....	19
6. <i>Participación de los linfocitos TCD4+ en las respuestas inmunes contra rotavirus</i> .....	21
7. <i>Participación de los linfocitos TCD4+ respuestas inmunes contra Sporothrix schenkii</i> .....	23
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	26
<b>HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
<b>RESULTADOS</b>	
1. <i>La administración intradérmica de CTB induce activación y acumulación tardía y prolongada de DCs en tejidos linfoides y no linfoides</i> .....	33
2. <i>La co-administración de CTB con antígenos direccionados a DCs o solubles promueve la expansión y activación diferencial de linfocitos T CD4+ antígeno específicos</i> .....	37
3. <i>CTB promueve una respuesta Th1/Th17 cuando es co-administrado con antígeno direccionado a DCs</i> .....	42
4. <i>El direccionamiento de antígeno a DCs en conjunto con CTB promueve la diferenciación de linfocitos T RM CD4+ en la piel</i> .....	45

5. <i>La inmunización intradérmica de antígeno direccionado a DCs en conjunto con CTB promueve inmunidad local y sistémica de larga duración</i> .....	47
6. <i>La inmunización por direccionamiento de Ags a DCs induce infiltración de linfocitos T CD4+ polifuncionales en intestino y provee protección dependiente de linfocitos T CD4+ contra rotavirus</i> .....	49
7. <i>La coadministración de CTB con un patógeno inactivado promueve protección local y sistémica contra la infección en piel</i> .....	54
<b>DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>CONCLUSIONES</b> .....	64
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	65
<b>FIGURAS</b>	
<b>Figura 1.</b> Activación de DCs de la piel por administración i.d. de CTB. ....	34
<b>Figura 2.</b> La inoculación i.d. de CTB induce activación tardía y prolongada de DCs de la piel.....	35
<b>Figura 3.</b> La inoculación i.d. de CTB induce activación tardía y prolongada de DCs migrantes de la piel y residentes de ganglio.....	36
<b>Figura 4.</b> Activación de linfocitos T CD4+ inducida por un Ag direccionado a DCs o soluble.....	39
<b>Figura 5.</b> La co-administración de CTB con un Ag direccionado a DCs o soluble induce la expansión de linfocitos TCD4+ y su migración a piel. ....	41
<b>Figura 6.</b> Activación diferencial en ganglio de linfocitos Th1/Th17 después de la coadministración de CTB con un Ag direccionado a DCs o soluble. ....	43
<b>Figura 7.</b> La co-administración de CTB con un Ag direccionado a DCs induce migración a piel de linfocitos Th1 y Th17. ....	44
<b>Figura 8.</b> La co-administración de CTB con un Ag direccionado a DCs induce linfocitos T EM, T CM y T RM. ....	46
<b>Figura 9.</b> La inmunización i.d. con CTB en conjunto con un Ag direccionado a DCs induce inmunidad duradera local y sistémica contra melanoma. ....	48
<b>Figura 10.</b> Una dosis de CTB en conjunto con Ags direccionados a DCs induce la infiltración en intestino de linfocitos T CD4+ Ag específicos y protección parcial contra rotavirus.....	51
<b>Figura 11.</b> La inmunización i.d./refuerzo i.p. con Ags direccionados a DCs+CTB induce linfocitos T CD4+ funcionales en intestino y protección dependiente de linfocitos T CD4+ contra rotavirus.....	53
<b>Figura 12.</b> La coadministración de CTB con un patógeno inactivado promueve protección local y sistémica contra la infección en piel. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

### (Por sus siglas en inglés)

CTB: subunidad no tóxica de la toxina del cólera

DC: célula dendrítica

Ag: antígeno

i.d.: intradérmica

i.p.: intraperitoneal

i.n.: intranasal

SDLN: ganglios linfáticos de drenaje de la piel

T RM: linfocitos T de memoria residentes de tejido

GM-1: receptor de gangliosidos 1

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones

TLRs: receptores tipo toll

UFC: unidad formadora de colonias

OVA: ovoalbúmina

CLRs: receptores de lectinas tipo C

LC: célula de Langerhans

s.c: subcutánea

i.v: intravenosa

TRP: proteína 2 relacionada con la tirosinasa

MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad II

TCR: receptor de linfocitos T

NLR: receptores tipo NOD

T CM: linfocito T de memoria central

T EM: linfocito T de memoria efectora

MBP: proteína de unión a maltosa

IC: conidios inactivados

CT: toxina completa del cólera

DTH: respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada

CFSE: carboxi fluoresceína

## RESUMEN

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> participan de manera determinante en el desarrollo de respuestas protectoras contra enfermedades como SIDA, leishmaniasis, tuberculosis, influenza y contra algunos tipos de cáncer. Por lo que su activación y diferenciación es un objetivo importante en el desarrollo de nuevas vacunas. El direccionamiento de antígenos (Ags) a células dendríticas (DCs), en conjunto con adyuvantes fuertes, es una de las estrategias más prometedoras para la generación de respuestas protectoras mediadas por linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

La administración en piel de anticuerpos anti-DEC205 conjugados a Ags induce la activación eficiente de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En combinación con adyuvantes fuertes como poly I:C, CpG, LPS o flagelina, promueve la diferenciación de linfocitos T funcionales, los cuales pueden mediar respuestas protectoras de larga vida contra infecciones y tumores. Sin embargo, estos adyuvantes poseen un alto grado de toxicidad, mientras que derivados sintéticos de menor toxicidad resultan menos eficientes. Por lo tanto, la vacunación vía direccionamiento de Ags a DCs requiere todavía de la identificación de adyuvantes fuertes con potencial uso en humanos.

La subunidad B no tóxica de la toxina del cólera (CTB) es un adyuvante que puede ser utilizado de manera segura en humanos y cuyo uso experimental, en conjunto con antígenos derivados de patógenos, puede inducir inmunidad protectora de larga duración. Sin embargo, si CTB es capaz de inducir la activación de DCs, así como la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> funcionales, es aún un tema controversial.

El objetivo de este estudio fue determinar si CTB puede actuar como un adyuvante para Ags direccionados a DCs o “solubles” (no direccionados a DCs por anticuerpos) cuando son administrados por la vía intradérmica (i.d.). En primer lugar, observamos que CTB puede inducir la activación de DCs de la piel y de los ganglios linfáticos de drenaje de la piel (SDLN). Asimismo, su coadministración con un Ag conjugado al anticuerpo anti-DEC205, e inclusive con el Ag soluble, indujo la expansión de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y su migración al sitio de inoculación. Sin embargo, la respuesta de linfocitos T fue notoriamente diferente en función del Ag. Utilizado en combinación con un Ag soluble, CTB promovió una respuesta local de larga vida predominantemente tipo Th1, así como de linfocitos T de memoria efectora (EM) y de memoria central (CM). Mientras que la coadministración de CTB con un Ag direccionado a DCs, promovió una respuesta local y sistémica caracterizada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1/Th17, polifuncionales, así como de linfocitos T EM, T CM y residentes de tejido de memoria (T RM). Por otro lado, la inmunización con el Ag soluble promovió inmunidad local en la piel, mientras que el direccionamiento

de Ags a DCs en conjunto con CTB promovió protección local y sistémica contra el desarrollo de melanoma y contra la infección por rotavirus murino. De manera interesante, CTB actuó también como un adyuvante para Ags derivados de un patógeno poco inmunogénico que penetra por la piel, el cual es capturado preferentemente por DCs de la epidermis, induciendo una respuesta de linfocitos Th1/Th17 de larga vida y protectora contra la infección en piel y la diseminación sistémica de la enfermedad.

Nuestros hallazgos indican que CTB puede ser utilizada como un adyuvante para Ags direccionados a DCs y solubles. Es de notar que, su administración con Ags direccionados a DCs induce respuestas inmunes locales y sistémicas más potentes, las cuales se caracterizan por linfocitos Th1/Th17 y por linfocitos T RM CD4+ y la inducción de inmunidad protectora contra la infección por rotavirus y melanoma.

## **ABSTRACT**

CD4+ T lymphocytes are crucial in the development of protective immunity against diseases like AIDS, leishmaniasis, tuberculosis, influenza and against some tumors. Therefore, their activation and differentiation into effector cells is of mayor importance for vaccine design. To achieve this goal, delivering antigens via monoclonal antibodies targeting dendritic cells (DCs), in combination with strong adjuvants, is one of the most promising strategies.

When administered through the skin, anti-DEC205-antigen monoclonal antibodies can efficiently induce CD4+ T cell activation. In combination with strong adjuvants, e.g., poly I:C, CpG and flagellin, it induces T effector cell differentiation and it mediates long-lasting immunity against infections and tumors. However, these adjuvants are very toxic, while synthetic derivatives are less effective. Therefore, DC-targeted vaccination awaits the identification of strong non-toxic adjuvants with potential use in humans.

The non-toxic cholera B subunit (CTB) is an adjuvant that can be safely used in humans. Also, its co-administration with pathogen-derived antigens can induce long-term protective immunity against experimental infection. However, it is still controversial whether CTB can induce dendritic cell (DC) activation and effector CD4+ T cell differentiation as well.

The main goal of this study was to determine whether CTB can act as an adjuvant for DC-targeted antigens or soluble antigens (non-targeted by the use of antibodies) when they are administered by the intradermal (i.d) route. First, we observed that CTB can induce activation of skin and lymph-node resident DCs. As a consequence, its co-administration with an Ag conjugated to an anti-DEC205 antibody, as well as with

the soluble antigen, induced expansion of CD4<sup>+</sup> T cells and their migration to the inoculation site. Nevertheless, the T cell responses were significantly different depending on the Ag. In combination with the soluble Ag, CTB promoted a skewed and localized Th1 response, as well as T<sub>EM</sub> and T<sub>CM</sub> cells. While its combination with the DC-targeted Ag promoted a local and systemic response composed of Th1/Th17, poli-functional CD4<sup>+</sup> T cells and also T<sub>EM</sub>, T<sub>CM</sub> and CD4<sup>+</sup> tissue resident memory T cells (T<sub>RM</sub>). Consequently, Ag- soluble immunization provided local protection in the skin, while DC-targeted immunization promoted local and systemic protective immunity against melanoma and rotavirus infection. Furthermore, CTB also acted as an adjuvant for a poorly immunogenic pathogen that infects the skin, which is captured by skin DCs, inducing a long-lived protective Th1/Th17 response against skin and systemic infection.

Our findings indicate that CTB can be used as an adjuvant for DC-targeted and soluble antigens. However, its co-administration with DC-targeted antigens induces more potent local and, importantly, systemic immune responses characterized by CD4<sup>+</sup> Th1/Th17 and T<sub>RM</sub> cells, which can mediate protection against rotavirus infection and melanoma.

## **MARCO TEÓRICO**

### *1. La subunidad B no tóxica de la toxina del cólera como potencial adyuvante para el desarrollo de vacunas*

El desarrollo de nuevas vacunas requiere frecuentemente de la inclusión de adyuvantes cuya administración en humanos debe ser segura. El uso de CTB en la vacuna contra el cólera, Dukoral, la cual está autorizada en más de 60 países, ha probado ser de uso seguro inclusive en sujetos inmunocomprometidos. En estudios clínicos realizados en 240 000 sujetos, la administración oral de la vacuna indujo únicamente efectos adversos moderados, incluyendo dolor abdominal y diarrea, los cuales fueron principalmente atribuidos al amortiguador de bicarbonatos en el que se administra la vacuna (1). Inclusive, ésta vacuna es segura cuando se administra por la vía intrarectal (2). Además, en sujetos mayores de cinco años de edad la vacuna provee de protección contra el cólera por al menos dos años (1). Por lo tanto, la CTB se perfila como un candidato importante para la generación de vacunas que puedan inducir respuestas inmunológicas de larga duración en humanos. Sin embargo, para poder utilizar a la CTB como adyuvante, es necesario caracterizar a la respuesta inmune inducida y a las células de la respuesta inmune innata y adaptativa, de manera que pueda utilizarse posteriormente en el desarrollo racional de vacunas más efectivas.

### 1.1 Activación del sistema inmune innato inducido por la CTB

La toxina del cólera (CT) está compuesta por dos subunidades; la subunidad A, responsable de la toxicidad de la toxina completa, y la subunidad B (CTB) que carece de propiedades tóxicas (3). La CTB posee alta afinidad al receptor de gangliosidos (GM)-1, a través del cual la toxina completa o la CTB son internalizadas a la célula. A la fecha no existe evidencia que indique que la unión de CTB a GM-1 promueva directamente la activación de células del sistema inmune, por el contrario, existen estudios que lo relacionan con la inhibición de la activación de linfocitos T (3).

Poco se sabe sobre la capacidad de CTB para activar a receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs). Sin embargo, la evidencia experimental sugiere que CTB podría activar a receptores tipo toll (TLRs). En cultivos de DCs derivadas de médula ósea, CTB induce un incremento en la expresión de genes que codifican para TLRs, de moléculas adaptadoras y efectoras que participan en la señalización de los TLRs y de moléculas de la vía de activación de NFκB (4). Como resultado de la estimulación con CTB, las DCs pueden expresar una serie de citocinas y quimiocinas incluyendo: IL-5, IL-12p70, IL-6, IL-10, IL-3, G-CSF, MIP-2 y eotaxina. De manera similar, la estimulación de líneas celulares de macrófagos con CTB induce la activación de NFκB, así como la expresión de citocinas y quimiocinas (5) a través de mecanismos dependientes de la expresión de TLR4, e interesantemente, de otros receptores de membrana como FcRγ, CARD9 y TREM2 (6).

*In vivo*, la capacidad de CTB para activar DCs es un tema controversial. Por una parte, su administración en piel puede inducir la activación de DCs de la epidermis, como lo indica el incremento en la expresión de CD86, así como su acumulación en el sitio de inoculación (7). De manera similar, su inyección directamente en intestinos ligados, o por alimentación intragástrica, induce la acumulación de DCs en el epitelio asociado a folículos de las placas de Peyer (8). En contraste, existen reportes que indican que la administración de CTB por las vías subcutánea o transcutánea no induce acumulación de DCs en los SDLN ni incremento en la expresión de CD86 (7,9). Dado el papel central que juegan las DCs en el desarrollo de respuestas de linfocitos T, es de especial relevancia determinar si CTB puede inducir la activación y acumulación de DCs, tanto en el sitio de inoculación como en órganos linfoides, a través de otras estrategias de inmunización para promover así respuestas inmunes protectoras.

## 1.2 Inducción de protección y activación de células del sistema inmune adaptativo utilizando a la CTB como adyuvante

Si bien el papel de CTB en la activación del sistema inmune innato requiere de mayor investigación, varios artículos han documentado que puede utilizarse como un adyuvante para la inducción de respuestas protectoras y de linfocitos T CD4+. Una de las formas de explotar el potencial adyuvante de CTB consiste en su fusión o conjugación con Ags. Un ejemplo de lo anterior consiste en la proteína de fusión de CTB con Ags derivados del virus de la influenza. En un estudio ésta proteína fue administrada a ratones por la vía intranasal (i.n) bajo un esquema de inmunización/refuerzo doble. Cuarenta y dos días después del último refuerzo, los ratones fueron retados con la cepa letal PR8 a LD50. El 100% de los ratones inmunizados sobrevivió al reto, a diferencia de los ratones vírgenes (10). El desarrollo de protección inmunológica fue relacionado con altos niveles de anticuerpos específicos en fluido bronqueoalveolar y con linfocitos T CD4+ productores de IFN $\gamma$  en bazo y pulmón (10). Resultados similares han sido observados después de la inmunización de una proteína de fusión de CTB con la proteína fimbria 2 de *Bordetella pertussis*, la cual indujo inmunidad de larga duración y la producción de IFN $\gamma$  en pulmón en un estudio en ratones (11).

La CTB también ha sido utilizada exitosamente de manera soluble (no conjugada) en combinación con antígenos provenientes de bacterias. Tal es el caso de una vacuna experimental contra la proteína A de superficie del pneumococo, un Ag fuertemente inmunogénico, en combinación con CTB en un esquema de inmunización/ refuerzo doble. En este estudio, la inmunización confirió protección del 100% cuando los ratones fueron retados con un inóculo letal de *Streptococcus pneumoniae*, 42 días después del último refuerzo. La respuesta inmune correlacionó con una baja cantidad de UFCs en pulmones, así como también con la presencia de anticuerpos específicos y de IFN $\gamma$  e IL-12 en sobrenadantes provenientes de tejido homogenizado de pulmones (12). De manera similar, la administración soluble de CTB con un patógeno inactivado, como *Francisella tularensis*, puede inducir protección de larga duración contra la infección de una manera dependiente de células productoras de IFN $\gamma$  (13).

Estos reportes indican que la CTB conjugada o soluble, en combinación con antígenos altamente inmunogénicos, actúa como un adyuvante capaz de inducir respuestas protectoras de larga duración. No obstante, su capacidad como adyuvante para Ags inocuos es controversial. Por ejemplo, la administración vía oral de una proteína de fusión compuesta de CTB y de tres epítomos del antígeno Lpp20 de *Helicobacter pylori*, una vez por semana durante cuatro semanas, resultó en el mismo nivel de infección

en comparación con los ratones que recibieron únicamente al antígeno (14). Es más, en este modelo la inducción de linfocitos T efectores requirió de la coadministración del adyuvante completo de Freund. Es de notar que la co-administración vía mucosas de CTB con Ags inocuos, como el antígeno modelo ovoalbúmina (OVA) o la pro-insulina, induce tolerancia (15,16). Sin embargo, la coadministración de CTB a través de un sitio altamente inmunogénico como la piel, y/o en conjunto con antígenos inocuos conjugados a anticuerpos con especificidad por DCs, no ha sido explorado.

## *2 El direccionamiento de antígenos a DCs es un sistema altamente eficiente para el desarrollo de respuestas de linfocitos T y de inmunidad protectora*

La activación de linfocitos T CD4+ cooperadores requiere de una serie de interacciones con las DCs. En primer lugar, se requiere de la presentación de Ag a través de los complejos Ag-moléculas del MHC-II, así como de señales de co-estimulación expresadas por las DCs migrantes y residentes de tejido. Mientras que interacciones posteriores con DCs migrantes parecen otorgar las señales necesarias para la polarización de los linfocitos T CD4+ (17,18). Además, estudios recientes indican que los linfocitos T con fenotipo efector requieren de una segunda presentación de Ag para poder diferenciarse en células de memoria (19–22). Por lo tanto, las DCs representan blancos ideales para la generación de respuestas protectoras de larga vida de linfocitos T. En este contexto, el direccionamiento de Ags a DCs constituye una estrategia prometedora para el desarrollo racional de nuevas vacunas.

El direccionamiento de antígenos a DCs consiste en la administración de conjugados de antígenos a anticuerpos con especificidad por receptores expresados por DCs (23). La alta especificidad de estos anticuerpos promueve eficientemente la captación y presentación de antígenos por DCs; dando por resultado la activación de linfocitos T utilizando pequeñas cantidades de conjugado (24). Inclusive, el direccionamiento a DCs a través de la administración de anticuerpos monoclonales ha entrado en la fase clínica (25).

Los receptores blanco para el direccionamiento de antígenos a DCs consisten predominantemente de los receptores de lectinas tipo C (CLRs). Entre los más frecuentemente usados se encuentran DEC205, Langerina, DC-SIGN y DCIR. Debido a la alta expresión de DEC205 en varias sub-poblaciones de DCs, incluyendo a las CD11c+CD8+ de bazo y ganglios linfoides, dermales/intersticiales y células de Langerhans, DEC205 es el blanco de preferencia para el direccionamiento de Ags a DCs (23). Además, DEC205 es también expresado en DCs de humano, con un nivel del 77% de homología en la secuencia

de aminoácidos respecto al receptor murino (26). Por lo que es razonable pensar que esta estrategia de inmunización sea trasladable para el desarrollo de vacunas con uso en humanos.

La mayoría de las vacunas son administradas de manera que se depositen en la grasa subcutánea o en el musculo debajo de la piel. Sin embargo, estos sitios contienen un bajo número de DCs (27). En contraste, las capas dérmicas y epidérmicas contienen una gran cantidad de DCs, por lo que la piel constituye uno de los tejidos más atractivos para la administración de vacunas. Las DCs de la piel en condiciones fisiológicas están conformadas por células de Langerhans (LC) en los estratos epidérmicos y por DCs dermales (27). Cuando los anticuerpos monoclonales anti-DEC205 son administrados por la vía i.d. son capturados preferentemente por las LCs (Langerina+CD103+/-), mientras que en los SDLN lo son las DCs CCR7+CD11b+CD8 $\alpha$ -Langerina+/- (migrantes de la piel) y las CCR7-CD11b-CD8 $\alpha$ + (residentes de ganglio). De manera importante, se ha observado que los anticuerpos persisten hasta por 5 días después de su administración (28,29), siendo las DCs migratorias de la piel las principales en capturar al anticuerpo (30,31). A pesar de estos resultados, en la gran mayoría de los estudios de direccionamiento de Ags a DCs se ha optado por las rutas subcutánea (s.c.) e intravenosa (i.v.) con resultados alentadores.

La administración s.c. de anti-DEC205 conjugado al Ag prototipo OVA induce la activación de linfocitos T CD4+ con una eficiencia 300 veces superior al Ag no conjugado. Sin embargo, la ligación de anti-DEC205 no induce la maduración de DCs, por lo que es necesaria la coadministración de adyuvantes como anti-CD40, poly I:C, CpG o flagelina. De esta manera se induce la diferenciación de linfocitos T efectores y de memoria, los cuales pueden encontrarse en los ganglios que drenan el sitio de inoculación (24). Además, los anticuerpos anti-DEC205 administrados localmente se diseminan de manera sistémica, por lo que se ha sugerido que el direccionamiento de Ags puede inducir una respuesta sistémica de linfocitos T (24,28,32), lo que representaría una importante ventaja en comparación con los antígenos no direccionados.

De manera importante, la inmunización vía direccionamiento de Ags a DCs puede inducir respuestas de larga duración contra el melanoma. En el modelo de melanoma-OVA, la administración s.c de anti-DEC205-OVA en presencia de poly I:C + anti-CD40 induce respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+, los cuales participan en la inhibición del crecimiento tumoral (28). De manera similar, el direccionamiento de Ags tumorales, como la proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP), a DCs DEC205+, en conjunto con CpG, induce una respuesta protectora contra el melanoma, la cual es dependiente principalmente de linfocitos T CD4+ (32). Cabe destacar además que en estos modelos, el direccionamiento de Ags puede

revertir el crecimiento de tumores establecidos (32,33). De manera que estos hallazgos han alentado la realización de estudios clínicos para la evaluar la eficacia de Ags tumorales direccionados a DCs DEC205+ como terapia (25).

Por otra parte, la inmunización vía direccionamiento de Ags a DCs también puede inducir respuestas protectoras contra patógenos. La administración i.v. de una sola dosis de anti-DEC205 acoplada a la proteína del circumsporozoíto de *Plasmodium yoelii*, en combinación con anti-CD40+ poly I:C, induce la diferenciación en bazo de linfocitos T CD4+ productores de IFN $\gamma$  (34). De manera similar a la administración s.c. de anti-DEC205-VP6 (un antígeno del rotavirus murino) + poly I:C, que induce la diferenciación de linfocitos Th1 protectores (35). Inclusive, el direccionamiento de Ags a DCs DEC205+ puede inducir linfocitos T CD4+ polifuncionales de larga vida, productores de IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ /IL-2, contra diversos Ags como: gag p24 del VIH, Ags del merozoíto de *Plasmodium vivax* y la proteína LcrV de *Yersinia pestis*, cuando son co-administrados con poly I:C, flagelina u oligonucleótidos de CpG como adyuvantes (36–38). De tal manera que el direccionamiento de Ags a DCs DEC205+, en conjunto con fuertes adyuvantes, se perfila como una estrategia de inmunización óptima para la generación de linfocitos protectores de larga vida.

### 3 Diferenciación de linfocitos T cooperadores Th1 y Th17

Cabe destacar que la respuesta de linfocitos T inducida por direccionamiento de Ags o Ags solubles en conjunto con los adyuvantes mencionados está restringida a un perfil tipo Th1. Diversos estudios sugieren que la diferenciación de linfocitos tanto Th1 como Th17 podría ser más eficiente para el desarrollo de una respuesta inmune protectora. En un modelo de inmunización contra *M. tuberculosis*, la respuesta de memoria en pulmón se caracterizó por la infiltración de linfocitos Th17 y en ganglios de drenaje por linfocitos Th1. De manera interesante, los linfocitos Th17 mediaron el reclutamiento de los Th1 a pulmón para el control óptimo de la infección (39). De manera similar, en un modelo de infección por *C. albicans*, los linfocitos Th17 mediaron el control de la infección en piel y los linfocitos Th1 participaron en el control de la diseminación sistémica del patógeno (40). Mientras que en modelos experimentales de melanoma, los linfocitos Th17 promueven la infiltración de los tumores con linfocitos T CD8+ citotóxicos (41). Además, la presencia de linfocitos Th1 y Th17 ha sido correlacionada con mayor supervivencia en pacientes con melanoma y con otros tipos de tumores (42,43). En tanto que, en modelos de infecciones virales, como el de rotavirus murino, los linfocitos Th1 y Th17 parecen también cooperar en la generación

de respuestas protectoras (44,45). Por lo que la generación de nuevas vacunas podría beneficiarse de estrategias de inmunización con la capacidad de inducir respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1/Th17.

### 3.1 Diferenciación de linfocitos Th1

Los linfocitos Th1 se caracterizan por la producción de las citocinas IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$  y TNF $\beta$ . IFN $\gamma$  induce la activación de macrófagos para la eliminación de patógenos intracelulares a través de varios mecanismos. Uno de los cuales incluye la inducción de la sintetasa inducible de óxido nítrico, la cual promueve la generación de especies reactivas de nitrógeno que son tóxicas para los patógenos intracelulares. Este mecanismo puede ser también inducido en otras células como los hepatocitos. Otro mecanismo mediado por IFN $\gamma$  incluye la estimulación de autofagia, por la cual se forman vesículas autofagosomales las cuales se fusionan con lisosomas para la degradación del contenido celular (46,47).

La diferenciación de los linfocitos Th1 es regulada por IL-12 e IFN $\gamma$ . IL-12 activa al factor de transcripción STAT4, el cual induce la expresión de IFN $\gamma$ . Esta última activa a STAT1 para estimular la expresión del factor de transcripción Tbet, el cual induce mayor expresión de IFN $\gamma$  y la expresión del IL12R $\beta$ 2, a la vez que reprime la polarización hacia linfocitos Th2 o Th17. (47). Además, se propone que IL-12 es fundamental para la expansión de los linfocitos Th1, así como para el mantenimiento de su fenotipo.

IL-12 es producida principalmente por DCs activadas. La estimulación con agonistas de TLR4 (LPS), TLR9 (CpG), TLR3 o TLR7 (poly I:C) induce la producción de IL-12p70, vía la activación de las cinasas p38 y JNK en DCs, estimulando la diferenciación de linfocitos Th1 (48). Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que CTB provoca también la expresión de IL-12p70 en DCs derivadas de médula ósea, además de promover la diferenciación de linfocitos Th1 (10,12–14,49) y de inducir la activación de p38 en macrófagos de bazo (50). Por lo que CTB representa una opción viable para la generación de este tipo de respuestas.

Por otra parte, es necesario considerar también que existen poblaciones específicas de DCs encargadas de la producción de IL-12, por lo que su identificación y manipulación podrían ayudar a diseñar vacunas más eficientes en la generación de linfocitos protectores Th1. Estudios pioneros identificaron en bazo a las DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> como la principal fuente de IL-12p70, lo cual sucede rápidamente (2-4 h) tras la estimulación con CD40L o IFN $\gamma$  (51). Sin embargo, esta capacidad es regulada a la baja a medida que transcurre el proceso de maduración, de tal manera que las DCs maduras no producen IL-12p70 cuando son re-estimuladas (52). No obstante, estudios *in vitro* indican que un corto periodo de estimulación con IL-12

es suficiente para inducir la diferenciación de linfocitos Th1 (52). A tiempos posteriores, es posible que otras poblaciones celulares regulen la diferenciación/mantenimiento de los linfocitos Th1. De manera interesante, en un modelo de infección en piel por *Candida albicans* la diferenciación de linfocitos Th1 dependió de las DCs dermales Langerina<sup>+</sup> (CD8 $\alpha$ -) (53), las cuales expresaron altos niveles de IL-12. Además, en un modelo de administración s.c. de CpG y OVA, la presentación de Ag dependió principalmente de las DCs migrantes de la piel, mientras que las DCs inflamatorias aisladas de los ganglios de drenaje produjeron altos niveles de IL-12 *in vitro e in vivo* para mediar la diferenciación de linfocitos Th1 (54). En conjunto, estos datos sugieren que la activación y captura de antígenos por poblaciones de DCs de la piel y de ganglios linfáticos facilitarían la inducción de linfocitos Th1. A este respecto cabe recordar que los anticuerpos anti-DEC205-Ags son capturados por todas las subpoblaciones de DCs de la piel y por las DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> presentes en ganglios de drenaje (55), lo que en conjunto con adyuvantes promueve eficientemente la diferenciación de linfocitos Th1.

### 3.2 Diferenciación de linfocitos Th17

Los linfocitos Th17 se caracterizan por la producción de las citocinas IL-17A, IL-17F las cuales pueden inducir en una amplia variedad de células la producción de citocinas, como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF y G-CSF), quimiocinas (CXCL1, CXCL8 y CXCL10), de metaloproteínasas y péptidos antimicrobianos. IL-17A e IL-17F además median el reclutamiento y activación de neutrófilos (56). A través de estudios en modelos de melanoma (41) y de inmunización con adenovirus (57), se ha observado que los linfocitos Th17 participan en la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y en su reclutamiento a órganos no linfoides, sin embargo, se desconoce el mecanismo o mecanismos responsables.

De manera general se ha aceptado que la señalización inducida por IL-6 inicia la diferenciación de los linfocitos Th17, mientras que IL-21 promueve la propagación del proceso de diferenciación e IL-23 es importante en el mantenimiento del fenotipo Th17. El programa transcripcional de los linfocitos Th17 depende principalmente de los factores de transcripción STAT3 y ROR $\gamma$ T. Las citocinas IL-6, IL-21, IL-23, TGF- $\beta$  e IL-1 son potentes activadores de STAT3. Mientras que TGF- $\beta$  es necesaria para la activación de ROR $\gamma$ T (58–60).

Las fuentes de citocinas polarizantes son diversas, sin embargo, una de las principales la constituyen las DCs. A través de la activación de PRRs las DCs pueden producir IL-6, IL-21, IL-23 e IL-1. Algunos de los inductores más potentes son los ligandos de CLR, los cuales reconocen carbohidratos de pared celular de hongos y otros patógenos, entre los que se ha estudiado a dectina-1 y -2. Éstos señalizan a través de la cinasa intracelular Syk y del adaptador CARD9 para promover la maduración de las DCs, así como la expresión de citocinas Th17-polarizantes. Por lo que hongos como *C. albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* son potentes inductores de linfocitos Th17. Otros PRRs involucrados en la diferenciación de linfocitos Th17 incluyen a los TLRs y a los receptores tipo NOD (NLR), los cuales actúan en sinergismo con la activación de TLRs o bien promueven la activación del inflamosoma y la consecuente expresión de IL-1 (59).

La inducción de linfocitos Th17 requiere además de la participación de subpoblaciones específicas de DCs. En modelos de infección piel con *C. albicans* la eliminación de las LCs inhibe la diferenciación de linfocitos Th17 (40,53). La capacidad de las LCs para activar linfocitos Th17 depende de su capacidad para presentar Ags en las moléculas del MHC-II y de la expresión de IL-6 (40). De manera interesante, el direccionamiento de Ags de *C. albicans* con un anticuerpo anti-Langerina indujo la expansión de linfocitos Th17 en ratones previamente infectados (40). Sin embargo, a la fecha no existen reportes que confirmen que la inmunización utilizando conjugados anti-Langerina-Ags inocuos, o de conjugados con anticuerpos anti-DEC205 que también son capturados por las LCs, estimulen la diferenciación de *novo* de linfocitos Th17.

Algunos reportes muestran que el direccionamiento de Ags utilizando anticuerpos anti-Dectina-1, acoplados a Ags del virus de la influenza, son capaces de promover la proliferación de linfocitos Th17 de memoria provenientes de sangre humana. Sin embargo, en cultivos de linfocitos T naive (o vírgenes), estos conjugados fueron incapaces de estimular la diferenciación de *novo* de linfocitos Th17 (61). En contraste, anticuerpos anti-DNGR-1 (un receptor de lectinas tipo C), acoplados al péptido de OVA<sub>323-339</sub>, inducen la diferenciación de *novo* de linfocitos Th17 cuando son coadministrados con curdlan pero no con poly I:C como adyuvantes. Cabe destacar que la co-administración con curdlan produjo únicamente linfocitos Th17 y no Th1 (62).

Otros adyuvantes experimentales que pueden estimular la diferenciación de linfocitos Th17 incluyen: el adyuvante incompleto de Freund, monofosforil lípido A (MPL)- dimicolato de trealosa (TDM), enterotoxina termolábil y la CT (63). Sin embargo, su uso en humanos no es viable debido a su alta toxicidad, por lo que se requiere de otros adyuvantes capaces de inducir linfocitos Th17 y cuyo uso sea

seguro en humanos. Algunos estudios han sugerido que CTB puede estimular eficientemente la diferenciación de linfocitos Th17. La administración i.n. de un adenovirus recombinante deficiente expresando OVA en conjunto con CTB produjo la infiltración en pulmón de linfocitos Th17 y Th1 (64). En este estudio se sugirió que CTB estimula la producción de IL-6 en DCs para promover la diferenciación de linfocitos Th17. En otro estudio se observó que la administración i.d. de CTB induce la expresión de TGF- $\beta$  en DCs de láminas epidérmicas e induce la diferenciación de linfocitos Th17 y Th1 (49). De manera que CTB se perfila como un adyuvante con potencial uso en humanos para la inducción tanto de linfocitos Th17 como Th1. Su combinación con Ags direccionados a DCs o solubles podría representar una nueva estrategia de inmunización para la generación de vacunas altamente eficientes.

#### *4. Los linfocitos T CD4+ de memoria constituyen una población heterogénea que provee de inmunidad protectora*

El objetivo central de la vacunación es promover una respuesta inmune antígeno específica de larga duración para prevenir o tratar diferentes padecimientos (27). Las células encargadas de proveer respuestas inmunes rápidas y eficientes contra antígenos previamente encontrados son denominadas células de memoria (65). Dentro de ellas se encuentran los linfocitos T CD4+ de memoria; los cuales participan de manera determinante en las respuestas inmunes contra una serie de patologías, incluyendo infecciones (66–68) y cáncer (28,32,69). Por lo tanto, el estudio de los linfocitos T CD4+ de memoria es de particular importancia para el diseño racional de vacunas.

El estudio de los linfocitos T de memoria se ha enfocado principalmente en poblaciones circulantes en sangre y localizados en órganos linfoides. Éstos fueron por primera vez descritos en sangre humana por Lanzavecchia y colaboradores (70), clasificados de acuerdo a la expresión de CD45RA y de CCR7. Las células CD45RA-CCR7+, se denominan células T de memoria central (T CM) y tienen la capacidad de circular a través de órganos linfoides, mientras que las células CD45RA-CCR7-, que se conocen como células T de memoria efectora (T EM), migran a través de la sangre a tejidos periféricos y linfoides. Posteriormente a este hallazgo, estas poblaciones fueron también descritas en ratón, siendo las T CM células CD62L+CCR7+ (o CD44+CD62L+) y las T EM CD62L-CCR7- (o CD44+CD62L-) (70).

Existen al menos tres modelos para explicar la diferenciación de los linfocitos T de memoria. Uno de ellos posiciona al linfocito según su nivel de diferenciación de la siguiente manera: linfocito naive, T CM y T EM, progresando cada uno de ellos de manera lineal al siguiente estado de diferenciación y sirviendo como precursores de linfocitos T efectores. Otro modelo propone que los T EM derivan de linfocitos

efectores y los T CM de los T EM. Un tercer modelo propone un modelo divergente para la generación de cada población de linfocitos T (70).

Un tercer grupo de linfocitos T de memoria está conformado por los linfocitos T residentes de tejido (T RM), los cuales se encuentran en tejidos no linfoides y carecen de la capacidad para migrar fuera del tejido. Algunos de los tejidos en los que se les ha encontrado incluyen: piel, pulmones, intestino, riñones, vagina, cerebro, etc. Debido a su amplia distribución a lo largo del organismo y a su rápida capacidad de activación, se les considera como importantes elementos de primera defensa contra patógenos (65,71).

Los linfocitos T RM CD4<sup>+</sup> pueden identificarse por la expresión de CD69 y la falta de expresión de CCR7. En humanos, se ha descrito que algunas poblaciones de linfocitos T RM de la piel pueden expresar además CD103. Se propone que su diferenciación tiene lugar en los sitios periféricos en los que se “alojan”. De tal manera que al arribar a los tejidos, factores como la presentación local de antígeno (21) y factores intrínsecos del tejido, como TGF- $\beta$  (72,73), inducen la diferenciación de linfocitos T efectores en linfocitos T RM.

Los linfocitos T RM juegan un papel importante en las respuestas inmunes contra patógenos y algunos tipos de cáncer como melanoma; sobrepasando inclusive la capacidad protectora de los linfocitos T de memoria circulantes. Por ejemplo, en modelos de inmunización contra el virus de la vaccinia (74), de la influenza (75) y contra *Chlamydia trachomatis* (76), se generan tanto linfocitos T de memoria circulantes como residentes de tejido, sin embargo, éstos últimos son suficientes para proveer de inmunidad contra la infección. Mientras que en cultivos de piel humana, se ha observado que los linfocitos T RM poseen mayor capacidad para producir citocinas pro-inflamatorias en comparación con los linfocitos T circulantes (73). Sin embargo, hay evidencia de que en algunos modelos, como el de melanoma subcutáneo, la inmunidad protectora puede ser mediada tanto por linfocitos T RM como por linfocitos circulantes de memoria (77).

La generación de linfocitos TRM podría ofrecer varios beneficios para la inducción de inmunidad protectora. Entre ellos su localización no solo en el sitio de inoculación, sino también en tejidos distales. Por ejemplo, se ha observado que la inmunización en piel puede generar linfocitos T RM Ag-específicos en pulmón (74), mientras que la inmunización vía i.n. puede inducir su localización en útero (76). En tanto que la administración en piel de la vacuna contra la viruela induce protección contra la infección en vías respiratorias (71). Otras de las características que hacen de los linfocitos T RM un elemento importante en las respuestas inmunes incluyen: proveer de “ayuda” para la diferenciación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y de memoria, cooperar en la activación de los linfocitos B, actuar como células citotóxicas a

través de la producción de granzimas y proveer señales de inflamación para atraer y activar a células del sistema inmune innato (78). Es por ello que el estudio de los linfocitos T RM CD4+ constituye un campo de gran interés para el desarrollo de vacunas contra tumores e infecciones.

##### 5. *Participación de los linfocitos TCD4+ en las respuestas inmunes contra melanoma*

Diversos estudios han revelado que los linfocitos T son de vital importancia para las respuestas inmunológicas contra tumores. En pacientes que padecen carcinoma de esófago de células escamosas, cáncer de ovario, cáncer cervical inducido por virus del papiloma humano, cáncer de endometrio o melanoma, la infiltración intratumoral de linfocitos Th1/Th17 y de linfocitos T RM correlaciona con un buen pronóstico (42,79–81). Mientras que el tratamiento de pacientes con leucemia linfoblástica con linfocitos T con TCR quimérico resulta en altos porcentajes de remisión (82). Por lo que diversos grupos de investigación se han avocado al desarrollo de terapias que modulen las respuestas de linfocitos T (como el bloqueo de CTLA-4 o PD-1) o de vacunas terapéuticas capaces de inducir linfocitos T efectores con especificidad por Ags tumorales.

Uno de los retos que enfrenta el desarrollo de respuestas protectoras contra tumores es la inducción de linfocitos T efectores con diferenciación mínima de linfocitos reguladores. Lo cual, en el contexto de las vacunas terapéuticas, se espera poder lograr a través del uso de fuertes adyuvantes. A este respecto, la inmunización experimental en el modelo de melanoma-OVA utilizando como adyuvantes a CpG o poly I:C, induce la diferenciación preferencial de linfocitos T CD8+ efectores sobre la de linfocitos T reguladores (83). Sin embargo, adyuvantes como imiquimod o Quil A saponina favorecen el desarrollo de respuestas de tolerancia (83). De manera similar, el direccionamiento de Ags a DCs Langerina+ puede inducir la diferenciación de linfocitos T CD8+ de memoria, así como protección contra el reto con melanoma, utilizando como adyuvante a poly I:C pero no a Imiquimod, el cual promovió tolerancia (84). Por lo tanto, la elección de fuertes adyuvantes que favorezcan la diferenciación de respuestas efectoras de linfocitos T es crucial en el desarrollo de vacunas contra tumores.

Respecto al papel de los linfocitos T CD4+, se ha propuesto que estos pueden participar en la activación de respuestas mediadas por linfocitos T CD8+. En un modelo de melanoma-OVA i.v. se observó que los linfocitos Th17 pueden jugar un papel importante en el control del crecimiento tumoral (41). Ratones deficientes en la expresión de IL-17A son más susceptibles al crecimiento tumoral en pulmones, en conjunto con menor infiltración del tejido con células CD45+. En tanto que la transferencia de linfocitos Th17, específicos para OVA o para el Ag tumoral TRP-1, confirieron protección contra el desarrollo de

melanoma en pulmones. La protección correlacionó con mayor infiltración de células CD45+, incluyendo linfocitos T CD4+, CD8+ y DCs, en comparación con los ratones sin transferencia celular. De manera interesante, la transferencia de linfocitos Th1 tuvo un efecto mínimo en el crecimiento tumoral. De manera similar, la terapia utilizando transferencia de linfocitos Th17 promovió la disminución del tamaño de tumores en ratones con tumores establecidos, así como una gran infiltración de linfocitos T CD8+ y granulocitos, en comparación con ratones tratados con linfocitos Th1. Además, la transferencia de linfocitos Th17 promovió la activación y migración a pulmones de linfocitos T CD8+ Ag específicos, los cuales mediaron en gran parte la protección observada (41). Por lo que los linfocitos Th17 podrían participar en el desarrollo de inmunidad antitumoral después de la administración de vacunas preventivas o terapéuticas.

En otros modelos, el desarrollo de respuestas protectoras contra melanoma fue relacionado con la diferenciación de linfocitos Th1. Por ejemplo, en modelos murinos de terapia criotérmica, donde el tratamiento logró revertir el crecimiento tumoral, la respuesta protectora fue dependiente principalmente de linfocitos T CD4+ productores de IFN $\gamma$  y con propiedades citotóxicas, como la expresión de granzima B y perforina (69). De manera importante, en un estudio en pacientes con melanoma en etapa avanzada (III/IV) la administración subcutánea del péptido sintético largo NY-ESO-1<sub>79-108</sub> en conjunto con CpG-B emulsificado en Montanide, indujo la presencia en sangre de linfocitos T CD4+ Ag-específicos productores de IFN $\gamma$  y con la capacidad de lisar tumores con expresión de MHC-II. Aunque la relación no alcanzó la significancia estadística, los autores observaron una mayor supervivencia en los pacientes con altos números de linfocitos T CD4+ IFN $\gamma$ + Ag-específicos (43). Sin embargo, en este estudio no se cuantificó a los linfocitos infiltrantes de tumor, por lo que no se descarta una mejor correlación entre supervivencia y el desarrollo de linfocitos T CD4+ efectores, así como la participación de otras células cooperadoras, como los linfocitos Th17. De tal manera que los linfocitos Th1 también juegan un papel importante en las respuestas antitumorales.

Estudios preclínicos han demostrado que la administración de vacunas en mucosas o piel es más eficiente que las administraciones sistémicas para la inducción de protección contra tumores. Lo cual ha sido relacionado con la inducción de linfocitos T RM. En un modelo murino de cáncer de cuello y cabeza, la inmunización con una proteína de fusión del péptido E7 de el HPV16, conjugada a la subunidad B de la toxina del Shiga, el control del crecimiento tumoral fue dependiente del desarrollo de una respuesta de linfocitos funcionales T RM CD8+ infiltrantes de pulmones. Mientras que la falta de infiltración de linfocitos T RM afectó significativamente el desarrollo de protección contra el crecimiento tumoral (85).

En el caso del melanoma, la protección contra el crecimiento tumoral puede ser mediada tanto por linfocitos T CD8+ de memoria circulantes como por residentes de tejido, esto en modelos experimentales de inmunización por escarificación de la piel utilizando el virus recombinante de la vaccinia-OVA (77). Mientras que en modelos de inoculación vía i.d. de vacunas de DNA o de direccionamiento de Ag a DCs DEC205+, el desarrollo de inmunidad depende de linfocitos T RM (86). En estos modelos se demostró además que las inmunizaciones en la piel o mucosas son significativamente superiores en la generación de linfocitos T RM y en la inducción de protección, en contraste con las vías de administración sistémicas, las cuales generan respuestas de linfocitos T de memoria circulantes que resultan insuficientes contra el crecimiento tumoral (77).

En resumen, la evidencia experimental indica que, al menos en el caso del melanoma, es deseable el desarrollo de linfocitos T funcionales de memoria y capaces de infiltrar los tumores. Por lo que las estrategias de inmunización que puedan inducir respuestas de linfocitos T CD4+ Th1/Th17 de memoria son fundamentales en el desarrollo de vacunas terapéuticas o preventivas contra el melanoma.

#### 6. *Participación de los linfocitos TCD4+ en las respuestas inmunes contra rotavirus*

La infección por rotavirus es una de las principales causas de diarrea severa en infantes. Si bien los casos que requieren hospitalización y los decesos relacionados a rotavirus han disminuido significativamente desde la introducción de vacunas en el 2006; en el 2013 se reportó la muerte de más de 200 000 infantes menores de cinco años asociada a infección por rotavirus, principalmente en países de bajos recursos. Todas las vacunas licenciadas para uso en humanos constituyen vacunas de cepas de rotavirus vivo atenuado, las cuales pueden revertir a un fenotipo virulento en infantes inmunodeficientes. Por lo que el desarrollo de vacunas contra rotavirus con un mayor perfil de seguridad es necesario (87).

Los rotavirus son virus sin envoltura, con una estructura de tres cápsides concéntricas que rodean un genoma de 11 segmentos de RNA de doble cadena, los cuales codifican seis proteínas virales estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1-6). La proteína VP6 es la más abundante en las partículas de rotavirus y es altamente conservada, con una divergencia <13 aminoácidos entre cualquiera de las cepas del grupo A que infectan a mamíferos. Cabe destacar que las cepas del grupo A son las principales responsables de infectar humanos. Además, la mayoría de los anticuerpos generados por individuos infectados son reactivos contra VP6 (88). Por lo tanto, VP6 es considerado un potencial candidato para generar nuevas vacunas de subunidades contra rotavirus.

La infección se limita a la replicación en enterocitos del intestino delgado, aunque se han reportado algunos casos de infección sistémica. A la fecha, no se tiene una clara correlación entre protección y el desarrollo de una respuesta inmune en específico (anticuerpos, linfocitos T CD4+, CD8+, etc.). Sin embargo, se sabe que los anticuerpos inducidos por la vacunación experimental o la infección no protegen ante la re-infección (87,89). En un modelo de administración i.n de una proteína de fusión de VP6 y la proteína de unión a maltosa (MBP::VP6), en presencia de la toxina LT (R192G) de *E. coli* como adyuvante, la inmunización redujo en un 93% la carga viral en heces de ratones retados después de un mes con rotavirus murino. Después de la inmunización se encontraron anticuerpos específicos contra VP6 tipo IgG e IgA en sangre e IgA en heces. De manera interesante, la deficiencia de linfocitos B de los ratones  $\mu$ Mt no afectó el desarrollo de protección inmune (89). Por lo que, al menos en este modelo de inmunización utilizando a VP6, la protección contra rotavirus es independiente de la presencia de anticuerpos.

Utilizando diversas cepas de ratones deficientes en linfocitos B ( $\mu$ Mt, J<sub>H</sub>D), linfocitos T ( $\alpha\beta$  deficientes, desnudos) y linfocitos  $\gamma\delta$ , estudios posteriores determinaron que la protección contra rotavirus, inducida por inmunización i.n. con MBP::VP6+ LT (R192G), es mediada principalmente por linfocitos T  $\alpha\beta$ . Específicamente, los linfocitos T CD4+ fueron los principales responsables del desarrollo de inmunidad protectora (44). Cuando ratones RAG2<sup>-/-</sup> inmunizados fueron inoculados con anticuerpos anti-CD8 o anti-CD4, únicamente la eliminación de los linfocitos T CD4+ (>85% en bazo, MLN, linfocitos intraepiteliales y lámina propia) redujo significativamente el nivel de protección siete días después del reto (del 96 al 70%) (44). Sin embargo, el papel de los linfocitos T CD4+ fue más significativo a largo plazo. En el modelo de enfermedad crónica por rotavirus en ratones RAG2<sup>-/-</sup>, los cuales muestran altas cargas virales por tiempos indefinidos, la transferencia de linfocitos T CD4+ provenientes del bazo de ratones inmunizados logró controlar a la infección, resultando inclusive en valores indetectables de rotavirus en las heces (44). Debido a lo anterior, es generalmente aceptado que la inmunización contra VP6 induce respuestas protectoras dependientes de linfocitos T CD4+.

Con base en lo anterior, diversas publicaciones han sido dedicadas al estudio de la polarización de los linfocitos T CD4+ después de la inmunización con VP6. Se ha observado en ratones inmunizados vía i.n con MBP::VP6+ LT (R192G) que la re-estimulación *in vitro* de sus esplenocitos produce altos niveles de IFN $\gamma$  e IL-17. Inclusive, se ha detectado un epítipo inmunodominante (AA<sub>232-261</sub>) de linfocitos T CD4+ en VP6 (90). De manera interesante, en otro estudio utilizando el mismo sistema de inmunización, se observó que las células obtenidas de intestinos, placas de Peyer y de ganglios linfáticos mesentéricos,

regulan rápidamente un aumento (12 h después del reto) de la expresión de IFN $\gamma$  e IL17 (45). Por lo que la inmunización vía mucosas contra VP6 en presencia de fuertes adyuvantes puede inducir respuestas sistémicas de linfocitos T CD4+. De manera similar, se ha reportado que la administración s.c. de anti-DEC205-VP6 en conjunto con poly I:C induce protección contra la infección así como la diferenciación de linfocitos Th1 (35). Sin embargo, en ratones deficientes en la expresión de IFN $\gamma$  o de IL17 el nivel de protección contra el reto viral es el mismo que en los ratones WT (45). No obstante, no se descarta su participación directa e indirecta en el desarrollo de inmunidad protectora contra el rotavirus. Una posibilidad es que posean entre sí funciones efectoras redundantes o bien, que colaboren con linfocitos T CD8+. En modelos murinos, algunos reportes indican que los linfocitos T CD8+ de memoria pueden mediar la eliminación del virus en ratones RAG2<sup>-/-</sup> (91). Mientras que en los estudios de inmunización contra VP6, se ha descrito que la mayoría de los linfocitos productores de IFN $\gamma$  son linfocitos T CD8+ (45). Por lo tanto, las estrategias de inmunización que puedan inducir un amplio espectro de respuestas de linfocitos T podrían ayudar a la generación de nuevas vacunas contra rotavirus.

#### 7. *Participación de los linfocitos T CD4+ en las respuestas inmunes contra Sporothrix schenckii*

La esporotricosis es una micosis de la piel causada por especies del complejo *Sporothrix schenckii*. La inoculación se da a través del contacto de piel lacerada con material contaminado como tierra, plantas y material en descomposición. Por lo que personas que realizan actividades relacionadas a la agricultura o la jardinería representan a la población en mayor riesgo de contraer esta infección. Otra forma de contagio se da a través de mordeduras de gatos infectados, la cual es muy común en Brasil. Aunque se considera que esta enfermedad está distribuida de manera global, su incidencia es mayor en países con climas tropicales como Brasil, Perú y México (92).

*Sporothrix schenckii* es un hongo dimórfico; en el ambiente se le encuentra en forma de conidios o hifas, mientras que la forma de levadura se desarrolla a 37°C. Tras penetrar en la piel, los conidios del hongo se convierten en levaduras, las cuales pueden permanecer en la piel (forma fija) o extenderse a los ganglios linfáticos adyacentes (forma linfocutánea) (93). En pacientes inmunodeficientes el hongo puede diseminarse sistémicamente a través de la sangre. La forma fija se caracteriza por el desarrollo de una lesión única o de un par de lesiones ulcerativas. En la forma linfocutánea, aparecen lesiones en las extremidades, como manos y brazos. La forma inicial constituye una pápula o pústula, seguida por la formación de un nódulo subcutáneo. A medida que la enfermedad progresa, aparecen lesiones a lo largo de la región de los ganglios linfáticos. Algunos autores consideran que la forma cutánea localizada ocurre

en sujetos re-infectados, mientras que la forma linfocutánea se manifiesta en sujetos sin previa exposición al patógeno (93). Finalmente, en la forma diseminada aparecen múltiples lesiones en la piel y la infección puede extenderse a otros órganos (92).

Poco se sabe sobre la respuesta inmune contra *S. schenkii*. Sin embargo, se sabe que en la esporotricosis cutánea los granulomas están infiltrados por linfocitos T CD4+ y CD8+, así como por células productoras de IFN $\gamma$  (94), por lo que se cree que ésta citocina es clave en el control de la infección. Sobre cómo es reconocido por el sistema inmune, algunos reportes indican que este hongo puede inducir la activación del complemento, contribuyendo a su fagocitosis. Además, lípidos de la pared celular pueden ser conocidos por TLR4 para promover la expresión de óxido nítrico, aunque este último factor ha sido ligado a un efecto deletéreo en la activación de linfocitos T (95). Cabe destacar que la incubación de conidios o levaduras (inactivados por calor) obtenidos de lesiones cutáneas puede inducir la expresión de CD80, CD86, CD83 y OX40 en DCs derivadas de monocitos humanos, así como la proliferación y alta producción de IFN $\gamma$  de linfocitos T aloreactivos (96). En contraste con los conidios inactivados obtenidos de lesiones linfocutáneas (97) o viscerales (96), los cuales no inducen la activación de DCs de la piel de ratón, ni el desarrollo de respuestas de linfocitos T CD4+. Por lo que el uso de conidios inactivados, sin importar su origen, en combinación con adyuvantes podría representar una opción viable para el desarrollo de una vacuna contra *S. schenkii*.

A través de modelos experimentales de infección se ha podido determinar que los linfocitos T CD4+ juegan un papel importante en el control de la enfermedad. En un modelo de infección sistémica con levaduras de *S. Schenkii* se observó la diferenciación de linfocitos Th17 y Th1 en bazo, los cuales fueron importantes para el control de la infección en bazo (98). En este modelo, la administración de un anticuerpo anti-IL-23 (importante para la diferenciación de los linfocitos Th17) resultó en menor diferenciación tanto de linfocitos Th17 como Th1 y en grandes números de UFCs en bazo. Por lo que los linfocitos Th17 podrían cooperar con los linfocitos Th1 en el control de la esporotricosis sistémica ocasionada por levaduras. Mientras que en la esporotricosis cutánea causada por levaduras, se ha estudiado únicamente a los linfocitos Th1. En un modelo de esporotricosis cutánea en gerbil de Mongolia, la administración de IL-12 recombinante murina indujo un incremento en la capacidad fagocítica y en el estallido respiratorio de macrófagos de peritoneo, así como el desarrollo de una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH). El tratamiento con IL-12 resultó también en un bajo número de UFCs (70% menos que los animales sin IL-12) en bazo e hígado, inhibiendo la aparición de granulomas

en la cola, es decir, previniendo la diseminación sistémica de la enfermedad (99). Por lo tanto, se considera que las respuestas de tipo Th1 y Th17 son importantes en el control de la esporotricosis.

Por otra parte, son pocos los estudios sobre la inducción de respuestas protectoras a través de vacunas experimentales. En un estudio de inmunización/refuerzo s.c. con proteínas de la pared celular de *S. schenkii*, utilizando como adyuvante a Montanide Pet Gel A o hidróxido de aluminio, los ratones desarrollaron protección parcial contra el reto intraperitoneal (i.p.) con levaduras de *S. schenkii*. La protección observada correlacionó con la presencia en bazo de linfocitos productores de IFN $\gamma$ , IL-17 e IL-4 (100). Sin embargo, es importante considerar que la principal forma infectiva encontrada en el ambiente son los conidios de *S. schenkii*, los cuales penetran el organismo a través de traumatismos cutáneos. Por lo tanto, para el estudio de las respuestas inmunes protectoras, así como para el desarrollo racional de vacunas contra este hongo, se necesita de modelos experimentales que tomen en cuenta estas consideraciones.

Recientemente se reportó un modelo de infección por administración i.d. de conidios de *S. schenkii*, los cuales inducen lesiones en la piel y la diseminación sistémica del hongo. En este estudio se determinó la respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> inducida por la infección o por la inmunización vía i.d. de conidios inactivados por calor a 60°C (IC) en conjunto con la toxina completa del cólera (CT) como adyuvante. Los autores encontraron diferencias importantes: la infección indujo una respuesta predominante de linfocitos Th1, así como un gran infiltrado de linfocitos T efectores en piel, mientras que la inmunización indujo una respuesta de linfocitos T de memoria central con un perfil predominantemente tipo Th17. Los autores demostraron también que la inmunización confiere protección contra la infección local y sistémica, así como la inducción de una DTH, las cuales fueron dependientes de linfocitos TCD4<sup>+</sup>. Por lo que el desarrollo de respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria central podría ser fundamental para conferir protección a largo plazo contra la infección por *S. schenkii* (97). El traslado de estos hallazgos a el desarrollo de una vacuna requeriría del uso de adyuvantes no tóxicos como la CTB, que puedan inducir una respuesta protectora mediada por linfocitos Th17.

## **JUSTIFICACIÓN**

Las vacunas son consideradas como uno de los desarrollos más exitosos en la historia de la medicina debido a la prevención de infecciones contra patógenos como *M. tuberculosis*, el virus de la variola, el virus de la rubeola, etc. Sin embargo, aun no existen vacunas para prevenir enfermedades como el SIDA, la leishmaniasis, infecciones causadas por hongos o vacunas que puedan prevenir el desarrollo de tumores

no inducidos por virus. Diversos estudios han revelado que el desarrollo de respuestas celulares mediadas por linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1/Th17 serían claves para la inducción de inmunidad protectora de larga duración. El direccionamiento de Ags a DCs ha demostrado ser una estrategia altamente eficiente para la inducción de linfocitos T, los cuales promueven protección en diversos modelos experimentales de infección y melanoma. Sin embargo, el desarrollo de nuevas vacunas basadas en el direccionamiento de Ags o de Ags inocuos requiere de la identificación de fuertes adyuvantes cuyo uso sea seguro en humanos.

La CTB es utilizada en la vacuna inactivada contra el cólera, la cual es bien tolerada inclusive por sujetos inmunocomprometidos. En modelos experimentales se ha descrito que puede actuar como un adyuvante para Ags altamente inmunogénicos, promoviendo respuestas protectoras de larga duración. Sin embargo, su capacidad para inducir activación de DCs es aún un tema controversial. Siendo que el direccionamiento de Ags y de Ags inocuos requieren de adyuvantes que puedan inducir la activación de DCs y la consecuente activación y diferenciación de linfocitos T, se requiere de estudios que clarifiquen el papel de CTB en la activación tanto de DCs como de linfocitos T *in vivo*.

La piel es un órgano altamente inmunogénico por la alta infiltración de DCs que presenta. A través de la administración intradérmica de Ags inocuos en conjunto con CTB se puede inducir la activación y diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1/Th17. No obstante, se desconoce si esta respuesta es de larga vida y si puede mediar protección contra patógenos o tumores. Por lo tanto, en este trabajo nos propusimos evaluar si la administración i.d. de CTB puede inducir la activación de DCs, así como la activación y diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectoras y de memoria cuando es coadministrada con Ags direccionados a DCs, Ags inocuos solubles o con Ags derivados de patógenos poco inmunogénicos. También evaluamos si estas estrategias de inmunización inducen protección de larga duración en los modelos de melanoma, infección con rotavirus y con el hongo *S. schenkii*.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuándo CTB es administrado en la piel puede actuar como un adyuvante para antígenos direccionados a DCs, solubles o derivados de patógenos para inducir inmunidad protectora de larga duración y dependiente de linfocitos T CD4<sup>+</sup>?

## **HIPÓTESIS**

La administración intradérmica de CTB en conjunto con antígenos direccionados a DCs, solubles y derivados de patógenos puede inducir respuestas protectoras de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1/Th17 para la generación de inmunidad de larga duración.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la administración intradérmica de CTB en conjunto con antígenos direccionados a DCs, solubles y derivados de patógenos puede inducir el desarrollo de una respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1/Th17 que provea de inmunidad protectora de larga duración.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar si la administración i.d. de CTB puede inducir la activación *in vivo* de DCs.
2. Determinar si la coadministración de CTB con un antígeno modelo direccionado a DCs o soluble puede estimular la activación, diferenciación y migración a piel de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1/Th17 Ag específicos y de memoria.
3. Determinar si la inmunización i.d vía direccionamiento de antígenos a DCs o solubles en conjunto con CTB puede producir inmunidad de larga duración y dependiente de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.
4. Determinar si CTB puede actuar como un adyuvante para antígenos derivados de patógenos para inducir la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1/Th17, así como protección de larga duración en un modelo de infección en piel.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Ratones*

Los ratones con fenotipo silvestre C57BL6 y los transgénicos que expresan a la proteína verde fluorescente, bajo el promotor del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, fueron obtenidos del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM. Los ratones BALB/c fueron obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública, SSA. Los ratones transgénicos OT-II CD45.1 fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las normas sobre cuidado y experimentación en animales establecidas por las regulaciones nacionales y el Comité Institucional de Ética. Los experimentos con ratones DO11.10 Thy1.1<sup>+</sup> fueron realizados en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la

Escuela de Medicina, de la Universidad de Stanford, CA, EUA, siguiendo las normativas institucionales. Los ratones utilizados tuvieron la misma edad (7-10 semanas) y sexo (machos).

#### *Enriquecimiento de linfocitos T CD4+*

Se colectaron los SDLN, el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones OT-II CD45.1+ o DO11.10 Thy1.1+, los cuales se colocaron en medio RPMI (Gibco) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) (HyClone), 300 µg/mL de glutamina (Gibco) y 100 U/mL de penicilina/ 100 µg/mL estreptomycin (Biowest), para ser macerados, de manera separada, y obtener suspensiones celulares. Los eritrocitos fueron lisados con un buffer de lisis de sangre (Biolegend). Después, las suspensiones de ganglios y bazo fueron incubadas en conjunto por 30 min en hielo con sobrenadantes caseros contra linfocitos T CD8 (2.43), linfocitos B (B220), células MHC-II+ (NIMR4) y macrófagos (F4/80). Posteriormente, las células fueron lavadas, re-suspendidas en medio RPMI suplementado y colocadas en placas de Petri, previamente recubiertas con anti-IgG de rata (ThermoFisher), e incubadas por 40 min a 4°C. Las células no adherentes fueron recuperadas, lavadas y re-suspendidas en PBS para su inyección en la vena retro-orbital.

#### *Transferencia celular e inmunizaciones*

Ratones congénicos recibieron por la vena retro-orbital  $4.5-5 \times 10^6$  linfocitos T CD4+. Después de 24 h, los ratones fueron anestesiados e inyectados con los inóculos en ambas orejas (o en el costado derecho para los experimentos de melanoma y rotavirus). Los ratones recibieron 1 µg de anti-DEC205-OVA (~0.5 µg de OVA), 1 µg de anticuerpo control (isotipo)-OVA sin afinidad por receptores de DCs o 3- 30 µg de OVA soluble ± 10 µg de CTB (Sigma-Aldrich). Para los experimentos de proliferación los ratones recibieron linfocitos T CD4+ marcados con carboxi fluoresceína (CFSE), 24 h antes de la inoculación con 1 µg de anti-DEC205-OVA o 1, 3 o 10 µg de OVA soluble. Para los experimentos de inmunización/refuerzo, los ratones fueron inmunizados vía i.d. en las orejas con el Ag conjugado o soluble en presencia de 10 µg de CTB. Después de 15 días, los ratones recibieron vía i.p. al Ag conjugado o soluble sin adyuvante.

### *Procesamiento de tejidos*

Para determinar la presencia de linfocitos T productores de citocinas en tejidos no linfoides, se obtuvieron suspensiones celulares no fraccionadas de piel, pulmones e intestinos siguiendo los protocolos descritos a continuación.

Después de tres o siete días posteriores a la inmunización, los ratones fueron sacrificados para colectar los SDLN y la piel del sitio de inoculación. Ambos tejidos fueron incubados con 25 µg/mL Liberase TL (Roche) y 0.125 mg/mL DNase (Roche) por 25 minutos a 37°C. La piel fue cortada en pequeños trozos e incubada con el medio de digestión por 45 min más en agitación constante y a 37°C. Después, la digestión fue detenida agregando EDTA 0.5 µM y las suspensiones celulares fueron pasadas por un filtro de 70 µm (Corning), seguido por adición de 0.125 mg/mL DNase. Finalmente, las células fueron lavadas, contadas y teñidas o re-estimuladas.

Para obtener células de los pulmones, los ratones fueron sacrificados siete días posteriores a la inmunización. Los pulmones fueron colectados, lavados con agua para remover el exceso de sangre y colocados en tubos de polipropileno para ser cortados en pequeños trozos y digeridos como se mencionó en el párrafo anterior. Después se lisaron a los eritrocitos contenidos en las suspensiones celulares utilizando el buffer de lisis (Biolegend). Finalmente, las células fueron lavadas, contadas y teñidas.

Las células de intestino fueron obtenidas siguiendo un procedimiento previamente reportado (101). Brevemente: a los intestinos se les removió los ganglios mesentéricos y las placas de Peyer. Después fueron abiertos longitudinalmente, lavados del contenido fecal, cortados en pedazos de 0.5 cm de longitud e incubados (2X) con HBSS con 5% FCS y EDTA 2 mM por 20 min a 37°C con agitación. Después de cada incubación, el medio conteniendo células epiteliales y dedritos fue descartado. El tejido remanente fue macerado e incubado con HBSS con 5% FCS, 1 mg/mL de colagenasa IV y 40 U/mL de DNase I por 20 min a 37°C con agitación. Las suspensiones celulares fueron colectadas, pasadas por un filtro de 100 µm y centrifugadas. Las células fueron después contadas y divididas para re-estimulación y tinción.

### *Re-estimulación in vitro*

Las células totales de ganglios o tejidos no linfoides fueron re-suspendidas en medio RPMI suplementado con 10% FBS, 300 µg/mL de glutamina, 100 U/mL de penicilina/ 100 µg/mL de estreptomicina, 110 µg/mL de piruvato de sodio y b-mercaptoetanol 10 µM. Con el objetivo de estimular poblaciones de

memoria, las células de los SDLN fueron incubadas con el péptido 223-229 de OVA (in vivogen) por 48 h a 37°C, seguido por la incubación con el coctel de estimulación + inhibidor del transporte de proteínas (eBioscience) por 4 h a 37°C. Para estimular la rápida producción de citocinas en linfocitos infiltrantes, las células de la piel y del intestino fueron re-estimuladas únicamente con el coctel de estimulación + inhibidor del transporte de proteínas (sin la incubación con el péptido de OVA).

### *Citometría de flujo*

Para el conteo, las células fueron teñidas con anti-CD45-PECy7 (Biolegend) y DAPI (ThermoFisher), mezcladas inmediatamente con las perlas CountBright (ThermoFisher) y analizadas por citometría de flujo. Para la tinción de Ags de superficie, en primer lugar se bloqueo a los receptores Fc (con el sobrenadante 2.4G2 contra CD16/32) y después se tiñeron con los siguientes anticuerpo: anti-CD45-APC (Biolegend) o -PECy7 (Biolegend), anti-CD4-APC-Cy7 (Biolegend), anti-TCRVβ5.1, 5.2 -PECy7 (Biolegend) or anti-Vα2-FITC (eBioscience), anti-CD45.2-Percp-Cy5.5 (Biolegend) o anti-CD45.1-Percp-Cy5.5 (Biolegend), anti-CD69-PE (ebioscience) y anti-CCR7-FITC (Biolegend). La tinción con el marcador de viabilidad LIVE/DEAD Fixable Aqua (Thermofisher) también fue incluida. Para el análisis de DCs los siguientes anticuerpos fueron utilizados: anti-CD45-APC (Biolegend), anti-Ter119-Percp-Cy5.5, anti-CD3-Percp-Cy5.5, anti-CD19-PercpCy5.5, anti-CD44b-Percp-Cy5.5, anti-MHCII-FITC (Biologend) y CD86-PE (eBioscience). Para realizar tinción intracelular de citocinas, la tinción de superficie fue seguida por incubaciones con soluciones de fijación y permeabilización (Thermofisher), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para realizar tinción de citocinas y factores de transcripción, se utilizó el buffer True-Nuclear transcription factor buffer set (Biolegend) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las tinciones intracelulares incluyeron: anti-IL-17-PE (BD Bioscience), anti-IFNγ-APC (Biolegend), anti-T-bet-BV421 (BD Biosciences) o anti-RORγT-APC (Thermofisher). Las células fueron adquiridas en un clitómetro BD FACSCanto II o BD LSRFortessa (Becton, Dickinson and company). Los datos fueron analizados con el programa Flowjo (Tree Star, Inc.).

### *Reto de melanoma*

Para el reto subcutáneo, los ratones C57BL6 fueron transferidos con linfocitos OT-II CD45.1+ 24 h antes de ser inmunizados vía i.d con 1 µg de anti-DEC205OVA o 3 µg de OVA soluble ± 10 µg de CTB. Después de 30 días, los ratones recibieron vía s.c. en el flanco derecho 2.5x10<sup>5</sup> células MO4 (que expresan OVA) y la supervivencia fue monitoreada durante 21 días. De manera alternativa, ratones C57BL6 fueron retados vía i.v. 30 días después de la inmunización para inducir el crecimiento de tumores en los pulmones.

En algunos experimentos los ratones inmunizados con anti-DEC205-OVA recibieron vía i.p. 250 µg de anti-CD4 (GK1.5) o del control de isotipo (eBRG1) de la siguiente manera: un día antes de la inoculación de MO4, el día de la inoculación de MO4 y cada tres días posteriores a la inoculación de MO4 durante 12 días. Dieciséis días después de la inoculación de MO4 los ratones fueron sacrificados y los pulmones colectados para su cuenta como se ha descrito previamente (102). Brevemente: los pulmones fueron lavados con agua para remover el exceso de sangre y decolorados con solución de Feket. Los nódulos metastásicos fueron contados con un estereoscopio (Leica Microsystems). Los nódulos incontables fueron reportados como >250.

### *Reto viral*

Ratones BALB/c fueron inmunizados vía i.d. con 23 µg de anti-DEC205-VP6 (1.5 µg de VP6) o con 3 µg de VP6 soluble sintetizado in vitro (Obtenido del rotavirus murino Ew in vitro con el Rapid Translation System, Roche), en conjunto con 10 µg de CTB. Después de 20 días, los ratones fueron retados vía oral con  $1 \times 10^4$  unidades formadora de focos de la cepa RV EDIM<sub>WT</sub>, como ha sido descrito en otros reportes (35). Para los experimentos de inmunización/refuerzo, los ratones fueron inmunizados vía i.d. y después de 15 días recibieron vía i.p. anti-DEC205-VP6 o VP6 soluble. Los ratones inmunizados con anti-DEC205-VP6 recibieron vía i.p. 250 mg de anti-CD4 o el control de isotipo de la siguiente manera: tres días antes del reto viral, el día del reto y tres días después del reto. Siete días después del refuerzo, los ratones fueron retados con el rotavirus. Muestras de heces fecales fueron colectadas diariamente durante 8 días y mantenidas a -20°C para el análisis de carga viral por ELISA- sándwich. La protección fue calculada como %protección=  $100\% - (\text{Área bajo la curva del grupo experimental (absorbancia a 405 nm)} / (\text{Área bajo la curva del grupo control (absorbancia a 405nm)} \times 100\%))$ . Lo cual representa la disminución de Ags de rotavirus después de la inmunización, relativo al grupo control, durante los ocho días posteriores al reto.

### *ELISA*

La carga viral en las heces fecales fue determinada por ELISA-sandwich, de acuerdo a reportes previos (35). Brevemente: las muestras fueron diluidas y colocadas en placas de 96 pozos, previamente recubiertos con un anticuerpo monoclonal de cabra contra diferentes cepas de rotavirus. Después de una incubación de 2 h a 37°C, las placas fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo policlonal de conejo contra rotavirus RV RRV por 1 h a 37°C. Posteriormente las placas fueron incubadas con PA-conjugado a un anticuerpo anti-IgG de conejo por 1 h a 37°C. Finalmente, después de lavar, el sustrato (p-nitrofenil fosfato disodio)

fue agregado y las placas se revelaron por 30-45 min a 37°C. La absorbancia a 405 nm fue leída con un lector de placas de 96 pozos (BIO-TEK Instruments).

#### *Activación de DCs*

Ratones GFP-MHC-II recibieron vía i.d. en las orejas 10 µg de CTB o PBS. Después de 12, 24 o 72 h, se obtuvieron láminas epidérmicas por incubación con EDTA 0.5 µM durante 12 h a 4 °C, las cuales fueron teñidas con anti-CD86-PE (eBioscience), montadas con Vecta Shield (Vector Laboratories) y selladas. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal Leica TCS SP8x y analizadas con el programa Leica Application Suite Advanced Fluorescent Lite Software (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). De manera alternativa, ratones C57BL6 recibieron vía i.d. en las orejas 10 µg de CTB o PBS. Después de 24, 72 h o siete días, los ratones fueron sacrificados para coleccionar los SDLN y la piel. Los tejidos fueron procesados para obtener suspensiones celulares para su tinción y análisis por citometría de flujo.

#### *Inmunización y reto contra el hongo *Sporothrix schenckii**

Ratones C57BL6 fueron inmunizados en la oreja derecha con  $5 \times 10^5$  conidios inactivados (IC) de *Sporothrix schenckii*. Cepa EH-143,  $\pm 2$  µg de CTB. Después de 14 días los ratones fueron sacrificados para obtener la piel del sitio de inoculación o, después de 30 días, retados con los conidios vivos vía i.d. en la oreja para inducir la aparición de granulomas en la cola. Diecisiete días después del reto, el área de la lesión en la oreja fue calculada con el programa ImageJ (NIH) y la aparición de granulomas en la cola fue evaluada 60 días después del reto. De manera alternativa, los ratones inmunizados fueron retados después de 30 días con  $5 \times 10^5$  IC en la oreja vía i.d. y el grosor de la oreja fue medido el mismo día, 24 y 48 h después del reto con un micrómetro electrónico digital (TRUPER).

#### *Análisis estadístico*

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Cuando se compararon dos grupos, la significancia estadística fue calculada usando la prueba t-Student no pareada. Para la comparación de más de dos grupos, se utilizó la prueba ANOVA de una o dos vías con comparación múltiple de Turkey. Un valor  $P < 0.05$  fue considerado como significativo.

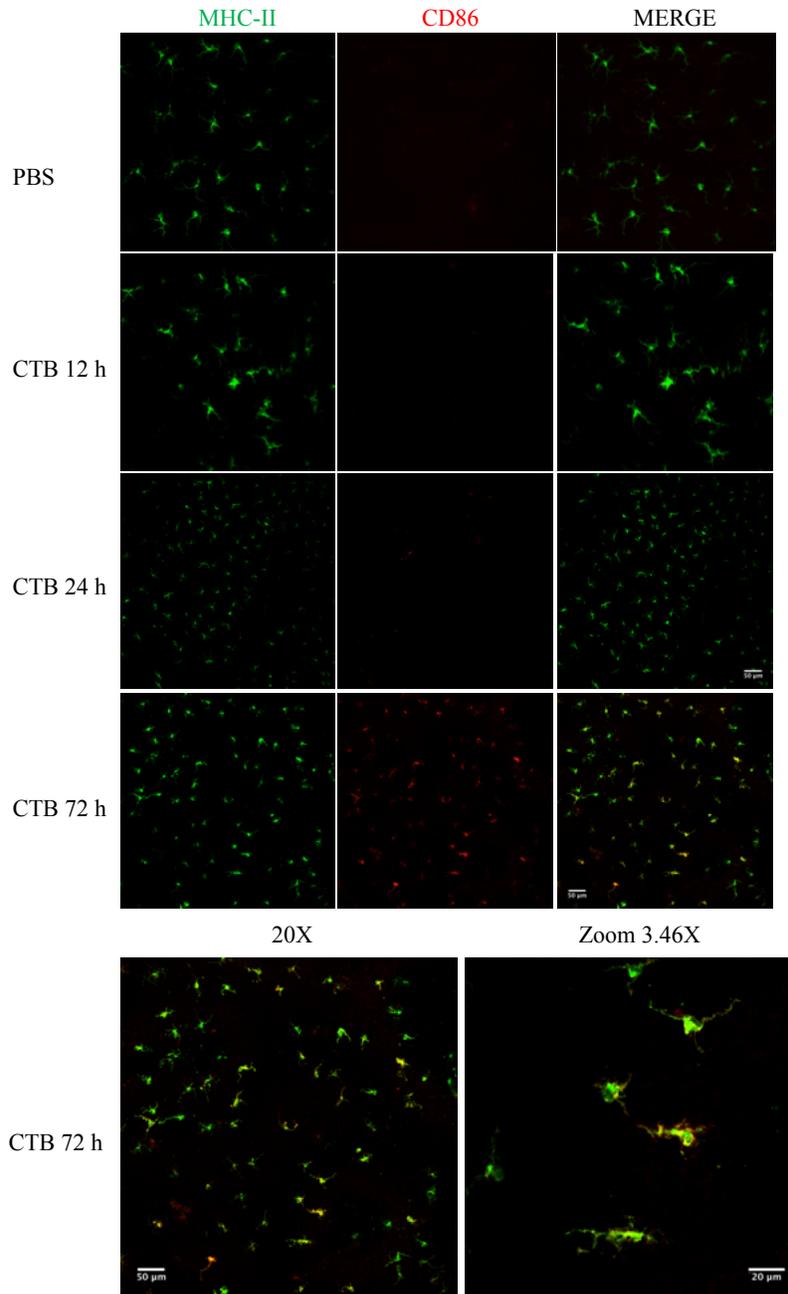
## RESULTADOS

### 1 *La administración intradérmica de CTB induce activación y acumulación tardía y prolongada de DCs en tejidos linfoides y no linfoides*

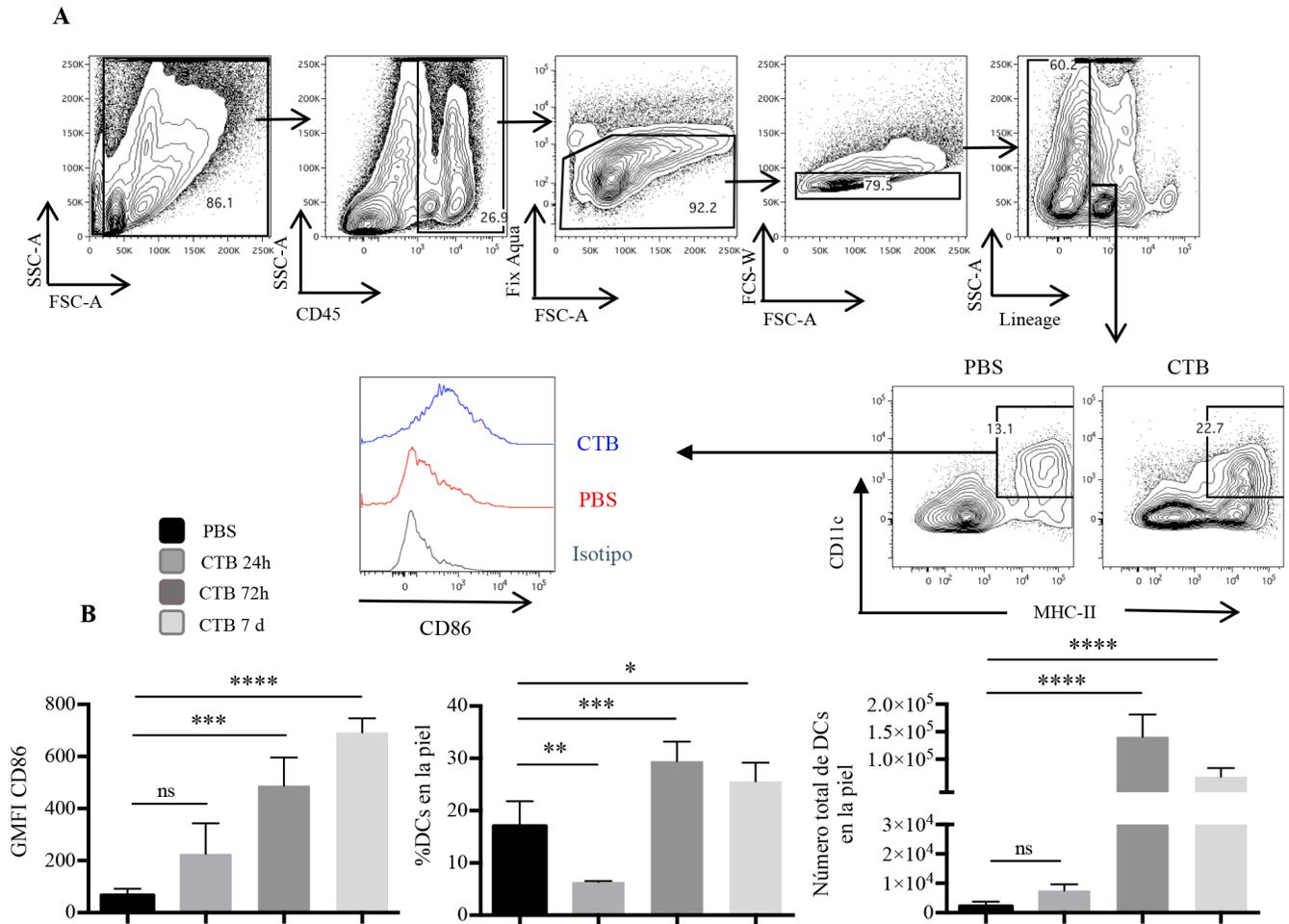
Uno de los atributos más controversiales de CTB como adyuvante es su capacidad para activar DCs. Por lo que nuestro primer objetivo fue determinar si a través de su administración i.d. puede inducir la activación de DCs de la piel. Con este fin, ratones GFP-MHC-II fueron inoculados vía i.d. con CTB y se obtuvieron las capas epidérmicas del sitio de inoculación después de 12, 24 y 72 h; seguido por la tinción del marcador de activación CD86. A través del uso de microscopía confocal pudimos detectar la expresión de CD86 en células MHC-II<sup>+</sup> de la epidermis 72 h después de la inoculación de CTB, pero no a tiempos más tempranos (Fig. 1). Después, utilizando citometría de flujo multiparamétrica, caracterizamos a las DCs en piel total del sitio de inoculación como células viables CD45<sup>+</sup>linaje-CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup> (Fig. 2A). De esta manera confirmamos que CTB induce la activación *in vivo* de DCs de la piel 72 h después de su administración i.d., de acuerdo al incremento en la expresión de CD86 e, interesadamente, su acumulación en el sitio de inoculación (Fig. 2B). Sorprendentemente, tanto la activación como la acumulación de las DCs persistieron siete días después de la administración de CTB (Fig. 2B).

A continuación, nos preguntamos si CTB puede inducir también la activación y acumulación de DCs en los SDLN. Para contestar a esta pregunta, analizamos a las células de los SDLN por citometría de flujo multiparamétrica, la cual nos permitió discriminar entre las DCs migrantes de la piel (CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>hi</sup>) y las residentes de ganglio (CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>low</sup>) (Fig. 3A). Setenta y dos horas después de su administración, CTB indujo la acumulación de DCs migrantes de la piel en los SDLN, las cuales mostraron alta expresión de CD86, en comparación con el control negativo de PBS (Fig. 3B). Tanto la activación como la acumulación de DCs migrantes disminuyó después de las 72 h. Sin embargo, ambos parámetros fueron aún mayores en comparación con el control de PBS después de siete días. De manera interesante, CTB también indujo un incremento en la expresión de CD86 en las DCs residentes de ganglio, así como su acumulación después de siete días (Fig. 3C). Cabe destacar que la activación y acumulación de DCs tomó lugar únicamente en el sitio de inoculación y en los SDLN, dado que no observamos ninguno de estos cambios en un sitio distal como los ganglios mesentéricos (Fig. 3D).

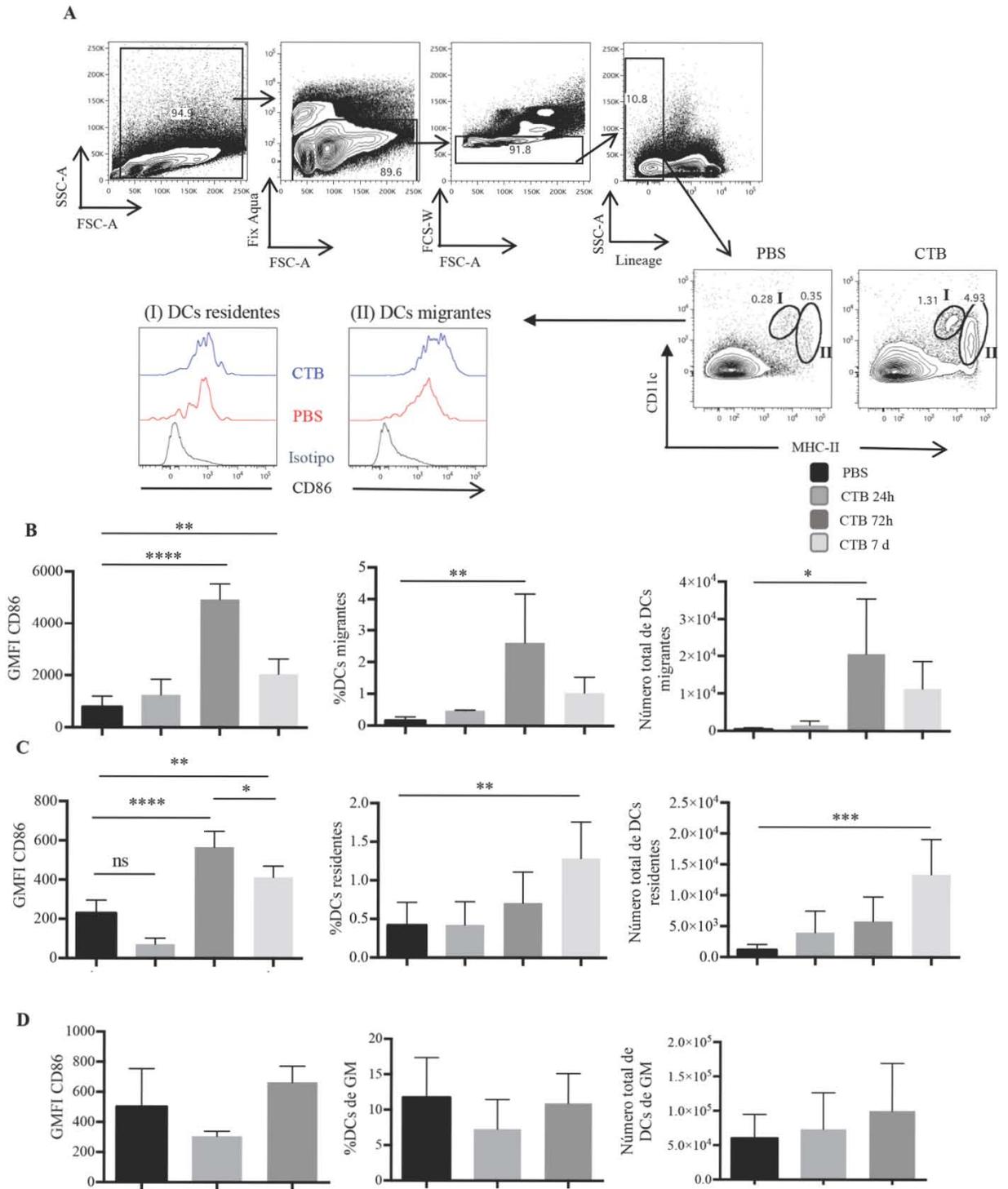
En conjunto, nuestros datos demuestran que la administración de CTB en piel actúa como un potente estímulo, induciendo la activación tardía y prolongada de DCs de la piel y residentes de ganglios linfáticos.



**Figura 1.** Activación de DCs de la piel por administración i.d. de CTB. Ratones GFP-MHC-II fueron inoculados vía i.d. en ambas orejas con 10  $\mu$ g de CTB o PBS. Después de 12, 24 y 72 h, los animales fueron sacrificados para obtener las láminas epidérmicas, realizar tinción de CD86 y montarlas en laminillas para analizarlas por microscopía confocal. Imágenes representativas de tres experimentos independientes mostrando la expresión de MHC-II (verde) y CD86 (Rojo).



**Figura 2.** La inoculación i.d. de CTB induce activación tardía y prolongada de DCs de la piel. Ratones C57BL6 fueron inoculados vía i.d. en ambas orejas con 10  $\mu$ g de CTB o PBS. Después de 24, 72 h y 7 días los animales fueron sacrificados para obtener suspensiones celulares de la piel total de las orejas y analizarlas por citometría de flujo. (A) Estrategia de análisis para la identificación de DCs viables CD45+Linaje-CD11c+MHC-II+ y análisis de la expresión de CD86. (B) Intensidad media de fluorescencia geométrica (GMFI) de CD86, porcentaje y números totales de DCs en la piel después de la administración de CTB o del vehículo (PBS). Media  $\pm$  SD, N= 4-6, datos agrupados de dos experimentos independientes. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Turkey (\*P < 0.05, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.0005, \*\*\*\*P < 0.0001).



**Figura 3.** La inoculación i.d. de CTB induce activación tardía y prolongada de DCs migrantes de la piel y residentes de ganglio. Ratones C57BL6 fueron inoculados vía i.d. en ambas orejas con 10 µg de CTB o PBS. Después de 24, 72 h y 7 días los animales fueron sacrificados para obtener suspensiones celulares de los SDLN y de los ganglios linfáticos mesentéricos (GM) y analizarlas por citometría de flujo. (A) Estrategia de análisis para la identificación de DCs viables CD45+Linaje-CD11c+MHC-II+. Las DCs migrantes de la piel fueron identificadas como CD11c+MHC-II<sup>hi</sup> y las residentes de ganglio como CD11c+MHC-II<sup>low</sup>, la expresión de CD86 fue terminada en cada población. Intensidad media de fluorescencia geométrica (GMFI) de CD86, porcentajes y números totales de DCs migrantes de la piel (B), residentes de los ganglios de drenaje (C) y de los GM (D) después de la administración de CTB o del vehículo (PBS). Media ± SD, N= 4-6, datos agrupados de dos experimentos independientes. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Turkey (\*P < 0.05, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.0005, \*\*\*\*P < 0.0001).

2. *La coadministración de CTB con antígenos direccionados a DCs o solubles promueve la expansión y activación diferencial de linfocitos T CD4+ antígeno específicos*

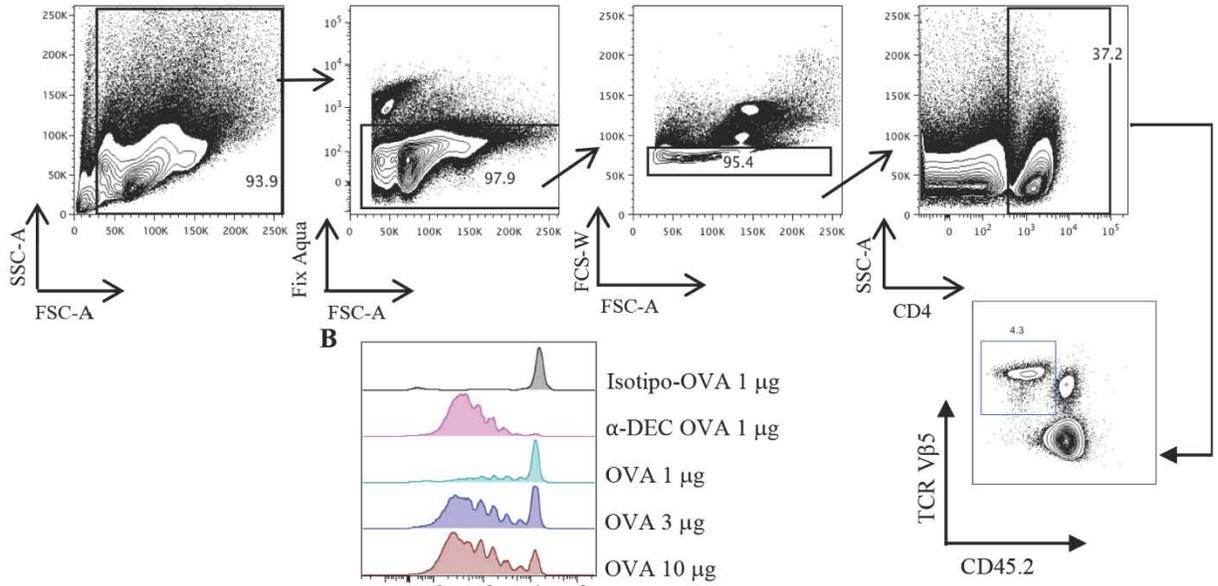
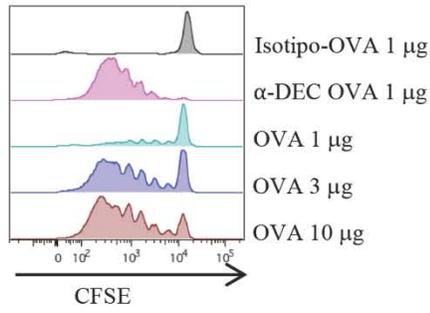
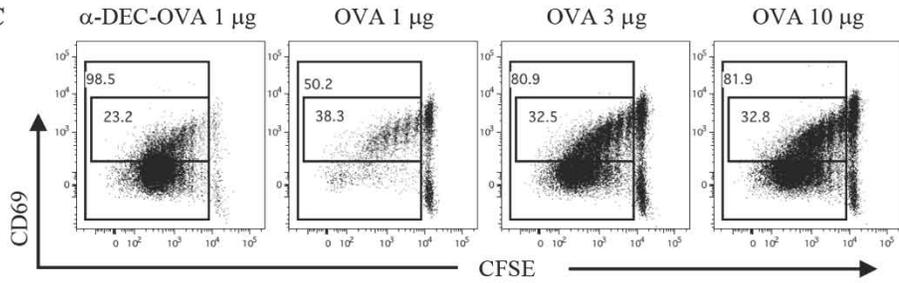
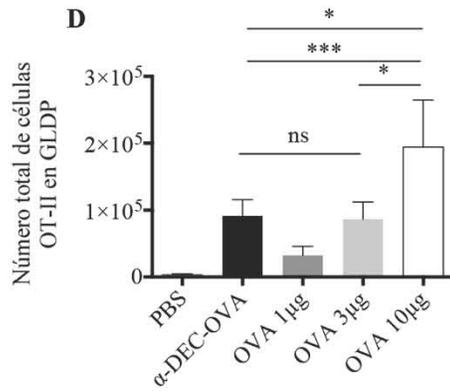
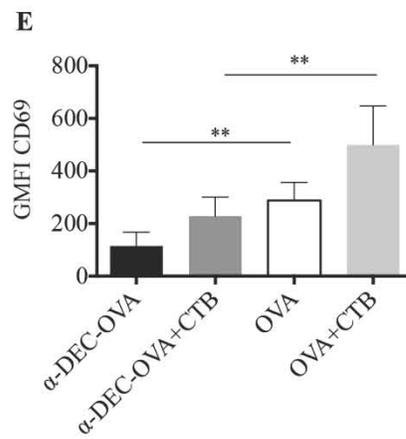
Para poder estudiar el desarrollo de respuestas de linfocitos T CD4+ antígeno específicos utilizamos al Ag modelo OVA, direccionado a DCs con un anticuerpo anti-DEC205-OVA o de manera soluble. Los Ags fueron administrados vía i.d. a ratones C57BL6 previamente transferidos con linfocitos OT-II CD45.1+, los cuales expresan un TCR transgénico que reconoce el péptido de OVA 233-339 presentado en moléculas del MHC-II. Las células transferidas fueron identificadas como TCR Vβ 5.1, 5.2+CD45.2-CD4+ (Fig. 4A). De manera similar a lo reportado en la literatura, la eficiencia de la presentación de Ag fue al menos 20 veces superior por el direccionamiento a DCs inoculando 1 µg de anti-DEC205-OVA, en comparación con la administración de 20 µg de OVA soluble (Fig. 4B).

Adicionalmente a la proliferación, determinamos también la expresión de CD69 como marcador de activación, el cual es rápidamente expresado después de la estimulación del TCR, pero su expresión decae a medida que las células entran en proliferación (103,104). En efecto, observamos una profunda desregulación de CD69 en las células que experimentaron más rondas de proliferación, por lo que este efecto fue más pronunciado en las células de los ratones inoculados con anti-DEC205-OVA (Fig. 4C). De manera interesante, la coadministración de CTB con OVA soluble indujo mayor expresión de CD69, pero no así en combinación con anti-DEC205-OVA (Fig. 4E). Se ha reportado que la expresión de CD69 promueve la retención de los linfocitos T en el ganglio linfático; mientras que su des-regulación permite a las células migrar hacia tejidos periféricos (103,104). Tres días después de la inmunización con 3 µg de OVA soluble o con 1 µg de anti-DEC205-OVA observamos números similares de linfocitos T OVA-específicos en los SDLN (Fig. 4D). Lo cual, en conjunto con la expresión diferencial de CD69, sugiere

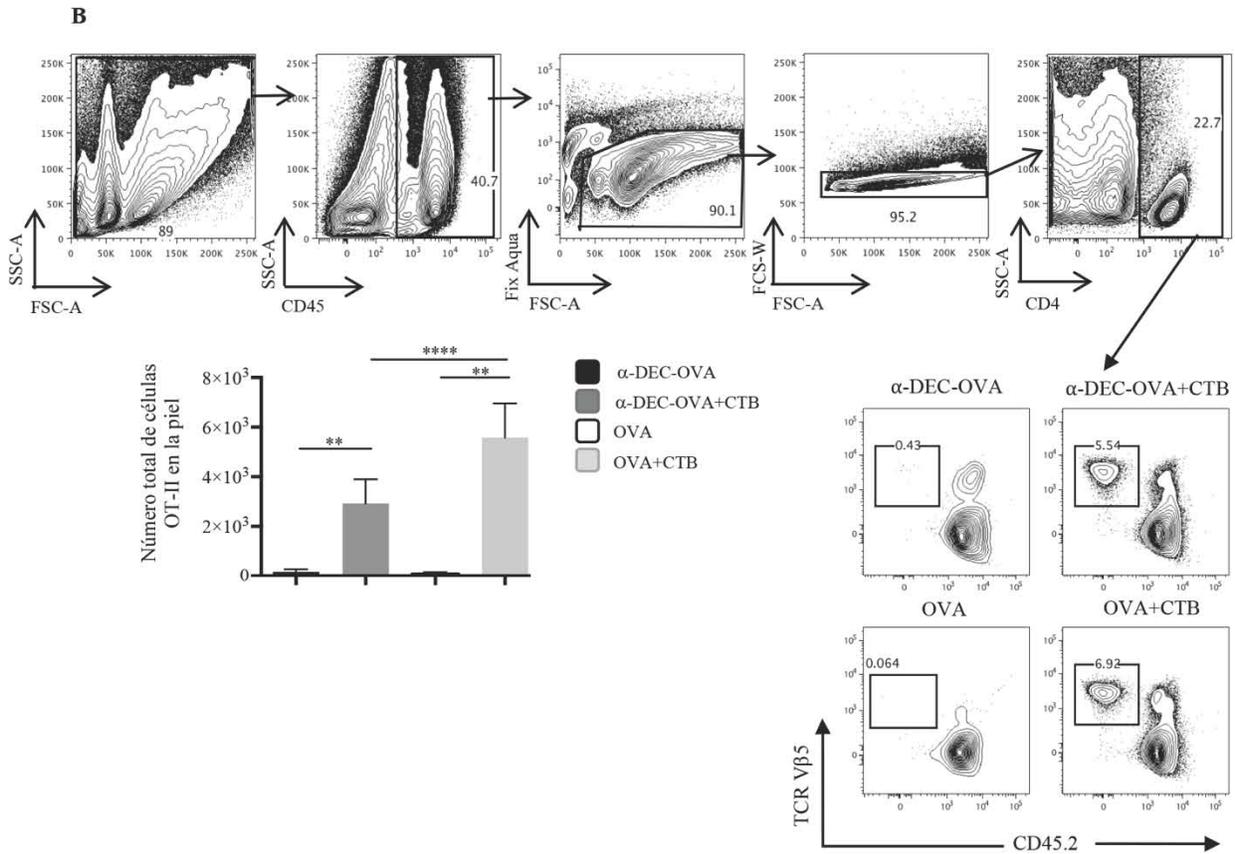
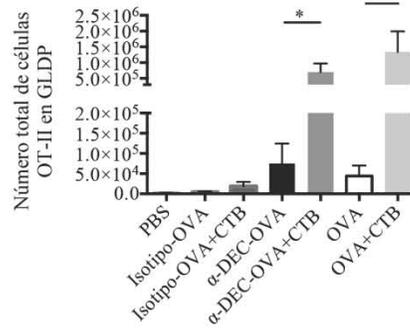
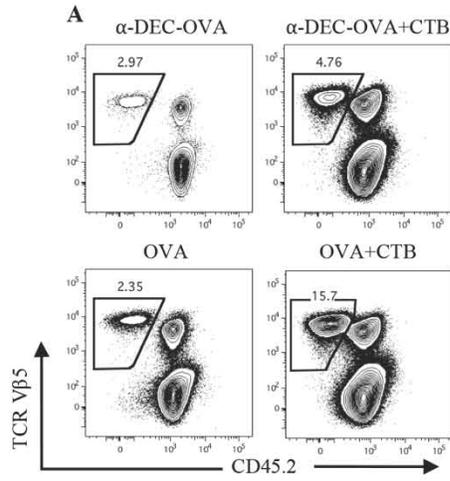
que los linfocitos T activados por el Ag soluble se acumularían en los ganglios de drenaje, mientras que aquellos activados por direccionamiento a DCs saldrían preferentemente a periferia, de manera similar a lo reportado por otras publicaciones (24,55), dejando un menor número de células en ganglios de drenaje.

De manera interesante, la coadministración de CTB con los Ags promovió la expansión de linfocitos T CD4+ siete días posteriores a la inoculación (Fig. 5A). En el caso del direccionamiento a DCs, la expansión fue dependiente de la captura del antígeno específicamente por DCs DEC205+, dado que la administración de un anticuerpo control sin especificidad por DCs conjugado a OVA, en presencia o ausencia de CTB, no promovió la expansión de los linfocitos T (Fig. 5A). La coadministración de CTB con OVA soluble indujo mayor acumulación de linfocitos OT-II en los SDLN, en comparación con el grupo administrado con anti-DEC205-OVA+CTB (Fig. 5A), de manera consistente con la alta expresión de CD69. Igualmente, después de siete días, pudimos observar un gran infiltrado en piel de linfocitos OVA-específicos, el cual fue inducido por la coadministración de CTB y no por el Ag sin adyuvante (Fig. 5B). De manera interesante, se observaron mayores números de células en la piel de los ratones inmunizados con OVA soluble en conjunto con CTB, en comparación con el grupo que recibió anti-DEC205-OVA+CTB.

En conjunto, nuestros datos demuestran que la CTB puede ser utilizada como un fuerte adyuvante para Ags direccionados a DCs o solubles; promoviendo la expansión de linfocitos T CD4+ antígeno específicos en SDLN, así como su eficiente migración al sitio de inoculación. Importantemente, nuestros resultados sugieren que la administración de Ags direccionados a DCs induce un estado de activación diferencial de los linfocitos T CD4+, en comparación con el inducido por Ags solubles, el cual impactaría su diferenciación y, posiblemente, su localización anatómica.

**A****B****C****D****E**

**Figura 4.** Activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> inducida por un Ag direccionado a DCs o soluble. Ratones C57BL6 recibieron vía i.v. linfocitos OT-II CD45.1<sup>+</sup> marcados con CFSE, 24 h después fueron administrados vía i.d. con anti-DEC205-OVA, el control de isotipo o 1, 3 o 10 µg de OVA soluble. Después de tres días fueron sacrificados para obtener suspensiones celulares de los SDLN y análisis por citometría de flujo. (A) Estrategia de análisis para identificar a las células transferidas como células viables CD4<sup>+</sup>CD45.2-TCRVβ 5.1, 5.2<sup>+</sup> (B) Dilución de la CFSE en las células transferidas. (C) Expresión de CD69 en las células proliferantes. (D) Números totales de las células transferidas encontradas en los SDLN después de la administración de los Ags. (E) GMFI de CD69 en las células transferidas encontradas en los SDLN después de la inmunización con anti-DEC205-OVA (1 µg) ± CTB (10 µg) o con OVA (3 µg) ± CTB (10 µg). Media ± SD, N= 4-6, datos agrupados de cuatro experimentos independientes. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Turkey (ns, P > 0.05, \*P < 0.05, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.0005).



**Figura 5.** La co-administración de CTB con un Ag direccionado a DCs o soluble induce la expansión de linfocitos TCD4<sup>+</sup> y su migración a piel. Ratones C57BL6 recibieron vía i.v. linfocitos OT-II CD45.1<sup>+</sup>, 24 h después fueron administrados vía i.d. anti-DEC205-OVA (1 µg) ± CTB (10 µg), OVA (3 µg) ± CTB (10 µg) o como se indica en las legendas. Después de siete días fueron sacrificados para obtener suspensiones celulares de los SDLN y de la piel de las orejas para su análisis por citometría de flujo. (A) Imagen representativa y gráfica de números totales de las células OT-II CD45.1<sup>+</sup> de los SDLN (identificadas como en la fig. 4A). Media ± SD, N= 5-8, datos agrupados de cuatro experimentos independientes. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Turkey (\*P < 0.05, \*\*\*\*P < 0.0001) (B) Estrategia de análisis para identificar en la piel a los linfocitos transferidos como células viables CD4<sup>+</sup>CD45.2-TCRVβ 5.1, 5.2<sup>+</sup> y gráfica de los números totales Media ± SD, N= 4-6, datos agrupados de cuatro experimentos independientes. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Turkey (\*\*P < 0.005, \*\*\*\*P < 0.0001).

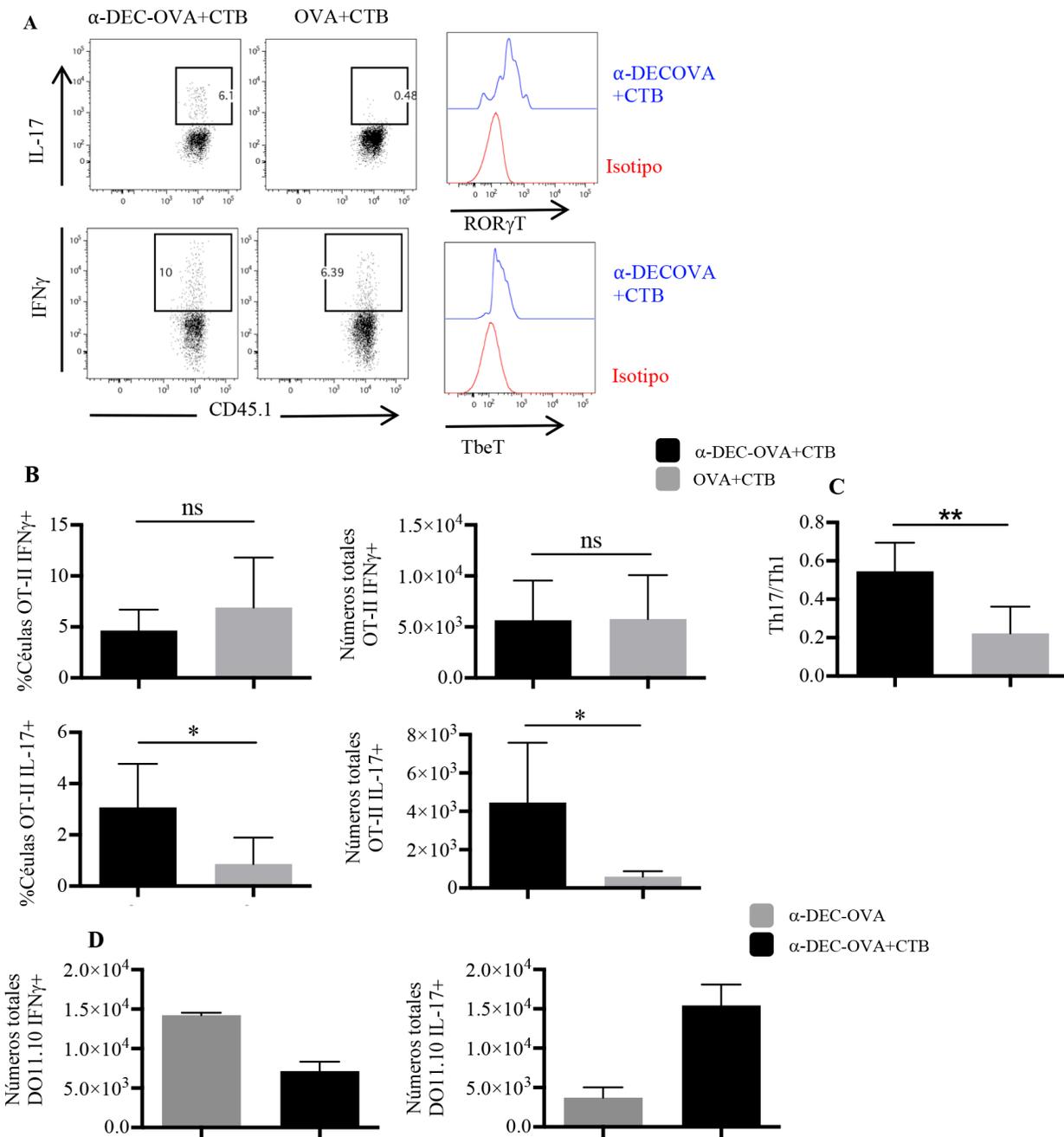
3. *CTB promueve una respuesta Th1/Th17 cuando es coadministrado con antígeno direccionado a DCs*

A continuación, nos preguntamos si CTB, en combinación con un Ag direccionado a DCs o soluble, puede promover la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en linfocitos Th1 o Th17. Siete días post- inmunización, observamos en los SDLN la presencia de células Ag-específicas IFNγ<sup>+</sup> inducidas por la administración i.d. del Ag-direccionado a DCs o soluble (Fig. 6A y 6B). De manera interesante, la inmunización por direccionamiento de Ag a DCs indujo un mayor porcentaje y números totales de linfocitos Ag-específicos IL-17<sup>+</sup> (Fig. 6A, B y C). La diferenciación de linfocitos Th1 y Th17 por direccionamiento de Ag a DCs DEC205<sup>+</sup> en combinación con CTB fue confirmada en el modelo DO11.0 (Fig. 6D), el cual en otros modelos muestra tendencia a respuestas tipo Th2 y T reg. También demostramos la co-expresión de los factores de transcripción T-bet y RORγt en las células productoras de IFNγ e IL-17, respectivamente (Fig. 6A). Por lo tanto, la inmunización vía i.d. por direccionamiento de Ag a DCs, en conjunto con CTB, induce una respuesta combinada Th1/Th17 en los SDLN, mientras que la inmunización con el Ag soluble más CTB induce principalmente respuestas tipo Th1 (Fig. 6 C).

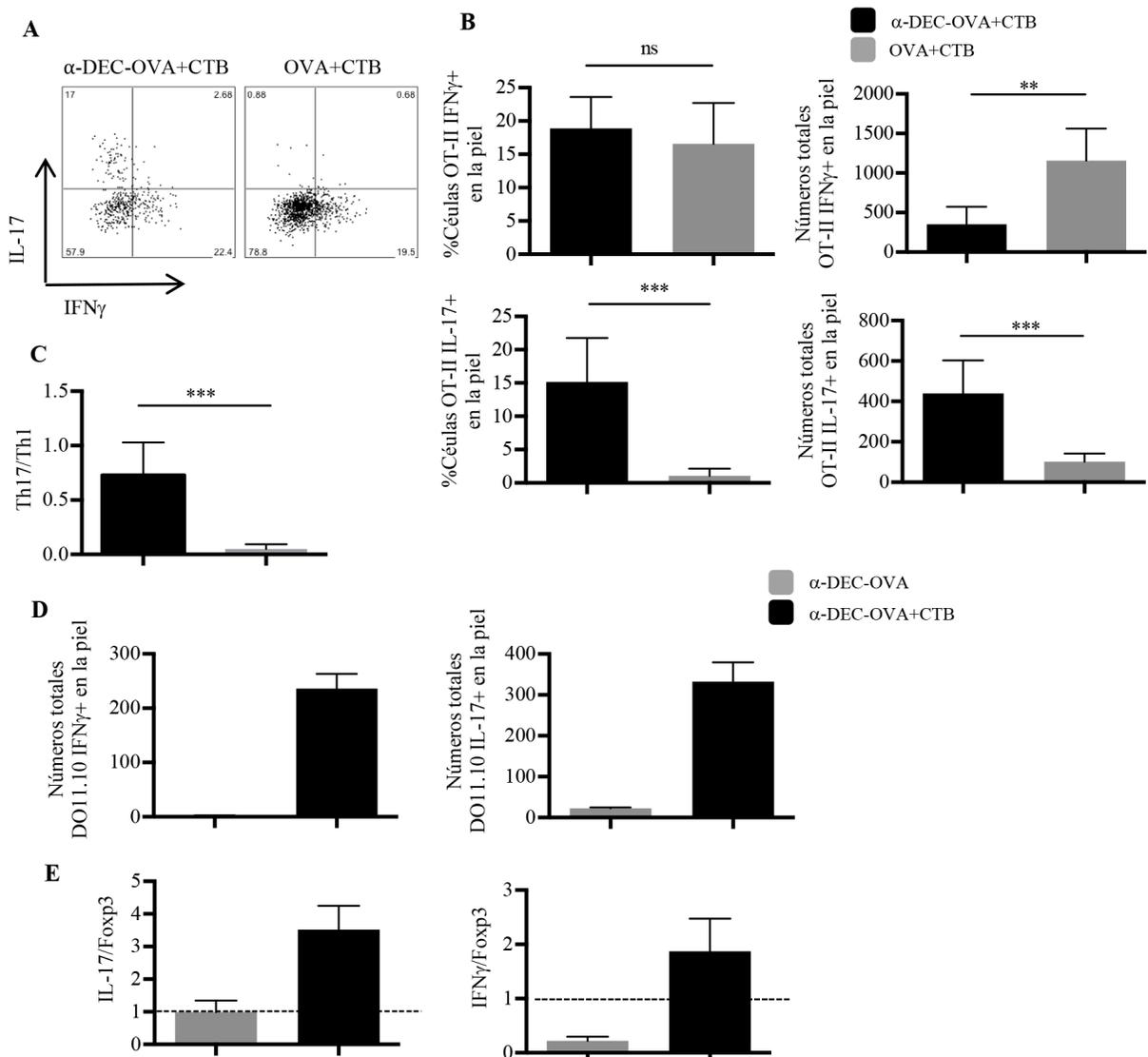
Después analizamos también a los linfocitos T infiltrantes de la piel. La inmunización con anti-DEC205-OVA u OVA soluble, en conjunto con CTB, promovió porcentajes similares de células Th1 (Fig. 7A y 7B). Sin embargo, y de manera consistente a lo observa en ganglios, el direccionamiento de Ag a DCs DEC205<sup>+</sup> indujo mayor frecuencia y números totales de células Th17, en comparación con la inmunización con el Ag soluble (Fig. 7A, B y C). La inducción de una respuesta combinada Th1/Th17 por direccionamiento a DCs fue confirmada calculando la proporción de células Th1/Th17 (Fig. 7C). De manera similar, el direccionamiento de antígeno a DCs en conjunto con CTB promovió una fuerte

infiltración de linfocitos Th17 en la piel en el modelo DO11.10 (Fig. 7D) acompañada, interesantemente, de una baja proporción de linfocitos T reguladores Foxp3+ (Fig. 7E).

En conjunto, nuestros resultados demuestran que CTB en combinación con Ags direccionado a DCs DEC205+ promueve una respuesta combinada tipo Th17/Th1, mientras que la inmunización utilizando el antígeno soluble promueve una respuesta predominantemente Th1.



**Figura 6.** Activación diferencial en ganglio de linfocitos Th1/Th17 después de la co-administración de CTB con un Ag direccionado a DCs o soluble. Ratones C57BL6 fueron tratados como en la Fig. 5 y después de siete días fueron sacrificados para obtener suspensiones celulares de los SDLN y re-estimularlas *in vitro* por 48 h con OVA 323-339, seguido de 4 h de incubación con cocktail de estimulación + inhibidor de transporte de proteínas y tinción intracelular para análisis por citometría de flujo. (A) Imagen representativa de la expresión de IFN $\gamma$ , IL17, Roryt y Tbet en linfocitos viables OT-II CD45.1+. (B) Gráficas de porcentajes y números totales de linfocitos OT-II CD45.1+ IFN $\gamma$ + o IL-17+. (C) Relación de linfocitos Th1/Th17. Media  $\pm$  SD, N= 6-8, datos agrupados de dos experimentos independientes. Prueba t de Student no pareada (ns, P > 0.05, \*P < 0.05, \*\* P < 0.005). (D) Ratones BALB/c recibieron vía i.v. células DO11.10 Thy1.1+, después de 24 fueron inmunizados vía i.d. con anti-DEC205-OVA (1  $\mu$ g)  $\pm$  CTB (10  $\mu$ g) y sacrificados después de siete días para obtener suspensiones celulares de los SDLN y re-estimularlas *in vitro* como en el inciso A. Números totales de linfocitos DO11.10 IFN $\gamma$ + o IL-17+. Media  $\pm$  SD, N= 2-3, datos representativos de un experimento.



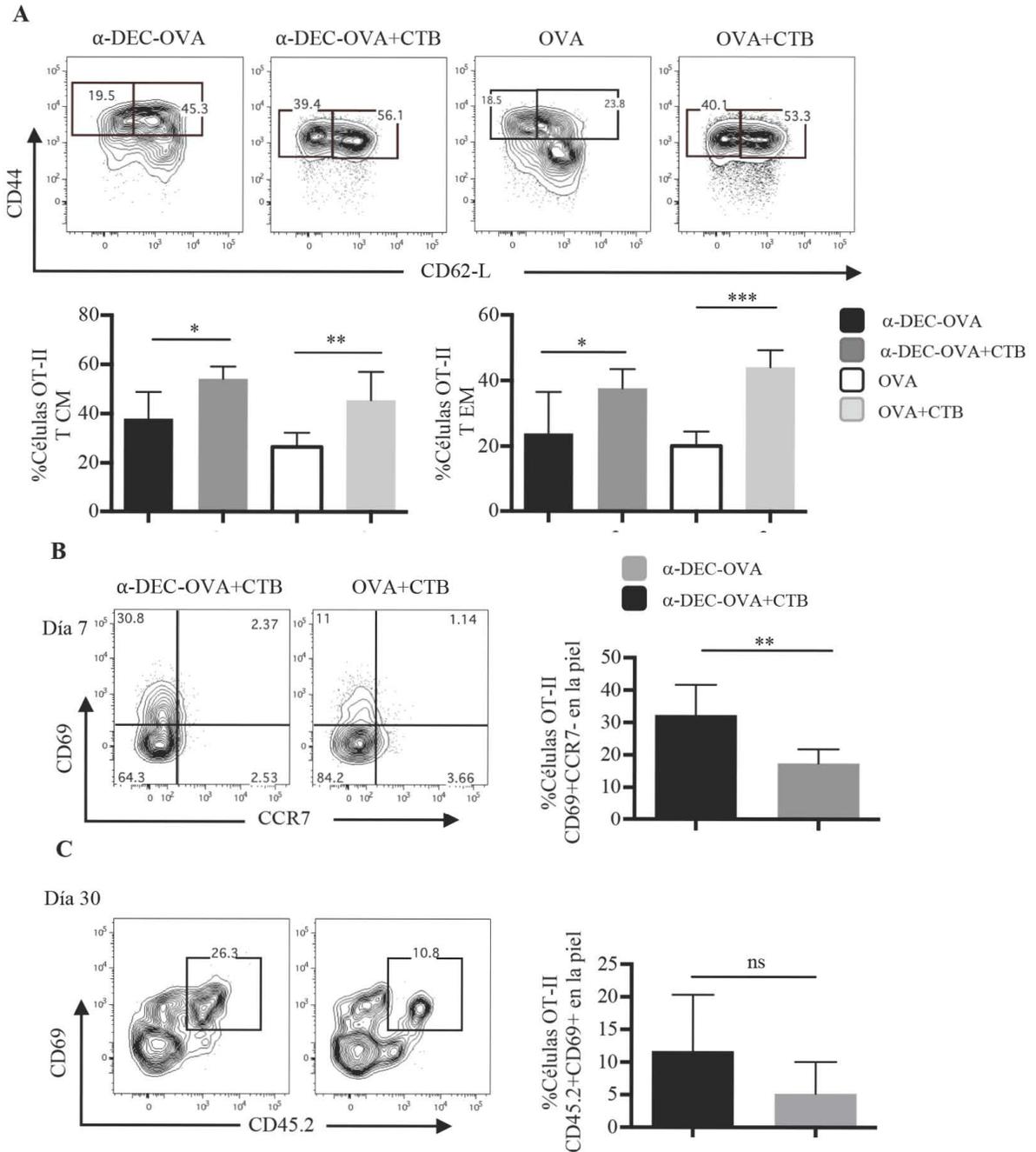
**Figura 7.** La co-administración de CTB con un Ag direccionado a DCs induce migración a piel de linfocitos Th1 y Th17. Ratones C57BL6 fueron tratados como en la Fig. 5 y después de siete días fueron sacrificados para obtener suspensiones celulares de la piel de las orejas y re-estimularlas *in vitro* por 4 h de incubación con cocktail de estimulación + inhibidor de transporte de proteínas, seguido por tinción intracelular para análisis por citometría de flujo. (A) Imagen representativa de la expresión de IFN $\gamma$  e IL-17 en linfocitos OT-II CD45.1+. (B) Gráficas de porcentajes y números totales de linfocitos OT-II CD45.1+ IFN $\gamma$ + o IL-17+. (C) Relación de linfocitos Th1/Th17. Media  $\pm$  SD, N=6-8, datos agrupados de tres experimentos independientes. Prueba t de Student no pareada (ns, P > 0.05, \*\* P < 0.005, \*\*\* P = 0.0001). (D) Ratones BALB/c fueron tratados como en la fig. 6D. Después de siete o 14 días fueron sacrificados para obtener suspensiones celulares de la piel de las orejas y re-estimularlas *in vitro* por 4 h de incubación con cocktail de estimulación + inhibidor de transporte de proteínas, seguido por tinción intracelular para análisis por citometría de flujo. Números totales de linfocitos DO11.10 IFN $\gamma$ + o IL-17+. (E) Relación de células DO11.10 productoras de citocinas/Foxp3+. Media  $\pm$  SD, N= 2-3, datos representativos de un experimento.

#### 4. El direccionamiento de antígeno a DCs en conjunto con CTB promueve la diferenciación de linfocitos T RM CD4+ en la piel

Nuestro siguiente objetivo fue describir el tipo de respuesta de memoria inducido tras la inmunización con antígeno direccionado a DCs o antígeno soluble en combinación con CTB. En primer lugar, caracterizamos la respuesta de linfocitos T circulantes y re- circulantes de memoria en los SDLN de ratones inmunizados. Los linfocitos T CD4+ fueron clasificados como células de memoria central (T CM) o de memoria efectora (T EM) de acuerdo con la expresión de CD44 y CD62L. Observamos que la coadministración de CTB promueve la diferenciación tanto de linfocitos antígeno específicos T CM como T EM, en combinación con el antígeno a direccionado o soluble (Fig. 8A).

Después, estudiamos la diferenciación de linfocitos T RM CD4+ después de la inmunización. Las células T RM fueron identificadas como células OVA-específicas CD69+CCR7-. Durante la etapa efectora, una fracción de las células que migran a órganos no linfoides adquiere la expresión de CD69 (105), la cual puede dar lugar a una población más pequeña de células T RM de larga vida (76). En efecto, siete días post- inmunización encontramos en la piel de ratones inmunizados con anti-DEC205-OVA+CTB ~30% de células OT-II CD69+CCR7-, pero de manera sorpresiva, únicamente ~15% tras la inmunización con el antígeno soluble (Fig. 8B). Además, 30 días post- inmunización, la mayoría de las células OVA-específicas CD4+ de la piel de ratones inmunizados con antígeno direccionado fueron CD69+ (Fig. 8C). Interesantemente, el direccionamiento a DCs fue más eficiente en la inducción de linfocitos T RM, aún en comparación con una alta dosis del antígeno soluble.

En conjunto, nuestros datos muestran que la CTB puede ser usada para incrementar la diferenciación de linfocitos T CD4+ de memoria central y efectora, y que su combinación con direccionamiento de antígeno a DCs promueve eficientemente la diferenciación de linfocitos T RM CD4+.

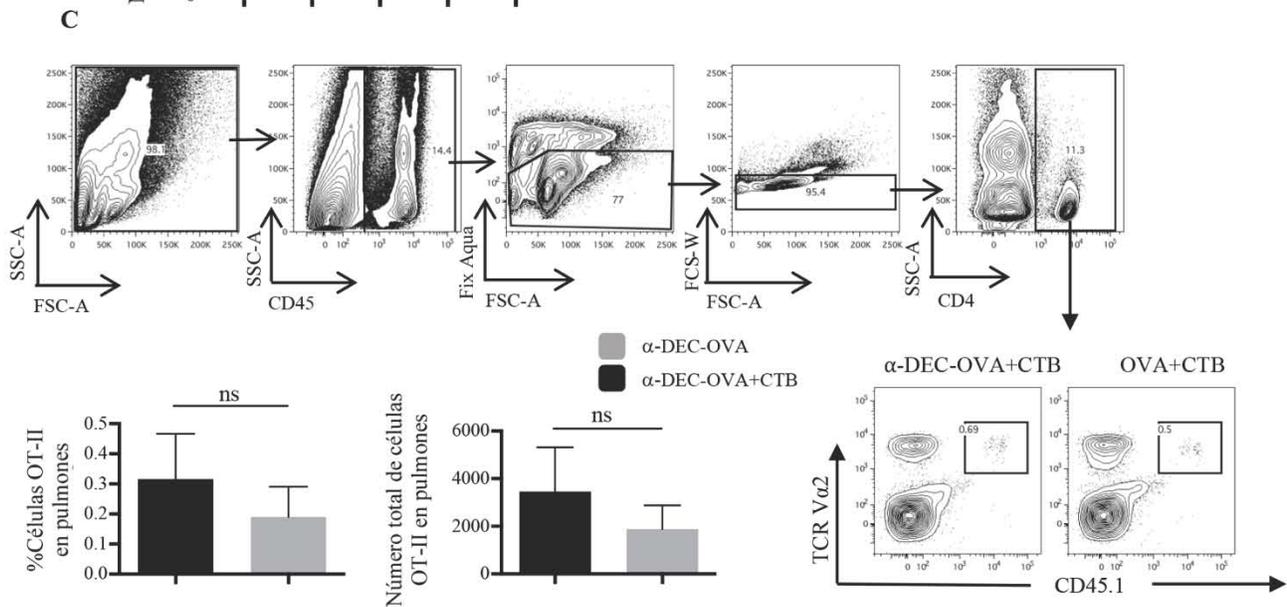
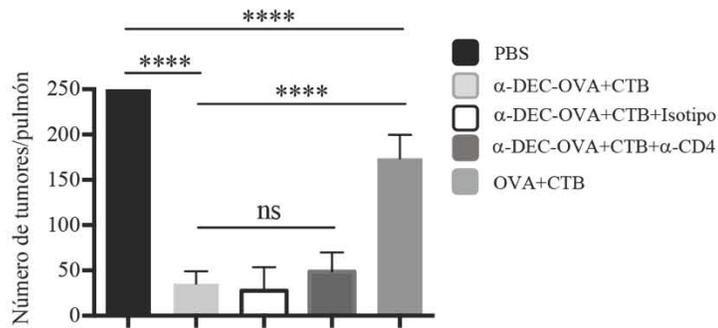
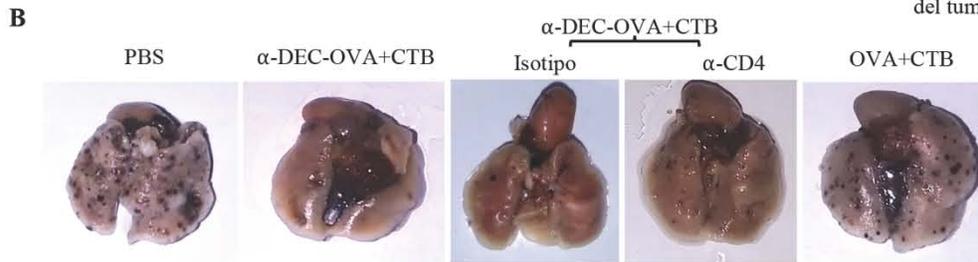
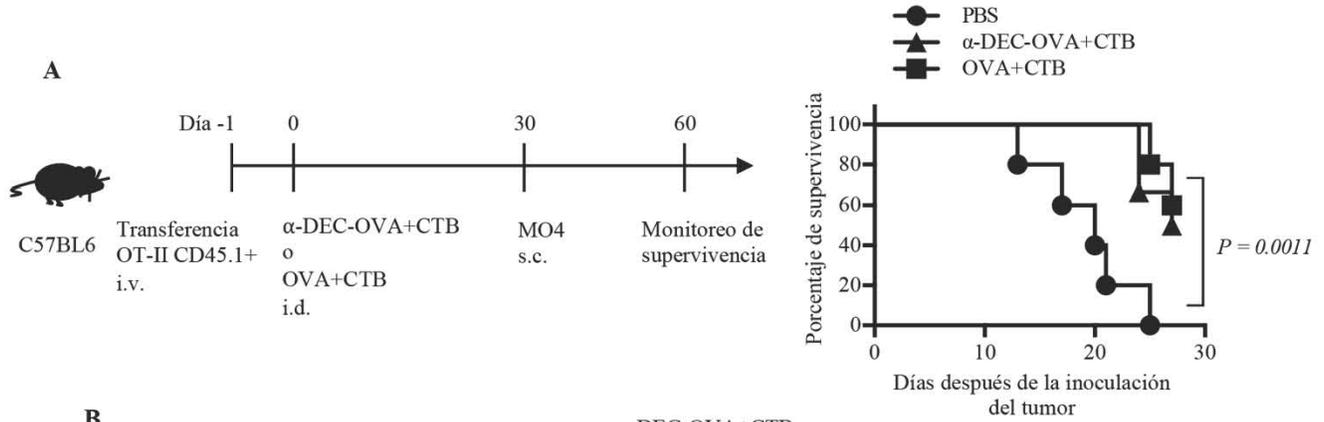


**Figura 8.** La co-administración de CTB con un Ag direccionado a DCs induce linfocitos T EM, T CM y T RM. Ratones C57BL6 fueron tratados como en la Fig. 5 y después de siete o 30 días fueron sacrificados para obtener suspensiones celulares de los SDLN y de la piel de las orejas. (A) Imagen representativa y gráfica de porcentajes de los linfocitos OT-II CD45.1 T EM (CD44+CD62L-) y T CM (CD44+CD62L+) en los SDLN siete días después de la inmunización. Media  $\pm$  SD, N=4-6, datos agrupados de dos experimentos independientes. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Turkey (\*P < 0.05, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.0005). (B) Imagen representativa y gráfica de porcentajes de linfocitos de la piel OT-II CD45.1+ CD69+CCR7- siete días después de la inmunización (Media  $\pm$  SD, N=5-6, datos agrupados de tres experimentos independientes. Prueba t de Student no pareada, \*\*P < 0.005 o (C) 30 días después de la inmunización con anti-DEC205-OVA (1  $\mu$ g) + CTB (10  $\mu$ g) o con OVA (30  $\mu$ g) + CTB (10  $\mu$ g). Media  $\pm$  SD, N=3-5, datos agrupados de dos experimentos independientes. Prueba t de Student no pareada (ns, P > 0.05).

5. *La inmunización intradérmica de antígeno direccionado a DCs en conjunto con CTB promueve inmunidad local y sistémica de larga duración*

Después de documentar la respuesta de linfocitos T CD4+ promovida por la administración i.d. de CTB, en conjunto con antígeno direccionado a DCs o soluble, nos preguntamos, en primer lugar, si esta estrategia de inmunización podría proveer inmunidad local de largo plazo. Para contestar a esta pregunta, primero utilizamos el modelo de melanoma-OVA subcutáneo (Fig. 9A). Observamos que un mes post-inmunización, tanto el antígeno direccionado a DCs como soluble, y utilizando a la CTB como adyuvante, provee inmunidad local tras el reto subcutáneo con la línea de melanoma-OVA MO4 (Fig. 9A).

Posteriormente, nos preguntamos si la coadministración de CTB con el Ag direccionado a DCs puede inducir inmunidad sistémica. Para contestar a esta pregunta, se inmunizaron ratones vía i.d. y un mes después fueron retados vía i.v. con células MO4. Los ratones inmunizados con OVA direccionada a DCs desarrollaron ~5 veces menos nódulos metastásicos que los ratones control; así como un menor número de tumores (~3 veces menos) que los ratones inmunizados con el antígeno soluble (Fig. 9B). Asimismo, la inmunización vía direccionamiento de Ag a DCs indujo la infiltración de linfocitos T CD4+ Ag-específicos en los pulmones, en cantidad ligeramente superior a la inducida por el Ag soluble (Fig. 9C). Sin embargo, la administración de un anticuerpo anti-CD4 30 días después de la inmunización, y previo al reto i.v. con células MO4, no afectó el desarrollo de inmunidad protectora contra melanoma (Fig. 9B). No obstante, nuestros resultados demuestran que la administración de una dosis única de CTB coadministrado con Ag direccionado a DCs puede proveer inmunidad local y sistémica e, importantemente, la infiltración de linfocitos T CD4+ en tejidos distales.



**Figura 9.** La inmunización i.d. con CTB en conjunto con un Ag direccionado a DCs induce inmunidad duradera local y sistémica contra melanoma. (A) Diagrama de la estrategia de inmunizaciones y reto s.c. con células MO4-OVA. Gráfica de supervivencia de los ratones inmunizados después del reto con melanoma s.c. N= 5 por grupo, datos agrupados de dos experimentos independientes. Prueba de Log-rank (Mantel-Cox). Ratones naive fueron inmunizados como se indica y 30 días después fueron retados vía i.v. con células MO4-OVA. Algunos de los ratones inmunizados con anti-DEC205-OVA+CTB recibieron vía i.p. anti-CD4 o el control de isotipo, antes, durante y después del reto con melanoma. (B) Fotografías representativas de los pulmones y gráfica del número de tumores/pulmón 16 días después del reto. Media  $\pm$  SD, N= 5-10, datos agrupados de dos experimentos independientes. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Turkey (ns,  $P > 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). (C). Estrategia de análisis para la identificación en pulmón de células OT-II como células viables CD45+CD4+CD45.1+TCR  $V\alpha 2+$  siete días después de la inmunización con anti-DEC205-OVA+CTB o con OVA+CTB, en ratones previamente transferidos con linfocitos OT-II CD45.1+. Media  $\pm$  SD, N=5 por grupo, datos agrupados de dos experimentos independientes. Prueba t de Student no pareada (ns,  $P > 0.05$ ).

6. *La inmunización por direccionamiento de Ags a DCs induce infiltración de linfocitos T CD4+ polifuncionales en intestino y provee protección dependiente de linfocitos T CD4+ contra rotavirus*

A continuación, nos preguntamos si la coadministración de CTB con Ag-direccionado a DCs podría inducir la infiltración de linfocitos T CD4+ en otros tejidos periféricos como el intestino. En efecto, pudimos observar en este órgano la presencia de linfocitos T CD4+ Ag-específicos (Fig. 10A). A pesar de tratarse de un bajo número de células, el direccionamiento de Ag a DCs indujo una infiltración significativamente mayor al Ag soluble (Fig. 10B). Asimismo, se pudo observar un mayor número de células expresando CD69, el marcador fenotípico de los linfocitos T RM, en el intestino de los ratones inmunizados vía direccionamiento de Ag a DCs (Fig. 10C).

Para determinar si la inmunización i.d. vía direccionamiento de Ags a DCs puede proveer inmunidad protectora en el intestino, utilizamos un modelo de infección por rotavirus, en donde la protección depende principalmente de linfocitos T CD4+ (89,44). Además, la infección murina por el rotavirus esta limitada casi exclusivamente al intestino, por lo que la respuesta inmune resulta altamente localizada (87). Para inducir una respuesta Ag específica utilizamos a la proteína VP6 conjugada a un anticuerpo anti-DEC205. VP6 es un antígeno altamente conservado entre las diferentes cepas de rotavirus (88) y se ha demostrado que cuando es direccionado a DCs, en conjunto con poly I:C, puede inducir inmunidad protectora (35). A los ratones se les administró vía i.d. anti-DEC205-VP6+CTB o VP6 soluble + CTB, 20 días antes del reto oral con rotavirus. Únicamente los ratones inmunizados con anti-DEC205-VP6+CTB desarrollaron

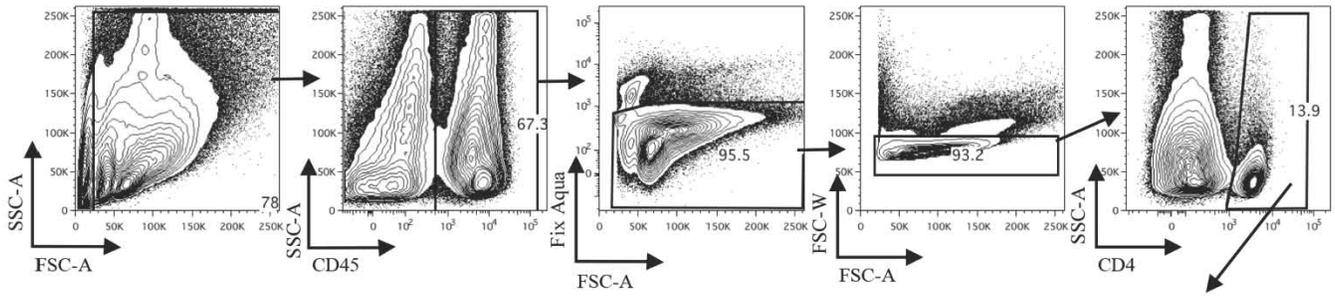
protección parcial contra el reto (~10%), a diferencia de los ratones inmunizados con el Ag soluble (Fig. 10D). Por lo cual, nuestros resultados demuestran que la inmunización vía i.d. de Ag direccionado a DCs en conjunto con CTB, utilizando una dosis única, promueve protección parcial en intestino.

El desarrollo de protección parcial podría ser debido a la baja infiltración de linfocitos Ag-específicos en intestino. En consecuencia, nos propusimos evaluar si una estrategia de inmunización/refuerzo podría expandir a las clonas encontradas en intestino. Para tal fin, los ratones fueron inmunizados vía i.d. con el Ag direccionado a DCs o soluble en conjunto con CTB. Después de 15 días, recibieron vía i.p. al Ag direccionado o soluble sin el adyuvante. Luego de cinco días, observamos un gran número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Ag-específicos en intestino del grupo que recibió al Ag direccionado (Fig. 11A). De manera importante, el esquema de inmunización/refuerzo con el Ag direccionado indujo también la expansión de linfocitos T CD4<sup>+</sup> IL17<sup>+</sup>, así como de células con la capacidad de producir más de una citocina, incluyendo IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , en contraste con la inmunización/refuerzo utilizando al Ag soluble (Fig. 11B).

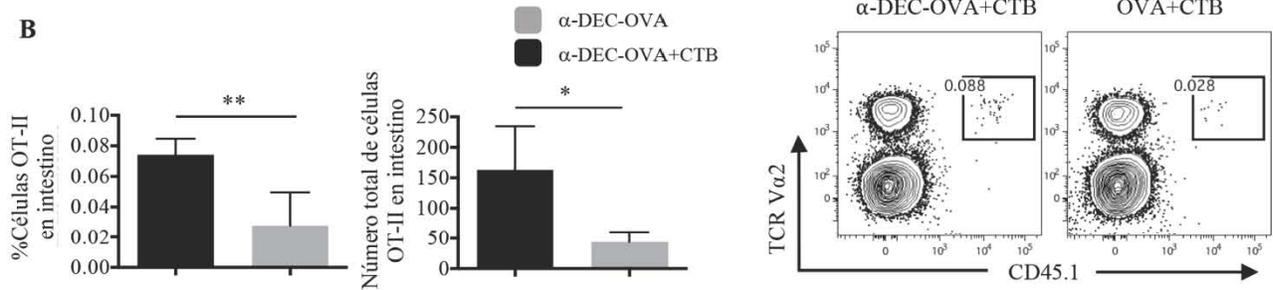
Los resultados anteriores nos alentaron a determinar si la estrategia de inmunización/refuerzo podría incrementar el nivel de protección contra el rotavirus. Con este fin, los ratones recibieron vía i.d. anti-DEC205-VP6 o VP6 soluble; después de 15 días recibieron vía i.p. al Ag direccionado a soluble sin adyuvante. Luego de siete días, los ratones fueron retados vía oral con el rotavirus (Fig. 11C). La carga viral en las heces fecales disminuyó rápidamente después de la inmunización/refuerzo vía direccionamiento de Ag (Fig. 11D). Lo cual significó un porcentaje de protección del 60% relativo a los ratones no inmunizados (Fig. 11E). Cabe destacar que el desarrollo de protección dependió del direccionamiento del Ag a las DCs DEC205<sup>+</sup>, dado que la administración de un anticuerpo sin especificidad por DCs conjugado a VP6, y en presencia de CTB, indujo un bajo nivel de protección (~15%). De manera notable, la protección se vio significativamente disminuida por la administración de un anticuerpo anti-CD4. Por otra parte, la inmunización/refuerzo utilizando al Ag soluble indujo un bajo nivel de protección (~15%) (Fig. 11E).

En conjunto, nuestros resultados muestran que la administración vía i.d. de Ags direccionados a DCs, en combinación con CTB, induce la infiltración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> polifuncionales en intestino, así como el desarrollo de inmunidad protectora de largo plazo contra patógenos intestinales, la cual es dependiente de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

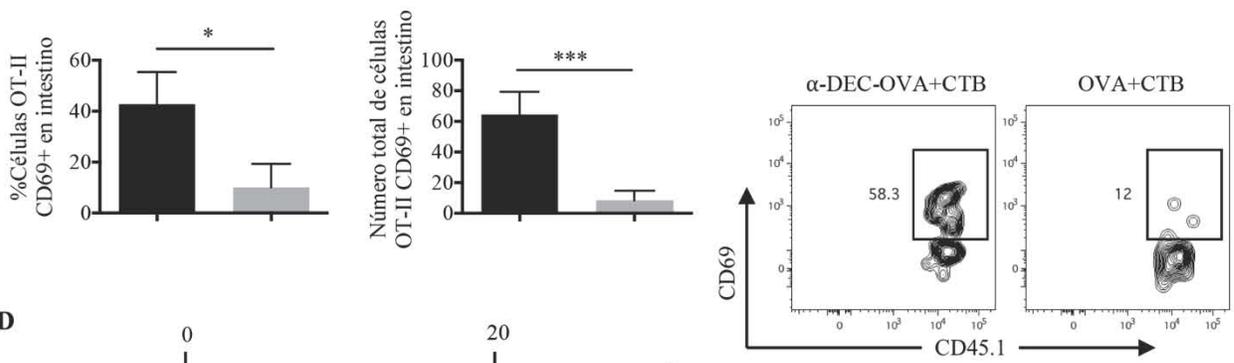
**A**



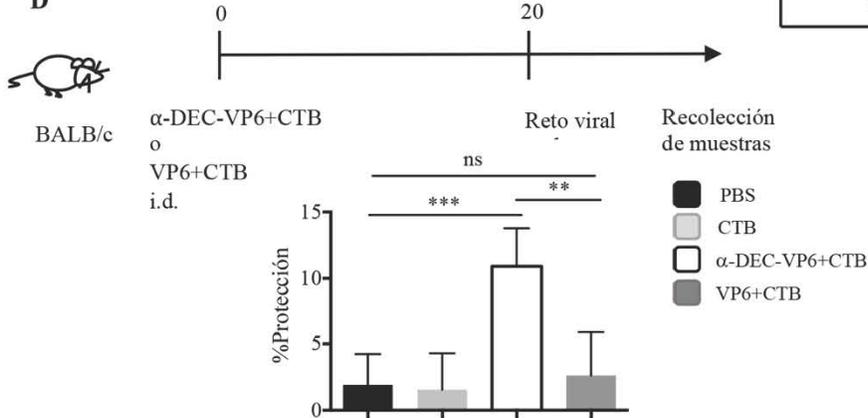
**B**



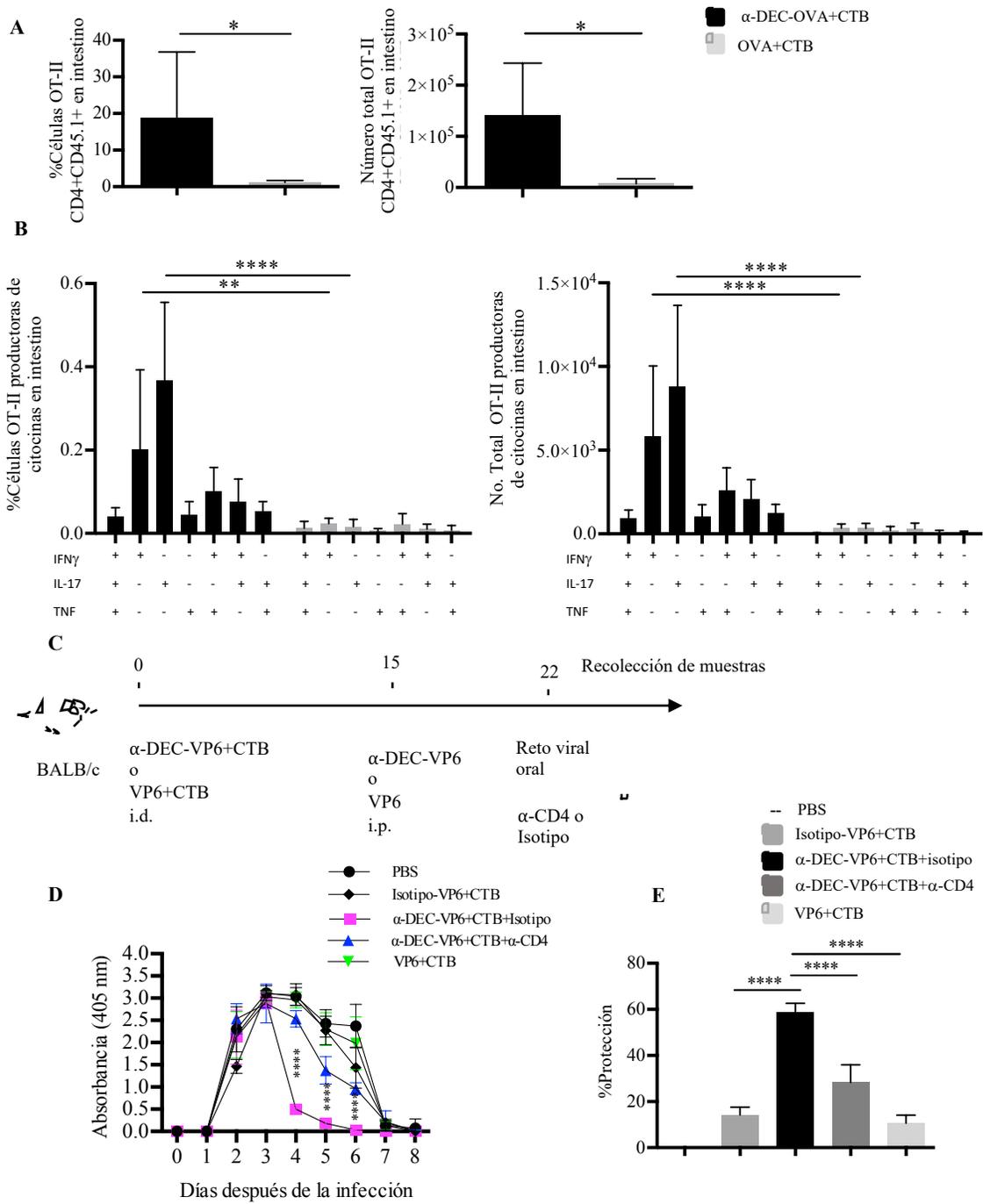
**C**



**D**



**Figura 10.** Una dosis de CTB en conjunto con Ags direccionados a DCs induce la infiltración en intestino de linfocitos T CD4+ Ag específicos y protección parcial contra rotavirus. Ratones C57BL6 fueron tratados como en la Fig. 5 y después de siete días fueron sacrificados para obtener suspensiones celulares de intestino y ser analizadas por citometría de flujo. (A) los linfocitos OT-II transferidos fueron identificados como células viables CD45+CD4+TCRV $\alpha$ 2+CD45.1+. (B) Gráficas de porcentaje y números totales de células OT-II CD45.1+ en intestino. (C) Imagen representativa, porcentaje y números totales de células OT-II CD45.1+ CD69+ en intestino. Media  $\pm$  SD, N= 5 por grupo, datos agrupados de dos experimentos independientes. Prueba T de estudent no pareada (\*P < 0.05, \*\* P < 0.005). (D) Diagrama de la estrategia de inmunización y reto con rotavirus. Muestras de heces fecales fueron recolectadas diariamente después del reto por ocho días para determinar la carga viral por ELISA sandwich y el porcentaje de protección relativo al grupo control (PBS). Gráfica del porcentaje de protección después del reto. Media  $\pm$  SD, N= 5 por grupo, datos agrupados de dos experimentos independientes. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Turkey (ns, P > 0.05, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.0005).



**Figura 11.** La inmunización i.d./refuerzo i.p. con Ags direccionados a DCs+CTB induce linfocitos T CD4+ funcionales en intestino y protección dependiente de linfocitos T CD4+ contra rotavirus. Ratones C57BL6 recibieron vía i.v. linfocitos OT-II CD45.1+ 24 h antes de ser inmunizados vía i.d. con anti-DEC205-OVA u OVA soluble en conjunto con CTB. Después de 15 días recibieron vía i.p. anti-DEC205-OVA u OVA y después de cinco días fueron sacrificados para obtener suspensiones celulares de intestino, re-estimular *in vitro* por 4 h con cocktail de estimulación + inhibidor de transporte de proteínas y realizar tinción intracelular para análisis por citometría de flujo. (A) Las células OT-II transferidas fueron identificadas como células viables CD45+CD4+CD45.1+ para calcular los porcentajes y números totales. Media  $\pm$  SD, N= 6 por grupo, datos agrupados de dos experimentos independientes. Prueba T de estudent no pareada (\*P < 0.05). (B) Gráfica de porcentajes y números totales de células OT-II CD4+CD45.1+ productoras de citocinas. Las combinaciones booleanas fueron calculadas con el programa FlowJo. Media  $\pm$  SD, N= 6 por grupo, datos agrupados de dos experimentos independientes. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Bonferroni (\*\* P = 0.0017, \*\*\*\* P < 0.0001). (C) Estrategia de inmunizaciones y reto con rotavirus. Los ratones inmunizados con anti-DEC205-VP6+CTB recibieron vía i.p. anti-CD4 o el control de isotipo, antes, durante y después del reto. (D) Muestras de heces fecales fueron colectadas cada día durante ocho días después del reto para determinar la carga viral por ELISA sandwich. (E) Porcentaje de protección relativo al grupo control (PBS). Media  $\pm$  SD, N= 6 por grupo, datos agrupados de dos experimentos independientes. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Turkey (\*\*\*\*P < 0.0001).

7. *La coadministración de CTB con un patógeno inactivado promueve protección local y sistémica contra la infección en piel*

Nuestros resultados demuestran que la inmunización vía direccionamiento de Ags a DCs en conjunto con CTB induce inmunidad protectora sistémica, en tanto que la co-administración con Ag soluble induce una respuesta de linfocitos T CD4+ local. Además, los resultados en el modelo s.c. de melanoma sugieren que ésta respuesta podría mediar el desarrollo de protección inmune local. Por lo tanto, nos preguntamos si la administración i.d. de Ags derivados de patógenos, no conjugados a anticuerpos anti-DEC025, en conjunto con CTB podría inducir inmunidad contra la infección en piel. Para contestar a ésta pregunta utilizamos el modelo murino de infección en piel por el hongo *Sporothrix schenckii*. En éste modelo el patógeno vivo es inoculado vía i.d., ocasionado lesiones locales y, a dosis altas, diseminándose a través del organismo (97). Interesantemente, se ha demostrado que los conidios inactivados (IC) administrados por la vía i.d. son capturados directamente por DCs de la epidermis (97). Sin embargo, esto no es suficiente para inducir la activación de DCs, por lo que requiere de la coadministración de adyuvantes.

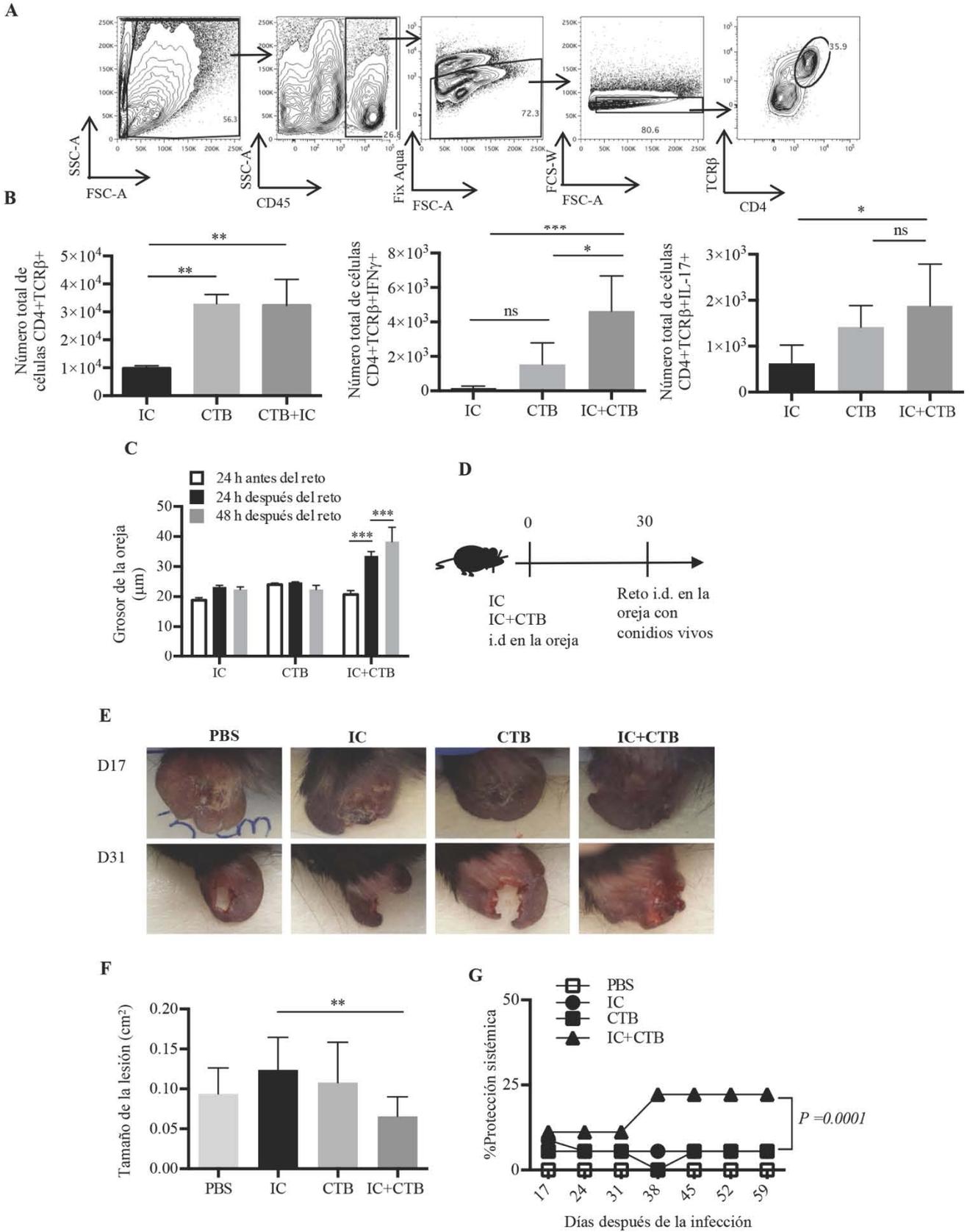
En primer lugar, nos preguntamos si la administración i.d. de IC+CTB induce la infiltración en piel de linfocitos Th1/Th17. La respuesta de linfocitos T CD4+ en piel fue analizada por citometría de flujo, como se muestra en la figura 12A. Observamos que la coadministración de CTB con IC promovió la infiltración de la piel con linfocitos T CD4+, los cuales al ser re-estimulados *in vitro* producen IFN $\gamma$  o IL-17 (Fig.

12B). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la administración de CTB en combinación con un patógeno inactivado promueve la activación de respuestas Th1/Th17 en la piel.

Para demostrar que la respuesta es antígeno específica y de larga vida, determinamos si los ratones inmunizados con IC+CTB pueden desarrollar una respuesta DTH cuando son retados después de 30 días con IC. Las respuestas DTH son iniciadas por la estimulación antigénica de células presentes en la piel (potencialmente T RM) y sostenidas por linfocitos T de memoria circulantes (106,107), dando lugar a un proceso inflamatorio. Después del reto observamos el engrosamiento de la oreja (el sitio de inoculación) únicamente en los ratones previamente inmunizados con IC+CTB, el cual se sostuvo por 48 h; indicando el desarrollo de una respuesta DTH, en contraste con los grupos control (Fig. 12C). Por lo tanto, nuestros datos indican que la inmunización con IC+CTB induce una respuesta de linfocitos T CD4+ antígeno específicos de larga vida.

Posteriormente, nos preguntamos si la administración i.d. de IC+CTB podría promover inmunidad protectora de larga duración contra la infección por *S. Schenkii*. De manera similar a lo observado en humanos, éste modelo murino de infección promueve el desarrollo de lesiones en el sitio de inoculación así como su diseminación sistémica, la cual se manifiesta con el desarrollo de granulomas en la cola (97). Entonces, ratones naive fueron inmunizados vía i.d. con IC+CTB y después de 30 días fueron retados en el mismo sitio con conidios vivos (Fig. 12 D). Los ratones inmunizados con IC+CTB desarrollaron lesiones locales de menor tamaño, en comparación con los ratones que recibieron únicamente IC o CTB, (Fig. 12 E y 12F), lo cual sugiere el desarrollo de inmunidad local de larga duración. De manera similar, la inmunización con IC+CTB previno el desarrollo de granulomas en la cola del 25% de los ratones retados, en comparación con el grupo control con PBS (Fig. 12G), lo cual sugiere el desarrollo de inmunidad protectora sistémica de larga duración.

En conjunto, nuestros hallazgos revelan que la coadministración i.d. de CTB con un patógeno inactivado poco inmunogénico promueve el desarrollo de una respuesta en piel Ag específica Th1/Th17, en conjunto con una respuesta protectora de larga duración contra la infección.



**Figura 12.** La coadministración de CTB con un patógeno inactivado promueve protección local y sistémica contra la infección en piel. Ratones C57BL6 fueron inmunizados vía i.d. en una oreja con conidios inactivados (IC) de *Sporothrix schenckii*, PBS, CTB o IC+CTB; después de 15 días fueron sacrificados para obtener suspensiones celulares de la piel de las orejas, re-estimular *in vitro* por 4 h con cocktail de estimulación + inhibidor de transporte de proteínas y realizar tinción intracelular para análisis por citometría de flujo. (A) Estrategia de análisis para identificar células viables CD45+CD4+TCRβ+. (B) Números totales de células CD4+TCRβ+ de la piel y de células productoras de IFNγ y de IL-17. Media ± SD, N= 6 por grupo, datos agrupados de dos experimentos independientes. ANOVA de una vía con comparación múltiple de Turkey (ns, P > 0.05, \*P < 0.05, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.0005). (C) Ratones inmunizados como en (A) fueron retados después de 30 días vía i.d. en la oreja con CI y el grosor de la oreja fue medido a los tiempos indicados. Media ± SD, N= 3 por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Bonferroni (\*\*\*P < 0.0005). (D) Diagrama de inmunizaciones y reto con conidios vivos. (E) Fotografías representativas de las lesiones en la piel y (F) gráfica del área de la lesión 17 o 30 días después del reto. (G) Gráfica de porcentaje de protección (ratones libres de granulomas en la cola) sistémica respecto al grupo control (PBS) 30 días después del reto. N= 10 por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple de Bonferroni.

## DISCUSIÓN

El desarrollo de estrategias de inmunización que confieran inmunidad de larga duración, mediadas por linfocitos T CD4+, es fundamental para la erradicación de enfermedades pandémicas. La generación de vacunas que puedan inducir tales respuestas requiere frecuentemente de la inclusión de adyuvantes seguros y eficientes; desafortunadamente, existe un número limitado de adyuvantes aprobados para uso en humanos. La CTB es un candidato potencial debido a su uso seguro en humanos y capacidad para promover inmunidad. En este trabajo, demostramos que la CTB puede ser utilizada como un adyuvante para antígenos direccionados a DCs, solubles o derivados de patógenos, induciendo respuestas inmunes protectoras de larga duración.

Dado el papel central que juegan las DCs en el desarrollo de respuestas de linfocitos T, nuestro primer objetivo consistió en el estudio de las DCs de la piel y de los SDLN después de la administración i.d. de CTB. Después de 72 h pudimos observar tanto activación como acumulación de DCs en el sitio de inoculación. En contraste, estímulos de maduración como LPS, CpG, flagelina y la CT, inducen la rápida activación local de DCs en un lapso de 6-24 h tras su inoculación (9,37,108–111). Previo a este trabajo, existía también controversia en cuanto a la capacidad de CTB para inducir la activación de DCs en ganglios linfáticos después de 2-24 h (7,9). Sin embargo, nosotros demostramos que se requiere al menos de 72 h para poder detectar tanto la sobre- expresión de CD86 como la acumulación de DCs en los SDLN.

Nuestros hallazgos contrastan también con los estudios *in vitro* de DCs y macrófagos derivados de médula ósea, donde la incubación con CTB por 12-24 h fue suficiente para inducir su activación vía la estimulación de PRRs (4,6). Sin embargo, no existe evidencia que indique que CTB pueda estimular PRRs en poblaciones de DCs de la piel o de ganglios linfáticos, las cuales son significativamente diferentes a las DC diferenciadas *in vitro* a partir de médula ósea. Es posible que el “retraso” en la activación de las DCs de la piel y de los ganglios linfáticos se deba a un efecto indirecto, es decir, que CTB induzca en otro tipo de células la producción de citocinas proinflamatorias o de señales de estrés celular, las cuales tienen la propiedad de activar DCs. Tal es el caso de los denominados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que incluyen a proteínas de la respuesta a proteínas mal plegadas, proteínas de la respuesta al estrés integrada, proteínas relacionadas al daño tisular, etc. (112). En la línea celular Vero se ha observado que la estimulación con CTB induce la expresión de las proteínas asociadas al estrés del retículo endoplásmico BiP, Derlin-1 y Derlin-2 (113). La identificación de células blanco y de DAMPs después de la administración i.d. de CTB ayudaría a establecer el mecanismo responsable de la activación tardía de DCs.

De manera interesante, la activación y acumulación de DCs en la piel persistió por siete días después de la inoculación de CTB. Lo cual podría deberse al reclutamiento de precursores de DCs. De manera similar a otros adyuvantes, como CpG, alumina o MF59, cuya administración induce la acumulación de células MHC-II+ en el sitio de inoculación después de cuatro días, la cual se cree depende del reclutamiento de monocitos CD11b+ (114). La persistencia en la activación y acumulación fue observada también en las DCs residentes de ganglio. Cabe destacar que la vida promedio de esta población celular es de ~1.5-2 días y que su expansión depende del arribo de precursores de sangre (115). Por lo que nuestros datos sugieren que CTB podría inducir la movilización de precursores de DCs tanto a piel como a los SDLN. La acumulación de DCs podría deberse también a la diferenciación de DCs inflamatorias. Éstas células se diferencian en el sitio de inflamación a partir de monocitos en procesos de infección y por la administración de adyuvantes como CpG (54). Citocinas como IFN $\gamma$  contribuyen a la maduración de las DCs inflamatorias (116), por lo que CTB, que genera microambientes ricos en esta citocina, podría inducir la activación y, posiblemente, la diferenciación de las DCs inflamatorias. Cabe destacar que ésta población de DCs contribuye a la activación y diferenciación de linfocitos T efectoras y de memoria (116). El conjunto de DCs activadas por CTB, tanto en tejidos linfoides como en el sitio de inoculación, induciría el eficiente desarrollo de respuestas de linfocitos T. A este respecto, la acumulación tardía de DCs correlacionó con el desarrollo de linfocitos T CD4+ efectoras y de precursores de memoria, después de la

coadministración de CTB con Ags. En conjunto, nuestros hallazgos contribuyen a esclarecer el papel de CTB en la activación *in vivo* de las DCs para el desarrollo de respuestas de linfocitos T CD4+.

El uso de CTB como adyuvante para Ags solubles ha probado ser poco eficiente para la activación de linfocitos T CD4+ (117–119). Por lo que en este trabajo nos propusimos estudiar su eficiencia en conjunto con un Ag direccionado a DCs DEC205+. De manera similar a estudios anteriores, la administración i.d. de un anticuerpo monoclonal anti-DEC205-OVA promovió la presentación de antígeno con una eficiencia 20 veces superior a la de OVA soluble. Este incremento no fue el esperado de acuerdo a lo reportado por administración s.c. del anticuerpo (24,28). Sin embargo, cabe mencionar que la eficiencia de presentación de Ags solubles por la vía i.d. es significativamente superior a la inducida por vía s.c. o i.p. (49). De manera consistente, tanto el Ag soluble como direccionado a DCs en conjunto con CTB promovió la expansión de los linfocitos T CD4+. Estos hallazgos corroboran que CTB como adyuvante puede promover la activación de linfocitos T. En contraste con algunos modelos de administración de Ags en mucosas, como OVA u auto-antígenos conjugados a CTB, los cuales promueven débilmente la proliferación de linfocitos T CD4+ (15,16,120). Por lo que nuestros resultados demuestran que la administración en piel de CTB en conjunto con Ags inocuos, direccionados a DCs o solubles, puede inducir la eficiente activación de linfocitos T CD4+.

De manera inesperada, la co-administración de CTB con el Ag soluble promovió mayor acumulación de linfocitos T Ag específicos, tanto en los SDLN como en la piel. Lo cual estaría potencialmente relacionado con la regulación diferencial de CD69 inducida por el Ag soluble o direccionado. Éste último promovió mayor des-regulación de CD69, en comparación con el Ag soluble, lo cual permite la salida de los linfocitos T hacia la periferia (103,104). La desregulación de CD69 en linfocitos T altamente proliferativos correlaciona con su migración a órganos linfoides distales al sitio de inoculación, por lo tanto, promoviendo su diseminación sistémica. De acuerdo a este resultado, el direccionamiento de Ags promovió la presencia de linfocitos T CD4+ Ag específicos no solo en piel, sino también en pulmones e intestino, dando lugar a una respuesta sistémica de linfocitos T CD4+. Mientras que la inmunización usando al Ag soluble promovió predominantemente el desarrollo una respuesta localizada en la piel y los GDLNs. Dado que no observamos activación de DCs en sitios distales, nuestros resultados sugieren que la activación de linfocitos T por direccionamiento de Ags a DCs ocurre en los SDLN y después migran para infiltrar el sitio de inoculación y, de manera importante, otros tejidos periféricos no linfoides. De tal manera que nuestros resultados indican que la administración i.d. de Ags direccionados a DCs o solubles en conjunto con CTB promueven la activación de respuestas diferenciales de linfocitos T CD4+.

De hecho, la combinación de CTB con los Ags, direccionados o solubles, promovió el desarrollo de respuestas diferenciales de linfocitos T cooperadores. El direccionamiento de Ag a DCs promovió una respuesta sistémica de linfocitos Th1/Th17. Mientras que la combinación con el Ag soluble indujo una respuesta local predominantemente tipo Th1. De manera similar, se había demostrado en sobrenadantes de linfocitos T re-estimulados *in vitro*, que la administración i.d. de CTB con Ags modelo solubles, como la lisozima de huevo de gallina, induce linfocitos Th1/Th17, pero con predominancia hacia una respuesta de IFN $\gamma$  (49). Asimismo, diferentes modelos de inmunización utilizando a CTB como adyuvante para Ags derivados de patógenos reportaron la inducción de una respuesta de linfocitos Th1 (10,12–14,49). Nuestros datos sugieren que el direccionamiento de Ags a DCs DEC205+ y en presencia de CTB promueve mayor diferenciación de linfocitos Th17. Esto podría deberse a que los anticuerpos monoclonales anti-DEC205 se unen eficientemente a DCs Langerina+, las cuales juegan un papel central en la diferenciación *in vivo* de linfocitos Th17 (40,53). Interesantemente, la combinación de Ag direccionado a DCs con CTB promovió también la diferenciación de linfocitos T polifuncionales, los cuales tienen la capacidad de producir más de una citocina y a los cuales se les relaciona con respuestas efectoras altamente protectoras (121). Respuestas similares son obtenidas por el direccionamiento de Ags a DCs en combinación con adyuvantes como oligonucleótidos de CpG, flagelina (37) y poly I:C (36). Sin embargo, ninguno de estos posee la capacidad de inducir linfocitos Th17 (122,62,123). De tal manera que nuestros hallazgos son los primeros en demostrar el desarrollo de respuestas polifuncionales sistémicas que incluyen linfocitos Th17 después de la administración i.d. de un Ag direccionado a DCs DEC205+ en combinación con CTB, lo cual podría representar un perfil óptimo para el control de diversas patologías.

La coadministración de CTB indujo también el desarrollo de linfocitos T CD4+ de memoria. En conjunto con el Ag direccionado a DCs o soluble, promovió la diferenciación de linfocitos con fenotipo de memoria central y de memoria efectora. Cabe destacar que, si bien existen diversas publicaciones que demuestran que CTB como adyuvante induce protección inmune de larga vida, este es el primer estudio en reportar la diferenciación de subpoblaciones de memoria de linfocitos T utilizando a CTB como adyuvante. Asimismo, son pocos los estudios de inmunización por direccionamiento de Ags a DCs que describen la diferenciación de subpoblaciones de memoria. Más aun, existe un solo reporte sobre la diferenciación de linfocitos T CD8+ de memoria, el cual indica que el direccionamiento favorece la diferenciación de linfocitos T EM, mientras que el Ag no direccionado favorece a los linfocitos T CM (124). Los linfocitos T EM recirculan a través de la sangre hacia tejidos periféricos linfoides y no linfoides y una vez reactivados tienen la capacidad de producir citocinas rápidamente. Mientras que los linfocitos T CM residen en los órganos linfoides y una vez reactivados entran en proliferación para dar lugar a nuevas

células efectoras. De tal manera que la diferenciación de linfocitos T EM y TCM promovería una eficiente respuesta de memoria. De manera importante, nosotros observamos que tanto la inmunización con el Ag direccionado como soluble, en conjunto con CTB, promovió una respuesta balanceada de linfocitos T EM/TCM. Si bien nosotros evaluamos su presencia en órganos linfoides durante la etapa efectora, que es el momento en que se forman los precursores de memoria (21), sería importante confirmar su presencia a tiempos posteriores. Sin embargo, nuestros datos de protección en el modelo de melanoma, inmunizando con el Ag soluble, así como el desarrollo de una DTH, la cual depende de linfocitos de memoria circulantes (97,106,107) por la inmunización con CTB en presencia de conidios de *S. schenkii*, indican el desarrollo de una respuesta de memoria de linfocitos T EM y T CM.

El desarrollo de linfocitos T de memoria, posicionados a lo largo del organismo, representa uno de los principales objetivos de la vacunación. Interesantemente, la coadministración de CTB con anti-DEC205-OVA indujo mayor diferenciación de linfocitos T RM CD4+ en el sitio de inoculación e, importantemente, en el intestino, en comparación con la inmunización utilizando el Ag soluble. Por lo que nuestros resultados sugieren que la administración de anticuerpos anti-DEC205 acoplados a Ags y en combinación con fuertes adyuvantes, como CTB, es una eficiente estrategia para la generación sistémica de linfocitos T RM CD4+. Cabe mencionar que otros estudios han demostrado la eficiente inducción de linfocitos T RM CD8+ direccionando Ags a DCs DEC205+ en presencia de adyuvantes experimentales como poly I:C (86) y LPS (125). Sin embargo, nuestro trabajo es el primero en demostrar la presencia de linfocitos T RM más allá del sitio de inoculación utilizando un adyuvante con potencial uso en humanos. La inducción de linfocitos T RM depende importantemente de elementos del microambiente presentes en los tejidos donde residen, principalmente de TGF- $\beta$  (72). Algunos estudios sugieren que su inducción depende también de la presentación de Ag local. Por ejemplo, en un modelo de inmunización con anti-DEC205-OVA en presencia de LPS la diferenciación de linfocitos T RM CD8+ en pulmón dependió de la presentación local de Ag por DCs CD103+ (125). En tejidos como piel e intestinos, se ha sugerido que un microambiente inflamatorio es suficiente para la diferenciación de los linfocitos TRM. Sin embargo, nuestros datos sugieren que la presentación de Ag juega un papel importante en su diferenciación en ambos tejidos, pues el direccionamiento a DCs DEC205+ fue más eficiente en su inducción que el Ag soluble. En apoyo de esta idea, se ha reportado que los linfocitos T CD4+ efectores necesitan de una segunda presentación de Ag para diferenciarse en células de memoria (21). A este respecto, los anticuerpos anti-DEC205 pueden permanecer en órganos linfoides y periféricos hasta por 5 días después de su administración, promoviendo activación de linfocitos T CD4+ (28,29). Lo cual, aunado a la prevalencia de DCs activadas, inducidas por CTB, podría mediar la diferenciación de linfocitos T RM CD4+ por

inmunización con Ags direccionados a DCs DEC205 en conjunto con CTB. Este hallazgo es de particular importancia debido a que los linfocitos T RM han sido implicados como elementos clave en las respuestas inmunológicas contra infecciones y melanoma.

En el caso del modelo s.c. de melanoma la protección puede ser mediada eficientemente tanto por células de memoria circulantes como por T RM (77). Consecuentemente, la inmunización utilizando un Ag direccionado a DCs o soluble, en conjunto con CTB, fue capaz de proveer protección ante el reto s.c. con melanoma. Sin embargo, cuando el reto fue administrado vía i.v. la protección en pulmones por direccionamiento i.d. de Ag a DCs fue marcadamente superior a la inducida por el Ag soluble. A pesar de que linfocitos T CD4 Ag-específicos infiltraron los pulmones durante la fase efectora, su eliminación utilizando un anticuerpo anti-CD4 durante la fase de memoria demostró que estos son dispensables para la protección contra melanoma. Sin embargo, estudios previos utilizando ratones deficientes de linfocitos T CD4+ han demostrado que éstas células participan en el desarrollo de protección contra el melanoma s.c. (28,32). Es más, se ha propuesto que los linfocitos Th17 participan en el reclutamiento a tumores de linfocitos T CD8+ citotóxicos (41). Si bien no podemos descartar que los linfocitos T CD4+ pudieran mediar la activación de respuestas de linfocitos T CD8+, nuestros resultados apuntan a que la protección contra melanoma inducida por inmunización vía direccionamiento de Ags fue mediada principalmente por linfocitos T CD8+. Esta idea es apoyada por el hecho de que varios estudios han demostrado la activación de linfocitos T CD8+ vía direccionamiento de Ags (24,28) y por Ags conjugados a CTB (118,126). Dado que la activación ocurrió en los SDLN, nuestros hallazgos sugieren que la vacunación i.d. direccionando Ags a DCs DEC205+, y utilizando a CTB como adyuvante, es una estrategia que puede utilizarse para promover inmunidad sistémica de larga duración contra el melanoma.

De manera interesante, la inmunización vía direccionamiento de Ags indujo una respuesta protectora de linfocitos T CD4+ en intestino. La administración de una sola dosis de anti-DEC205-Ag+CTB fue suficiente para inducir la infiltración en intestino de un bajo número de linfocitos en el intestino, incluyendo linfocitos T RM, así como de protección parcial en el modelo de rotavirus, los cuales fueron superiores a los inducidos por la inmunización con el Ag soluble. Con el objetivo de incrementar tanto la infiltración en intestino como el nivel de protección, utilizamos un esquema de inmunización i.d./refuerzo i.p (sin adyuvante). En el caso del direccionamiento de Ags, tomamos ventaja de la capacidad de los anticuerpos anti-DEC205 para diseminarse sistémicamente, lo cual promovió exitosamente la expansión de los linfocitos T CD4+ Ag-específicos infiltrantes de intestino. Además, esta estrategia promovió también la expansión de linfocitos Th17, así como de linfocitos T CD4+ polifuncionales en el intestino.

Cabe mencionar que tanto los linfocitos Th1 como los Th17 han sido implicados en el desarrollo de respuestas inmunes contra rotavirus (90,45), aunque se desconoce el mecanismo de protección de los Th17. Al igual que en modelos de melanoma, los linfocitos Th17 en intestino pueden mediar la infiltración de linfocitos T citotóxicos en modelos de inmunización con adenovirus (57). Por lo que es posible que el alto porcentaje de protección observado contra el rotavirus, después de la inmunización i.d./refuerzo i.p., sea mediado tanto por linfocitos Th1/Th17 como por linfocitos T CD8+. Como lo sugieren los experimentos de bloqueo de linfocitos T CD4+, los cuales resultaron en protección parcial contra la infección. Dado que algunos estudios han sugerido la participación de linfocitos T CD8+ en la protección contra rotavirus murino (91) y al hecho de que el direccionamiento de Ags a DCs y CTB pueden inducir la activación de linfocitos T CD8+, no descartamos la inducción de linfocitos T citotóxicos y su participación en nuestro modelo de inmunización. Además, cabe destacar que el nivel de protección observado fue superior al reportado por administración s.c. del mismo anticuerpo en presencia de poly I:C (35). En conjunto nuestros hallazgos indican que la vacunación utilizando Ags direccionados a DCs DEC205+, en conjunto con CTB, promueve la infiltración del intestino con linfocitos T CD4+ de larga vida y funcionales con la capacidad de mediar protección contra patógenos con tropismo intestinal.

Finalmente nos propusimos comprobar el potencial adyuvante de CTB contra un patógeno que penetra a través de la piel; causando infección local y sistémica. De manera interesante, se ha reportado que la infección induce una respuesta de linfocitos Th1 en la piel, la cual es insuficiente para la eliminación del patógeno. En contraste, la inmunización i.d. con IC+CT induce una respuesta predominante de linfocitos Th17 re-circulantes, los cuales se cree son los responsables de mediar la eficiente eliminación del patógeno en este modelo (97). Nosotros demostramos que la inmunización i.d. de IC+CTB induce una respuesta combinada de linfocitos Th1 y Th17, a diferencia de lo observado en el modelo de inmunización con OVA soluble. Es probable que la diferenciación de linfocitos Th17 sea facilitada por la captura de los IC por DCs de la epidermis (97), potencialmente LCs, activadas por CTB. La administración i.d. de IC+CTB indujo también el desarrollo de una respuesta tipo DTH 30 días posteriores a la inmunización, lo cual sugiere el desarrollo de una respuesta Ag específica de memoria en piel y circulante de linfocitos T CD4+. En conjunto, estas células pudieron participar en el control parcial de la infección local y sistémica observadas después de la inmunización. Para poder inducir un mayor nivel de protección es probable que se requiera de una mayor inducción de linfocitos Th17. Sin embargo, es deseable que la diferenciación de los linfocitos Th17 no rebasé a la de los linfocitos Th1, pues el desarrollo de respuestas exacerbadas mediadas por linfocitos Th17 ha sido ligado con procesos inflamatorios no deseados como autoinmunidad (63). Para incrementar el nivel de protección es posible que se requiera también de la diferenciación de

linfocitos T RM, los cuales desconocemos que puedan ser inducidos por IC+CTB. Por lo que conjugados de Ags de *S. schenkii* con anticuerpos monoclonales anti-DEC205, probablemente bajo un esquema de inmunización i.d./refuerzo, serían una alternativa para la inducción de respuestas balanceadas de linfocitos Th1/Th17, así como de linfocitos de memoria circulantes y residentes de tejido, que resulten en un alto nivel de protección local y sistémica.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran que la CTB puede ser utilizada por la vía i.d. como un fuerte adyuvante para la activación de DCs, induciendo la activación tardía y prolongada de DCs de la piel y de ganglios de drenaje. En consecuencia, la coadministración de CTB con Ags promueve el desarrollo de respuestas de linfocitos T CD4+. Su coadministración con Ags solubles inocuos, no direccionados a DCs, induce una respuesta local de linfocitos Th1, así como de linfocitos T EM y T CM e inmunidad local de larga duración contra el melanoma. Esta estrategia de inmunización sería adecuada para el desarrollo de vacunas o terapias contra patologías limitadas a la piel, cuyo control o erradicación requiera de linfocitos Th1, pero no de linfocitos Th17. Mientras que la coadministración i.d. de CTB con Ags inocuos direccionados a DCs DEC205+ promueve una respuesta local y sistémica diversa de linfocitos T que incluye: linfocitos Th1, Th17 y polifuncionales, así como linfocitos T EM, T CM e importantemente, T RM CD4+, promoviendo protección en piel y pulmones contra el melanoma y en intestinos contra el rotavirus. Por lo que esta estrategia de inmunización en piel sería óptima para generar inmunidad protectora en sitios distales y poco inmunogénicos como los intestinos. La inmunización vía direccionamiento de Ags en conjunto con CTB sería además óptima contra aquellas patologías con la capacidad de diseminarse sistémicamente. Demostramos también que CTB puede actuar como un adyuvante para un patógeno inactivado poco inmunogénico que es administrado en la piel, induciendo una respuesta de linfocitos Th1/Th17, así como protección parcial de larga duración contra la infección en piel y sistémica.

Proponemos que CTB poder ser explotado como un adyuvante para Ags direccionados a DCs DEC205+ para inducir respuestas inmunes de alta calidad y de larga duración que correlacionan con un alto nivel de protección local y sistémica contra infecciones virales como el rotavirus y contra el desarrollo de melanoma.

## BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Cholera vaccines: WHO position paper - August 2017. *Wkly Epidemiol Rec.* 2017;2017(92):477–500.
2. Holmgren J, Svennerholm AM, Jertborn M, Clemens J, Sack DA, Salenstedt R, et al. An oral B subunit: whole cell vaccine against cholera. *Vaccine.* 1992;10(13):911–4.
3. Basset C, Thiam F, di Martino C, Holton J, Clements JD, Kohli E. Cholera-like Enterotoxins and Regulatory T cells. *Toxins (Basel).* 2010;2(7):1774–95.
4. Hou J, Liu Y, Hsi J, Wang H, Tao R, Shao Y. Cholera toxin B subunit acts as a potent systemic adjuvant for HIV-1 DNA vaccination intramuscularly in mice. *Hum Vaccines Immunother.* 2014;10(5):1274–83.
5. Wiedinger K, Romlein H, Bitsaktsis C. Cholera toxin B induced activation of murine macrophages exposed to a fixed bacterial immunogen. *Ther Adv Vaccines.* 2015;3(5–6):155–63.
6. Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yoshida H. Evidence for TLR4 and FcR $\gamma$ -CARD9 activation by cholera toxin B subunit and its direct bindings to TREM2 and LMIR5 receptors. *Mol Immunol.* 2015;66(2):463–71.
7. Anjuère F, George-Chandy A, Audant F, Rousseau D, Holmgren J, Czerkinsky C. Transcutaneous immunization with cholera toxin B subunit adjuvant suppresses IgE antibody responses via selective induction of Th1 immune responses. *J Immunol.* 2003;170(3):1586–92.
8. Anosova NG, Chabot S, Shreedhar V, Borawski JA, Dickinson BL, Neutra MR. Cholera toxin, E. coli heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *Mucosal Immunol.* 2008;1(1):59–67.
9. Apte SH, Redmond AM, Groves PL, Schussek S, Pattinson DJ, Doolan DL. Subcutaneous cholera toxin exposure induces potent CD103+ dermal dendritic cell activation and migration. *Eur J Immunol.* 2013;43(10):2707–17.
10. Li J, Arevalo MT, Chen Y, Posadas O, Smith JA, Zeng M. Intranasal immunization with influenza antigens conjugated with cholera toxin subunit B stimulates broad spectrum immunity against influenza viruses. *Hum Vaccines Immunother.* 2014;10(5):1211–20.
11. Olivera N, Castuma CE, Hozbor D, Gaillard ME, Rumbo M, Gómez RM. Immunization with the recombinant cholera toxin B fused to fimbria 2 protein protects against bordetella pertussis infection. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
12. Wiedinger K, Pinho D, Bitsaktsis C. Utilization of cholera toxin B as a mucosal adjuvant elicits antibody-mediated protection against S. pneumoniae infection in mice. *Ther Adv vaccines.* 2017;5(1):15–24.
13. Bitsaktsis C, Rawool DB, Li Y, Kurkure N V., Iglesias B, Gosselin EJ. Differential Requirements for Protection against Mucosal Challenge with Francisella tularensis in the Presence versus Absence of Cholera Toxin B and Inactivated F. tularensis. *J Immunol.* 2009;182(8):4899–909.
14. Li Y, Chen Z, Ye J, Ning L, Luo J, Zhang L, et al. Antibody Production and Th1-biased Response Induced by an Epitope Vaccine Composed of Cholera Toxin B Unit and Helicobacter pylori Lpp20 Epitopes. *Helicobacter.* 2016;21(3):234–48.
15. Odumosu O, Payne K, Baez I, Jutzy J, Wall N, Langridge W. Suppression of dendritic cell activation by diabetes autoantigens linked to the cholera toxin B subunit. *Immunobiology.* 2011;216(4):447–56.
16. Sun J-B, Raghavan S, Sjolting A, Lundin S, Holmgren J. Oral Tolerance Induction with Antigen Conjugated to Cholera

- Toxin B Subunit Generates Both Foxp3+CD25+ and Foxp3-CD25- CD4+ Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2006;177(11):7634–44.
17. Itano AA, McSorley SJ, Reinhardt RL, Ehst BD, Ingulli E, Rudensky AY, et al. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity.* 2003;19(1):47–57.
  18. Allenspach EJ, Lemos MP, Porrett PM, Turka LA, Laufer TM. Migratory and Lymphoid-Resident Dendritic Cells Cooperate to Efficiently Prime Naive CD4 T cells. *Immunity.* 2008;29(5):795–806.
  19. Jelley-Gibbs DM, Brown DM, Dibble JP, Haynes L, Eaton SM, Swain SL. Unexpected prolonged presentation of influenza antigens promotes CD4 T cell memory generation. *J Exp Med.* 2005;202(5):697–706.
  20. Obst R, van Santen H-M, Mathis D, Benoist C. Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4<sup>+</sup> T cell response. *J Exp Med.* 2005;201(10):1555–65.
  21. Bautista BL, Devarajan P, McKinsty KK, Strutt TM, Vong AM, Jones MC, et al. Short-Lived Antigen Recognition but Not Viral Infection at a Defined Checkpoint Programs Effector CD4 T Cells To Become Protective Memory. *J Immunol.* 2016;197(10):3936–49.
  22. Iborra S, Martínez-López M, Khouili SC, Enamorado M, Cueto FJ, Conde-Garrosa R, et al. Optimal Generation of Tissue-Resident but Not Circulating Memory T Cells during Viral Infection Requires Crosspriming by DNGR-1+ Dendritic Cells. *Immunity.* 2016;45(4):847–60.
  23. Tacke PJ, De Vries IJM, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: From ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(10):790–802.
  24. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8<sup>+</sup> T Cell Tolerance. *J Exp Med.* 2002;196(12):1627–38.
  25. Dhodapkar M V., Sznol M, Zhao B, Wang D, Carvajal RD, Keohan ML, et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci Transl Med.* 2014;6(232).
  26. Guo M, Gong S, Maric S, Misulovin Z, Pack M, Mahnke K, et al. A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. *Hum Immunol.* 2000;61(8):729–38.
  27. Romani N, Thurnher M, Idoyaga J, Steinman RM, Flacher V. Targeting of antigens to skin dendritic cells: Possibilities to enhance vaccine efficacy. Vol. 88, *Immunology and Cell Biology.* 2010. p. 424–30.
  28. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S-I, Soares H, et al. In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination. *J Exp Med.* 2004;199(6):815–24.
  29. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumfheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science (80- ).* 2007;315(5808):107–11.
  30. Flacher V, Tripp CH, Stoitzner P, Haid B, Ebner S, Del Frari B, et al. Epidermal langerhans cells rapidly capture and present antigens from C-type lectin-targeting antibodies deposited in the dermis. *J Invest Dermatol.* 2010;130(3):755–62.
  31. Flacher V, Tripp CH, Haid B, Kissenpfennig A, Malissen B, Stoitzner P, et al. Skin Langerin+ Dendritic Cells Transport Intradermally Injected Anti-DEC-205 Antibodies but Are Not Essential for Subsequent Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T Cell Responses. *J Immunol.* 2012;188(5):2146–55.
  32. Mahnke K, Qian Y, Fondel S, Brueck J, Becker C, Enk AH. Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. *Cancer Res.* 2005;65(15):7007–12.

33. Johnson TS, Mahnke K, Storn V, Schönfeld K, Ring S, Nettelbeck DM, et al. Inhibition of melanoma growth by targeting of antigen to dendritic cells via an anti-DEC-205 single-chain fragment variable molecule. *Clin Cancer Res.* 2008;14(24):8169–77.
34. Boscardin SB, Hafalla JCR, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski HA, Rai U, et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med.* 2006;203(3):599–606.
35. Badillo-Godinez O, Gutierrez-Xicotencatl L, Plett-Torres T, Pedroza-Saavedra A, Gonzalez-Jaimes A, Chihu-Ampan L, et al. Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. *Vaccine.* 2015;33(35):4228–37.
36. Trumpfheller C, Caskey M, Nchinda G, Longhi MP, Mizenina O, Huang Y, et al. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(7):2574–9.
37. Antonialli R, Sulczewski FB, Amorim KN da S, Almeida B da S, Ferreira NS, Yamamoto MM, et al. CpG oligodeoxynucleotides and flagellin modulate the immune response to antigens targeted to CD8 $\alpha$ +and CD8 $\alpha$ -conventional dendritic cell subsets. *Front Immunol.* 2017;8(DEC).
38. Do Y, Didierlaurent AM, Ryu S, Koh H, Park CG, Park S, et al. Induction of pulmonary mucosal immune responses with a protein vaccine targeted to the DEC-205/CD205 receptor. *Vaccine.* 2012;30(45):6359–67.
39. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol.* 2007;8(4):369–77.
40. Kashem SW, Igyártó BZ, Gerami-Nejad M, Kumamoto Y, Mohammed J, Jarrett E, et al. *Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation. *Immunity.* 2015;42(2):356–66.
41. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, et al. T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity.* 2009;31(5):787–98.
42. Zeng Y, Zhang Q, Wang H, Lu M, Kong H, Zhang Y, et al. Prognostic significance of interleukin-17 in solid tumors: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(7):10515–36.
43. Baumgaertner P, Costa Nunes C, Cachot A, Maby-El Hajjami H, Cagnon L, Braun M, et al. Vaccination of stage III/IV melanoma patients with long NY-ESO-1 peptide and CpG-B elicits robust CD8+ and CD4+ T-cell responses with multiple specificities including a novel DR7-restricted epitope. *Oncoimmunology.* 2016;5(10).
44. McNeal MM, VanCott JL, Choi AHC, Basu M, Flint JA, Stone SC, et al. CD4 T cells are the only lymphocytes needed to protect mice against rotavirus shedding after intranasal immunization with a chimeric VP6 protein and the adjuvant LT(R192G). *J Virol.* 2002;76(2):560–8.
45. Smiley KL, McNeal MM, Basu M, Choi AH-C, Clements JD, Ward RL. Association of Gamma Interferon and Interleukin-17 Production in Intestinal CD4+ T Cells with Protection against Rotavirus Shedding in Mice Intranasally Immunized with VP6 and the Adjuvant LT(R192G). *J Virol.* 2007;81(8):3740–8.
46. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003;21(1):713–58.
47. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4 +T cells: Differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;1–12.
48. Manicassamy S, Pulendran B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. Vol. 21, *Seminars in Immunology.* 2009. p. 185–93.
49. Meza-Sánchez D, Pérez-Montesinos G, Sánchez-García J, Moreno J, Bonifaz LC. Intradermal immunization in the ear

with cholera toxin and its non-toxic ?? subunit promotes efficient Th1 and Th17 differentiation dependent on migrating DCs. *Eur J Immunol.* 2011;41(10):2894–904.

50. Schnitzler AC, Burke JM, Wetzler LM. Induction of cell signaling events by the cholera toxin B subunit in antigen-presenting cells. *Infect Immun.* 2007;75(6):3150–9.
51. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol.* 1995;154(10):5071–9.
52. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. Vol. 1, *Nature Immunology.* 2000. p. 199–205.
53. Igyártó BZ, Haley K, Ortner D, Bobr A, Gerami-Nejad M, Edelson BT, et al. Skin-Resident Murine Dendritic Cell Subsets Promote Distinct and Opposing Antigen-Specific T Helper Cell Responses. *Immunity.* 2011;35(2):260–72.
54. De Koker S, Van Hoecke L, De Beuckelaer A, Roose K, Deswarte K, Willart MA, et al. Inflammatory monocytes regulate Th1 oriented immunity to CpG adjuvanted protein vaccines through production of IL-12. *Sci Rep.* 2017;7(1).
55. Idoyaga J, Fiorese C, Zbytnuik L, Lubkin A, Miller J, Malissen B, et al. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest.* 2014;4:1–11.
56. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):485–517.
57. Hemmi M, Tachibana M, Fujimoto N, Shoji M, Sakurai F, Kobiyama K, et al. T helper 17 promotes induction of antigen-specific gut-mucosal cytotoxic T lymphocytes following adenovirus vector vaccination. *Front Immunol.* 2017;8(NOV).
58. Lin Y, Slight SR, Khader SA. Th17 cytokines and vaccine-induced immunity. Vol. 32, *Seminars in Immunopathology.* 2010. p. 79–90.
59. Huang G, Wang Y, Chi H. Regulation of TH17 cell differentiation by innate immune signals. Vol. 9, *Cellular and Molecular Immunology.* 2012. p. 287–95.
60. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood.* 2013;121(13):2402–14.
61. Duluc D, Joo H, Ni L, Yin W, Upchurch K, Li D, et al. Induction and Activation of Human Th17 by Targeting Antigens to Dendritic Cells via Dectin-1. *J Immunol.* 2014;192(12):5776–88.
62. Joffre OP, Sancho D, Zelenay S, Keller AM, Reis E Sousa C. Efficient and versatile manipulation of the peripheral CD4+ T-cell compartment by antigen targeting to DNGR-1/CLEC9A. *Eur J Immunol.* 2010;40(5):1255–65.
63. Kumar P, Chen K, Kolls JK. Th17 cell based vaccines in mucosal immunity. Vol. 25, *Current Opinion in Immunology.* 2013. p. 373–80.
64. Lee JB, Jang JE, Song MK, Chang J. Intranasal delivery of cholera toxin induces Th17-dominated T-cell response to bystander antigens. *PLoS One.* 2009;4(4).
65. Park CO, Kupper TS. The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. *Nat Med.* 2015;21(7):688–97.
66. Kannanganat S, Kapogiannis BG, Ibegbu C, Chennareddi L, Goepfert P, Robinson HL, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Controllers but Not Noncontrollers Maintain CD4 T Cells Coexpressing Three Cytokines. *J Virol.* 2007;81(21):12071–6.
67. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RWB, Davey DF, Flynn BJ, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med.* 2007;13(7):843–50.

68. Lindstrom T, Agger EM, Korsholm KS, Darrah PA, Aagaard C, Seder RA, et al. Tuberculosis Subunit Vaccination Provides Long-Term Protective Immunity Characterized by Multifunctional CD4 Memory T Cells. *J Immunol.* 2009;182(12):8047–55.
69. He K, Liu P, Xu LX. The cryo-Thermal therapy eradicated melanoma in mice by eliciting CD4+T-cell-mediated antitumor memory immune response. *Cell Death Dis.* 2017;8(3).
70. Farber DL, Yudain NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. 2014;14(1):24–35.
71. Clark RA. Resident memory T cells in human health and disease. *Sci Transl Med.* 2015;7(269):269rv1–269rv1.
72. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon M-L, et al. The developmental pathway for CD103+CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol.* 2013;14(12):1294–301.
73. Watanabe R, Gehad A, Yang C, Scott LL, Teague JE, Schlapbach C, et al. Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Sci Transl Med.* 2015;7(279).
74. Liu L, Zhong Q, Tian T, Dubin K, Athale SK, Kupper TS. Epidermal injury and infection during poxvirus immunization is crucial for the generation of highly protective T cell-mediated immunity. *Nat Med.* 2010;16(2):224–7.
75. Teijaro JR, Turner D, Pham Q, Wherry EJ, Lefrancois L, Farber DL. Cutting Edge: Tissue-Retentive Lung Memory CD4 T Cells Mediate Optimal Protection to Respiratory Virus Infection. *J Immunol.* 2011;187(11):5510–4.
76. Stary G, Olive A, Radovic-Moreno AF, Gondek D, Alvarez D, Basto PA, et al. A mucosal vaccine against *Chlamydia trachomatis* generates two waves of protective memory T cells. *Science (80- ).* 2015;348(6241).
77. Enamorado M, Iborra S, Priego E, Cueto FJ, Quintana JA, Martínez-Cano S, et al. Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8+T cells. *Nat Commun.* 2017;8(May):1–11.
78. Devarajan P, Bautista B, Vong AM, McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL. New insights into the generation of CD4 memory may shape future vaccine strategies for influenza. Vol. 7, *Frontiers in Immunology.* 2016.
79. Webb JR, Milne K, Watson P, DeLeeuw RJ, Nelson BH. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker cd103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(2):434–44.
80. Komdeur FL, Prins TM, van de Wall S, Plat A, Wisman GBA, Hollema H, et al. CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-reactive intraepithelial CD8+ T cells associated with prognostic benefit and therapy response in cervical cancer. *Oncoimmunology.* 2017;6(9).
81. Workel HH, Komdeur FL, Wouters MCA, Plat A, Klip HG, Eggink FA, et al. CD103 defines intraepithelial CD8+ PD1+ tumour-infiltrating lymphocytes of prognostic significance in endometrial adenocarcinoma. *Eur J Cancer.* 2016;60:1–11.
82. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371(16):1507–17.
83. Perret R, Sierro SR, Botelho NK, Cognac S, Donda A, Romero P. Adjuvants that improve the ratio of antigen-specific effector to regulatory T cells enhance tumor immunity. *Cancer Res.* 2013;73(22):6597–608.
84. Flacher V, Tripp CH, Mairhofer DG, Steinman RM, Stoitzner P, Idoyaga J, et al. Murine Langerin+ dermal dendritic cells prime CD8+ T cells while Langerhans cells induce cross-tolerance. *EMBO Mol Med.* 2014;6(9):1191–204.
85. Nizard M, Roussel H, Diniz MO, Karaki S, Tran T, Voron T, et al. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nat Commun.* 2017;8.

86. Gálvez-Cancino F, López E, Menares E, Díaz X, Flores C, Cáceres P, et al. Vaccination-induced skin-resident memory CD8<sup>+</sup>T cells mediate strong protection against cutaneous melanoma. *Oncoimmunology*. 2018;7(7).
87. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3.
88. Ward RL, McNeal MM. VP6: A Candidate Rotavirus Vaccine. *J Infect Dis*. 2010;202(S1):S101–7.
89. Choi a H, Basu M, McNeal MM, Clements JD, Ward RL. Antibody-independent protection against rotavirus infection of mice stimulated by intranasal immunization with chimeric VP4 or VP6 protein. *J Virol*. 1999;73(9):7574–81.
90. McNeal MM, Basu M, Bean JA, Clements JD, Choi AHC, Ward RL. Identification of an immunodominant CD4<sup>+</sup> T cell epitope in the VP6 protein of rotavirus following intranasal immunization of BALB/c mice. *Virology*. 2007;363(2):410–8.
91. Rosé JR, Williams MB, Rott LS, Butcher EC, Greenberg HB. Expression of the mucosal homing receptor alpha4beta7 correlates with the ability of CD8<sup>+</sup> memory T cells to clear rotavirus infection. *J Virol*. 1998;72(1):726–30.
92. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A. Cutaneous Disseminated and Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease. *J Fungi*. 2017;3(1):6.
93. Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(4):633–54.
94. Koga T, Duan H, Furue M. Immunohistochemical detection of interferon-gamma-producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. *Med Mycol*. 2002;40(2):111–4.
95. Carlos IZ, Sassá MF, Da Graça Sgarbi DB, Placeres MCP, Maia DCG. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2009;168(1):1–10.
96. Uenotsuchi T, Takeuchi S, Matsuda T, Urabe K, Koga T, Uchi H, et al. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int Immunol*. 2006;18(12):1637–46.
97. Garcia-Lozano A, Toriello C, Antonio-Herrera L, Bonifaz LC. *Sporothrix schenckii* Immunization, but Not Infection, Induces Protective Th17 Responses Mediated by Circulating Memory CD4(+) T Cells. *Front Microbiol*. 2018;9.
98. Ferreira LS, Gonçalves AC, Portuondo DL, Maia DCG, Placeres MCP, Batista-Duarte A, et al. Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection. *Immunobiology*. 2015;220(8):985–92.
99. Flores-García A, Velarde-Félix JS, Garibaldi-Becerra V, Rangel-Villalobos H, Torres-Bugarín O, Alfonso Zepeda-Carrillo E, et al. Recombinant murine IL-12 promotes a protective Th1/cellular response in Mongolian gerbils infected with *Sporothrix schenckii*. *J Chemother*.
100. Portuondo DL, Batista-Duarte A, Ferreira LS, de Andrade CR, Quinello C, Téllez-Martínez D, et al. Comparative efficacy and toxicity of two vaccine candidates against *Sporothrix schenckii* using either Montanide™ Pet Gel A or aluminum hydroxide adjuvants in mice. *Vaccine*. 2017;35(34):4430–6.
101. Oscar Medina-Contreras, DUke Geem, Oskar Laur, Ifor R. Williamms, Sergio A. Lira, Asma Nusrat, Charles A. Parkos and TLD. CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colotogenic Th17 responses in mice. 2011;121(12).
102. Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a mouse model for human melanoma. Vol. Chapter 20, *Current protocols in immunology* / edited by John E. Coligan ... [et al.]. 2001. Unit 20.1.
103. Lambrecht BN, Pauwels RA, Fazekas de St. Groth B. Induction of Rapid T Cell Activation, Division, and Recirculation

- by Intratracheal Injection of Dendritic Cells in a TCR Transgenic Model. *J Immunol.* 2000;164(6):2937–46.
104. Shiow LR, Rosen DB, Brdičková N, Xu Y, An J, Lanier LL, et al. CD69 acts downstream of interferon- $\alpha/\beta$  to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature.* 2006;440(7083):540–4.
  105. Mackay LK, Braun A, Macleod BL, Collins N, Tebartz C, Bedoui S, et al. Cutting Edge: CD69 Interference with Sphingosine-1-Phosphate Receptor Function Regulates Peripheral T Cell Retention. *J Immunol.* 2015;194(5):2059–63.
  106. Ghani S, Feuerer M, Doebis C, Lauer U, Loddenkemper C, Huehn J, et al. T cells as pioneers: Antigen-specific T cells condition inflamed sites for high-rate antigen-non-specific effector cell recruitment. *Immunology.* 2009;128(1 PART 2).
  107. Matheu MP, Beeton C, Garcia A, Chi V, Safrina O, Monaghan K, et al. Imaging of effector memory T cells during a delayed-type hypersensitivity reaction and suppression by Kv1.3 channel blockers. *Immunity.* 2009;29(4):602–14.
  108. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med.* 1996;184(4):1413–24.
  109. Behboudi S, Chao D, Klenerman P, Austyn J. The effects of DNA containing CpG motif on dendritic cells. *Immunology.* 2000;99(3):361–6.
  110. Olguin-Alor R, De La Fuente-Granada M, Bonifaz LC, Antonio-Herrera L, García-Zepeda EA, Soldevila G. A key role for inhibins in dendritic cell maturation and function. *PLoS One.* 2016;11(12):1–21.
  111. Anjuere F, Luci C, Lebens M, Rousseau D, Hervouet C, Milon G, et al. In Vivo Adjuvant-Induced Mobilization and Maturation of Gut Dendritic Cells after Oral Administration of Cholera Toxin. *J Immunol.* 2004;173(8):5103–11.
  112. Pulendran B. The Varieties of Immunological Experience: Of Pathogens, Stress, and Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol.* 2015;33(1):563–606.
  113. Dixit G, Mikoryak C, Hayslett T, Bhat A, Draper RK. Cholera Toxin Up-Regulates Endoplasmic Reticulum Proteins That Correlate with Sensitivity to the Toxin. *Exp Biol Med.* 2008;233(2):163–75.
  114. Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(30):10501–6.
  115. Kamath AT, Pooley J, O’Keeffe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, et al. The Development, Maturation, and Turnover Rate of Mouse Spleen Dendritic Cell Populations. *J Immunol.* 2000;165(12):6762–70.
  116. Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. Vol. 34, *Trends in Immunology.* 2013. p. 440–5.
  117. George-Chandy A, Eriksson K, Lebens M, Nordström I, Schön E, Holmgren J. Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells. *Infect Immun.* 2001;69(9):5716–25.
  118. Luci C, Hervouet C, Rousseau D, Holmgren J, Czerkinsky C, Anjuère F. Dendritic cell-mediated induction of mucosal cytotoxic responses following intravaginal immunization with the nontoxic B subunit of cholera toxin. *J Immunol.* 2006;176(5):2749–57.
  119. Arlian BM, Tinker JK. Mucosal immunization with a *Staphylococcus aureus* IsdA-cholera toxin A 2/B chimera induces antigen-specific Th2-type responses in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(9):1543–51.
  120. Sun JB, Czerkinsky C, Holmgren J. Sublingual “oral tolerance” induction with antigen conjugated to cholera toxin B subunit generates regulatory T cells that induce apoptosis and depletion of effector T cells. *Scand J Immunol.* 2007;66(2–3):278–86.

121. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: Implications for vaccine design. Vol. 8, Nature Reviews Immunology. 2008. p. 247–58.
122. Tigno-Aranjuez JT, Jaini R, Tuohy VK, Lehmann P V., Tary-Lehmann M. Encephalitogenicity of Complete Freund's Adjuvant Relative to CpG Is Linked to Induction of Th17 Cells. J Immunol. 2009;183(9):5654–61.
123. Weber A, Zimmermann C, Meyer zu Hörste G, Kieseier BC, Hartung HP, Hofstetter HH. Bacterial flagellin and diphtheria toxin co-stimulate IL-17-producing thymocytes. Cytokine. 2013;64(1):221–6.
124. Tenbusch M, Nchinda G, Bonsmann MSG, Temchura V, Überla K. Targeting the antigen encoded by adenoviral vectors to the DEC205 receptor modulates the cellular and humoral immune response. Int Immunol. 2013;25(4):247–58.
125. Wakim LM, Smith J, Caminschi I, Lahoud MH, Villadangos JA. Antibody-targeted vaccination to lung dendritic cells generates tissue-resident memory CD8 T cells that are highly protective against influenza virus infection. Mucosal Immunol. 2015;8(5):1060–71.
126. Eriksson K, Sun J Bin, Nordström I, Fredriksson M, Lindblad M, Li BL, et al. Coupling of antigen to cholera toxin for dendritic cell vaccination promotes the induction of MHC class I-restricted cytotoxic T cells and the rejection of a cognate antigen-expressing model tumor. Eur J Immunol. 2004;34(5):1272–81.