

**Instituto Finlay
Vicepresidencia de Investigaciones
Departamento de Inmunología**

**Capacidad Adyuvante del Proteoliposoma derivado
de la membrana externa de *Neisseria meningitidis B***

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Biológicas**

**Autor: Lic. Tamara Rodríguez Ramírez
Tutores: Dr. Oliver Pérez Martín Dr. CsM
Dr. Pietro Mastroeni Dr. CsM**

Ciudad de La Habana

2004

A mi mamá, el lujo de mi vida.

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

AcM	Anticuerpo monoclonal
ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
CD	Células dendríticas
CDn	Grupo de diferenciación, en inglés “cluster of differentiation”
CFS	Células formadoras de manchas, en inglés “spots”
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CPA	Célula presentadora de antígenos
CpG	Citocina no metilada-guanina
CTL	Linfocitos T CD8 ⁺ citotóxicos
DE	Desviación estándar
DO	Densidad óptica
DOC	Desoxicolato
EBSc	Ensayo colorimétrico para la actividad bactericida del suero
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético (sal disódica)
EUA	Estados Unidos de América
FACS	Equipo clasificador de células activadas por fluorescencia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IFN γ	Interferón gamma
ILn	Interleuquina
ILnR	Receptor de interleuquina
LPS	Lipopolisacárido
M Φ	Macrófagos
MHC-n	Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I ó II
OVA	Ovoalbúmina
OPD	<i>ortho</i> -fenilenediamina
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PE	Ficoeritrina
PL	Proteoliposoma
PHA	Fitohemaglutinina A
PL-OVA	Proteoliposoma con ovoalbúmina incorporada
PM	Peso molecular
SAB	Seroalbúmina bovina
SBF	Suero bovino fetal
SSHB	Solución salina de Hanks balanceada
SSTF	Solución salina tamponada de fosfato
TCR	Receptor de células T
Th-n	Linfocito T CD4 ⁺ auxiliador de tipo 1 ó 2
TLRn	Receptores semejantes a “Toll” (1-11)
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
T-OVA	Emulsión de TiterMax con ovoalbúmina
2-ME	2-Mercaptoetanol

SINTEISIS

La respuesta inmune asociada a vacunas puede incrementarse con el uso de adyuvantes eficientes. Sin embargo, muy pocos adyuvantes han sido aprobados para su uso en humanos por lo que es importante la evaluación de nuevos productos. **En este trabajo se exploran las potencialidades del Proteoliposoma (PL) derivado de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* B como adyuvante.** El PL indujo la activación de los macrófagos (MΦ) evidenciada por el incremento en las moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) y la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNFα). Además, el PL indujo en las células dendríticas (CD) un incremento en la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y moléculas coestimuladoras, así como la producción de TNFα y del heterodímero funcional de 70 kDa de la interleuquina 12 (IL12(p70)), señales de la maduración de estas células. Las CD de ratones C3H/HeJ (hiporespondedores al lipopolisacárido (LPS)), expuestas al PL, incrementaron moderadamente la expresión de MHC-II y CD86 y produjeron IL12(p70). Sin embargo, se obtuvo una respuesta significativamente mayor ($p < 0,05$) de la inmunoglobulina gamma (IgG) anti-PL con predominancia de la subclase 2a (IgG2a) y significativamente mayor ($p < 0,05$) producción de interferón gamma en los animales respondedores al LPS (C3H/HeN) que en los C3H/HeJ. Estos resultados sugieren que aunque los componentes no-LPS están implicados en la iniciación de la respuesta inmune, el LPS es un importante potenciador del patrón mediado por linfocitos T CD4⁺ auxiliares de tipo 1 inducido por el PL. El título de anticuerpos bactericidas en el suero de ratones C3H/HeN fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que en el suero de ratones C3H/HeJ en concordancia con la diferencia de subclases encontrada. Estos resultados sugieren que el PL, particularmente debido al LPS, sirve de adyuvante para las proteínas del meningococo que están en su estructura. Además, se incorporó ovoalbúmina (OVA) en el PL (PL-OVA). Las CD incubadas con PL-OVA presentaron péptidos de OVA a hibridomas de células T CD4⁺ y T CD8⁺ OVA-específicos. La activación de estas células T evidenció las habilidades del PL para potenciar la presentación en MHC-II e inducir la presentación cruzada en MHC-I de un antígeno soluble incorporado en su estructura. Esta es una primera evidencia de que el PL puede inducir respuesta CTL. Además, la inmunización con PL-OVA indujo una elevada respuesta de IgG anti-OVA en animales C3H/HeN con predominio de la subclase IgG2a anti-OVA. Los resultados en su conjunto demuestran la capacidad adyuvante del PL.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCION	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	10
II.1 <i>Neisseria meningitidis</i>	10
II.2 <i>Proteoliposoma derivado de Neisseria meningitidis B</i>	13
II.3 <i>Inmunidad innata</i>	15
II.4 <i>Células dendríticas</i>	15
II.5 <i>Macrófagos</i>	18
II.6 <i>Receptores “Toll” de la inmunidad innata</i>	18
II.7 <i>Reconocimiento del lipopolisacárido</i>	21
II.8 <i>Procesamiento y presentación antigénica</i>	23
II.9 <i>Presentación cruzada</i>	24
II.10 <i>Inmunidad adaptativa</i>	25
II.11 <i>Diferenciación de la respuesta inmune adaptativa hacia un patrón Th1/Th2/Th3</i>	25
II.12 <i>Respuesta Th1</i>	26
II.13 <i>Actividad bactericida del suero contra Neisseria meningitidis B</i>	27
II.14 <i>Adyuvantes</i>	28
II.15 <i>Citometría de flujo</i>	33
III. MATERIALES Y METODOS	35
III.1 <i>Obtención del Proteoliposoma</i>	35
III.2 <i>Inclusión de ovoalbúmina en el Proteoliposoma</i>	35
III.3 <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio</i>	36
III.4 <i>Inmunotransferencia</i>	36
III.5 <i>Preparación de la emulsión TiterMax Gold-ovoalbúmina</i>	37
III.6 <i>Animales de experimentación</i>	38
III.7 <i>Inmunización</i>	38
III.8 <i>Obtención de macrófagos y células dendríticas</i>	39
III.9 <i>Estimulación antigénica de macrófagos y células dendríticas</i>	40
III.10 <i>Citometría de flujo</i>	41
III.11 <i>Determinación de TNFα e IL12(p70)</i>	42
III.12 <i>Determinación de células dendríticas productoras de TNFα e IL12(p70)</i>	44

<i>III.13 ELISA de IgG.....</i>	<i>45</i>
<i>III.14 ELISA de subclases de IgG.....</i>	<i>46</i>
<i>III.15 Aislamiento, cultivo y re-estimulación in vitro de células de bazo de animales inmunizados con Proteoliposoma.....</i>	<i>47</i>
<i>III.16 Determinación de IFNγ.....</i>	<i>48</i>
<i>III.17 Ensayo colorimétrico para evaluar la actividad bactericida del suero</i>	<i>49</i>
<i>III.17.1 Preparación del antígeno.....</i>	<i>49</i>
<i>III.17.2 Muestras de suero y complemento.....</i>	<i>49</i>
<i>III.17.3 Procedimiento.....</i>	<i>50</i>
<i>III.17.4 Validación del ensayo colorimétrico para evaluar la actividad bactericida del suero</i>	<i>51</i>
<i>III.18 Líneas celulares e hibridomas</i>	<i>51</i>
<i>III.19 Ensayo de procesamiento y presentación antigénica.....</i>	<i>52</i>
<i>III.20 Bioensayo para la determinación de IL2</i>	<i>52</i>
<i>III.21 Procesamiento estadístico</i>	<i>53</i>
IV. RESULTADOS	55
<i>IV.1 Obtención de las poblaciones de macrófagos y células dendríticas</i>	<i>55</i>
<i>IV.2 Determinación de las condiciones para la activación de los macrófagos con el Proteoliposoma.....</i>	<i>58</i>
<i>IV.3 Expresión de moléculas de superficie en los macrófagos de ratones C57BL/6 estimulados con el Proteoliposoma</i>	<i>58</i>
<i>IV.4 Expresión de moléculas de superficie en las células dendríticas de ratones C57BL/6 estimuladas con el Proteoliposoma</i>	<i>62</i>
<i>IV. 5 Secreción de TNFα e IL12(p70) por las células dendríticas y los macrófagos de ratones C57BL/6 estimulados con el Proteoliposoma.....</i>	<i>63</i>
<i>IV.6 Expresión de moléculas de superficie en las células dendríticas y los macrófagos de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ estimulados con el Proteoliposoma.....</i>	<i>64</i>
<i>IV.7 Secreción de TNFα e IL12(p70) por las células dendríticas y los macrófagos de ratones C3H/HeJ y C3H/HeN estimulados con el Proteoliposoma.....</i>	<i>66</i>
<i>IV.8 Respuesta de clase IgG y de las subclases IgG1 e IgG2a en ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con el Proteoliposoma.....</i>	<i>69</i>
<i>IV.9 Producción de IFNγ en ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con el Proteoliposoma.....</i>	<i>71</i>
<i>IV.10 Validación del ensayo colorimétrico para evaluar la actividad bactericida del suero</i>	<i>72</i>

<i>IV.10.1 Actividad bactericida del suero de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con el Proteoliposoma</i>	72
<i>IV.11 Inclusión de ovoalbúmina en el Proteoliposoma</i>	73
<i>IV.12 Activación de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ específicos para péptidos de ovoalbúmina</i>	75
<i>IV.13 Respuesta de clase IgG y de las subclases IgG1 e IgG2a en ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con Proteoliposoma-ovoalbúmina</i>	76
V. DISCUSION	79
VI. CONCLUSIONES	94
VII. RECOMENDACIONES	95
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	96

I. INTRODUCCION

La respuesta inmune asociada a vacunas depende de la inmunogenicidad inherente a los antígenos y de la disponibilidad de adyuvantes eficientes. Los adyuvantes vacunales se caracterizan por su habilidad de aumentar la inmunogenicidad *in vivo* (respuesta antígeno-específica) de los antígenos con los cuales son co-administrados. De esta forma, los adyuvantes constituyen componentes imprescindibles en las vacunas modernas, especialmente para antígenos recombinantes, debido a la poca inmunogenicidad de los mismos. Sin embargo, muy pocos adyuvantes han sido aprobados para su uso en humanos debido fundamentalmente a su elevada reactogenicidad, por lo que la evaluación de nuevos candidatos es de gran importancia y actualidad.

La captura, procesamiento y presentación de un antígeno por las células presentadoras de antígenos (CPA) del sistema inmune innato, son los pasos cruciales en la iniciación de la respuesta inmune específica contra los patógenos o los antígenos vacunales. Teniendo en cuenta el rol instructivo que ejerce la inmunidad innata sobre la adaptativa, ha surgido una nueva concepción en la generación de adyuvantes centrada en la búsqueda de compuestos que provean señales de peligro capaces de estimular al sistema inmune innato (O'Hagan y Valiante, 2003).

Los mecanismos de la inmunidad innata se desencadenan por el reconocimiento de los patógenos a través de receptores específicos tales como los receptores semejantes a Toll, en inglés "Toll-like receptors" (TLRs). Los TLRs son una familia de receptores capaces de reconocer estructuras conservadas filogenéticamente en diferentes microorganismos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos, en inglés "Patogen Associated Molecular Patterns" (PAMPs), entre los que se encuentran componentes de la

pared celular bacteriana, proteínas, ácidos nucleicos y lipopolisacáridos, entre otros (Kopp y Medzhitov, 1999; Ozinsky y cols., 2000; Takeda y cols., 2003).

Las células dendríticas (CD), consideradas las CPA profesionales por su capacidad de activar a los linfocitos T vírgenes, constituyen el puente entre la inmunidad innata y la adaptativa (Kaisho y Akira, 2003). Las CD expresan los TLRs y residen en diferentes órganos y en los tejidos periféricos donde censan el ambiente y capturan los antígenos debido a su gran capacidad fagocítica. Luego, éstas migran a los órganos linfoides secundarios donde presentan los antígenos en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) para la activación de los linfocitos T vírgenes (Sallusto y Lanzavecchia, 1994; Sallusto y cols., 1995; Winzler y cols., 1997; Kaisho y Akira, 2003). La naturaleza del estímulo recibido por las CD puede condicionar o modular los patrones de expresión de las moléculas del MHC y de las moléculas coestimuladoras. De esta forma, luego de la presentación del antígeno por las CD a los linfocitos T, las señales coestimuladoras entre estas células y el efecto de citoquinas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias dirigen el desarrollo de la respuesta primaria de células T (Kalinski y cols., 1999; de Jong y cols., 2002).

Actualmente se conoce que el procesamiento de antígenos exógenos adquiridos por las CD CD8 α y su presentación en MHC clase I (MHC-I), puede conducir a la activación cruzada del linfocito T CD8 $^{+}$ virgen y definir su tránsito hacia un linfocito T CD8 $^{+}$ citotóxico (CTL) activado (Heath y Carbone, 2001). El proceso de activación cruzada ocurre si las CD reciben las señales de maduración requeridas provenientes del estímulo inflamatorio asociado a una infección o de células T CD4 $^{+}$ activadas (Heath y cols., 2004). Esta habilidad de favorecer la presentación de antígenos exógenos en MHC-I e inducir a su vez

maduración de la CD presentadora del antígeno es crucial en un adyuvante vacunal para formulaciones contra bacterias intracelulares, virus y tumores (Melief, 2003).

Neisseria meningitidis es un patógeno que infecta sólo a humanos y causa más de 500 000 casos de meningitis con peligro para la vida y septicemia anualmente en todo el mundo (van Deuren y cols., 2000). La obtención de un Proteoliposoma (PL) derivado de la membrana externa del serogrupo B de *N. meningitidis* y su empleo como componente antigénico principal de la vacuna cubana anti-meningocócica VA-MENGOC-BC[®], ha sido uno de los acercamientos más eficientes para proteger contra este serogrupo (Sierra y cols., 1991; Milagres y cols., 1994; Noronha y cols., 1995; Perkins y cols., 1998; Tappero y cols., 1999). La capacidad del PL de activar un patrón de respuesta inmune Th1 ha sido previamente caracterizada por Pérez y cols. (2001). Este tipo de respuesta incluye la producción de interferón gamma (IFN γ), inducción de hipersensibilidad retardada, opsonofagocitosis y actividad bactericida del suero. Este último mecanismo ha sido generalmente aceptado como protector contra esta enfermedad y está mediado por la inmunoglobulina gamma (IgG) de la subclase 2a (IgG2a) en ratones y de las subclases 1 y 3 (IgG1 e IgG3) en humanos (Goldschneider y cols., 1969; Frasch, 1995).

El PL ha sido empleado en formulaciones contra la alergia causada por *Dermatophagoide siboney* (Lastre y cols. 2004). Además un derivado del PL ha sido empleado en monoterapias anti-tumorales aumentando la inmunogenicidad de gangliósidos altamente tolerados (Mesa y col., 2004). Estas experiencias constituyen antecedentes importantes al estudio de este PL como adyuvante.

El PL contiene diferentes PAMPs provenientes de *N. meningitidis*. Entre ellos se encuentra el lipopolisacárido (LPS) nativo, insertado en su estructura, que es considerado el principal

PAMPs de las bacterias Gram negativas y es reconocido por TLR4 (Akashi y cols., 2000; Takeda y cols., 2003). Además, el PL contiene porinas y posiblemente trazas de peptidoglicano que pueden ser reconocidos por TLR2 (Massari y cols., 2002).

Una potencialidad del PL, nunca antes explorada, es la incorporación de antígenos en su estructura. Esto, unido a los PAMPs que contiene, pudiera convertirlo en un atractivo adyuvante vacunal. **Sin embargo, no se ha caracterizado al PL como adyuvante, ni se han descrito sus interacciones con las CPA, así como tampoco se conoce el papel de los diferentes PAMPs presentes en el PL en estos eventos.**

Tomando en consideración los antecedentes y los problemas planteados, la **hipótesis** de este trabajo fue la siguiente: El Proteoliposoma tendrá capacidad adyuvante mediada por su efecto inmunopotenciador sobre CPA y por su habilidad para favorecer la presentación antigénica, eventos en los que tanto el LPS como los componentes no-LPS estarán implicados.

A partir de esta hipótesis nos propusimos los siguientes **objetivos**:

1. Evaluar la habilidad del Proteoliposoma para inducir la maduración de las células dendríticas y la activación de los macrófagos.
2. Evaluar el papel de los componentes no-LPS del Proteoliposoma en la inducción de la respuesta inmune de tipo Th1.
3. Evaluar el papel del LPS nativo insertado en el Proteoliposoma en la inducción de actividad bactericida.
4. Evaluar la capacidad del Proteoliposoma para entregar un antígeno a las células dendríticas, potenciar la activación de células T CD4⁺ e inducir la activación cruzada de células T CD8⁺.
5. Evaluar *in vivo* la capacidad adyuvante del Proteoliposoma sobre la ovoalbúmina incorporada en su estructura.

Los resultados que se presentan en esta tesis tienen **novedad científica** puesto que, por primera vez, se caracteriza al PL como adyuvante y se describen sus mecanismos de interacción con las CPA. Se demuestra que el PL propicia la activación cruzada de linfocitos T CD8⁺ específicos para un antígeno incorporado en su estructura lo que constituye una primera evidencia de su posible capacidad para inducir actividad CTL. Además, se explora la contribución de los PAMPs presentes en el PL a su capacidad inmunogénica e inmunopotenciadora. Desde el punto de vista experimental, se valida un novedoso método colorimétrico para determinar actividad bactericida.

Estos resultados tienen **valor científico** nacional e internacional ya que aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos de acción de los PL derivados de bacterias Gram negativas y acerca de las moléculas presentes en su estructura que tienen mayor impacto en las fases aferente y eferente de la respuesta inmune. Además, en el ámbito nacional, tienen **importancia práctica** puesto que el PL es un producto registrado para su uso en humanos como parte de VA-MENGOC-BC[®] y se obtiene a escala industrial, siguiendo Buenas Prácticas de Producción, en el Instituto Finlay. Por ello, la demostración de sus potencialidades permite emplearlo como adyuvante en nuevas formulaciones vacunales lo que puede tener un alto impacto social y económico.

La tesis está estructurada en 7 capítulos: Introducción (6 páginas), Revisión Bibliográfica (25 páginas), Materiales y Métodos (20 páginas), Resultados (24 páginas), Discusión (15 páginas), Conclusiones (1 página) y Recomendaciones (1 página). Además, se incluye una Tabla de Contenido, una lista de Abreviaturas y Acrónimos y una Síntesis del trabajo. También se presentan las Referencias Bibliográficas consultadas (181 citas, 26 páginas).

Los resultados de esta tesis forman parte de tres publicaciones internacionales y dos solicitudes de patentes y han sido presentados en ocho eventos científicos internacionales, entre los que se destaca el 12^{do} Congreso Internacional de Inmunología (Montreal, Canadá, Julio 2004), según se relaciona en la Autobiografía. Este estudio alcanzó la categoría de **Relevante** en el Forum de Ciencia y Técnica del Instituto Finlay y en el Forum de Ciencia y Técnica Municipal (está optando por el mismo premio a nivel provincial). Además, está optando por el Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba.

La pre-defensa de esta tesis se realizó ante el Consejo Científico de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana el 15 de Julio de 2004.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

II.1 *Neisseria meningitidis*

N. meningitidis es una bacteria patógena que infecta sólo a humanos, aunque bajo determinadas condiciones se puede reproducir la enfermedad en animales de experimentación (Arko, 1989). Al realizarles una tinción de Gram estas bacterias se observan al microscopio óptico como cocos aislados de 0,6-1,0 µm de diámetro o más frecuentemente en pares, diplococos, con los lados adyacentes aplanados. Estas bacterias son Gram negativas; pero tienen tendencia a resistir la decoloración del Gram. Los flagelos están ausentes y carecen de motilidad, son aerobios o anaerobios facultativos y colonizan la nasofaringe humana, allí pueden permanecer por períodos variados de tiempo sin causar la enfermedad, produciendo en el hospedero estadios de portador sano, cuya duración está en dependencia del estado de inmunidad de la persona (Goldschneider y cols., 1969).

La membrana externa de los meningococos aislados de pacientes con infecciones sistémicas está recubierta por una cápsula de polisacáridos de alto peso molecular (PM), los que constituyen uno de los factores más importantes de su virulencia. Tomando como base las inmunoreacciones de este polisacárido se han descrito los serogrupos: A; B; C; D; H; I; K; L; 29E; W135; X; Y y Z (Peltola, 1983; Frasch, 1994). Los serogrupos A, B, C, Y y W135 son los causantes de la mayoría de las epidemias de meningitis en el mundo (Pollard y Moxon, 2002).

La envoltura celular de *N. meningitidis* vista desde dentro hacia fuera, está formada por: la membrana citoplasmática rodeando el citoplasma, la capa de peptidoglicano y la membrana externa. La membrana externa está formada por una bicapa de lipopolisacáridos y fosfolípidos en la cual están embebidas las proteínas de membrana externa. Las principales

proteínas presentes en la membrana externa del meningococo han sido subdivididas en cinco clases estructuralmente diferentes, relacionadas con su PM y migración electroforética y son denominadas como P1 hasta P5 (Tsai y cols., 1981). En P1 y en P3, se encuentran dos regiones variables en la secuencia de aminoácidos que dan lugar a los epítopes de subtipos (Abdillahi y Poolman, 1987).

Las proteínas de clase 1 (P1 o PorA) son porinas muy abundantes que se encuentran en la mayoría de las cepas de *N. meningitidis*. PorA contiene epítopes funcionales (bactericidas) inmunodominantes (van der Voort y cols., 1996). Por ello, ha sido evaluada como candidato vacunal en vesículas de membrana externa extraídas de cepas genéticamente modificadas para la expresión simultánea de diferentes subtipos de PorA (van der Ley y cols., 1995; Cartwright y cols., 1999).

En todas las cepas de meningococo están expresadas las proteínas de clase 2 ó 3 (P2 y P3, respectivamente); pero nunca simultáneamente. Estas también cumplen con la función de porinas y se han descrito veintiuna variantes, formando la base del tipaje del meningococo. Se ha demostrado que los epítopes que describen a las proteínas de clase 2 y 3 tienen un fuerte componente conformacional y los anticuerpos monoclonales (AcM) contra éstas son ocasionalmente protectores y bactericidas en modelos animales (Kim y cols., 1989).

Otro de los componentes somáticos más importantes de *N. meningitidis* es el LPS que constituye la endotoxina de la membrana externa. Una vez liberado por la lisis bacteriana, el LPS participa en la patogenia de la enfermedad y es el causante del colapso endotóxico (Marsh y Wewers, 1996). El LPS permite clasificar a *N. meningitidis* en inmunotipos (Zollinger y Mandrell, 1980; Kim y cols., 1989).

La diseminación del meningococo normalmente ocurre por gotas de saliva que lo contienen y que se transportan en forma de aerosoles de una persona a otra, preferentemente en lugares donde existe hacinamiento (Peltola, 1983; Broome, 1986; Cartwright y cols., 1987). El desarrollo de la enfermedad meningocócica posterior a la colonización ocurre esporádicamente. El curso de la enfermedad comienza cuando el equilibrio bacteria-hospedero se rompe, permitiendo la entrada y diseminación de los meningococos en el torrente sanguíneo y/o en el fluido cerebroespinal. Los meningococos inicialmente colonizan la mucosa nasofaríngea y la ruta más probable por la cual entran a la sangre es desde la faringe por penetración del epitelio mucosal y drenaje a los nodos linfáticos regionales. Durante el curso de la infección, el crecimiento y lisis de los meningococos libera vesículas de membrana externa que diseminan al LPS a través de la circulación (Brandtzaeg y cols., 2001)

La presencia de los meningococos en el torrente sanguíneo puede causar síntomas clínicos muy variados. La fase más temprana de la enfermedad meningocócica presenta los síntomas clínicos de una influenza ordinaria, lo que dificulta su diagnóstico en su estadio inicial (Steven y Wood, 1995). La enfermedad meningocócica aguda puede presentar una amplia variedad de síndromes clínicos que van desde los muy graves: septicemia; colapso séptico y fallo múltiple de órganos con coagulación diseminada y muerte, hasta los síndromes ligeros sin riesgo para la vida. Las formas meníngeas son las habituales y ocurren cuando los meningococos, después de invadir la sangre desde la nasofaringe, cruzan la barrera hemato-encefálica y llegan al sistema nervioso central. Se requiere un tratamiento rápido en unidades de cuidados intensivos para salvar la vida del paciente y limitar las terribles secuelas de esta enfermedad (Pollard y Moxon, 2002).

II.2 Proteoliposoma derivado de *Neisseria meningitidis* B

Actualmente se están desarrollando vacunas contra los serogrupos A, Y y W135 basadas en la conjugación del polisacárido capsular a proteínas transportadoras. Estas vacunas se consideran la variante más promisorias para la inmunización contra estos serogrupos. Por su parte, Men C, vacuna que conjuga el polisacárido y las proteínas del serogrupo C está siendo usada en Europa con gran efectividad (MacLennan, 2001). Sin embargo, el polisacárido capsular del serogrupo B es un homopolímero de ácido siálico químicamente idéntico a polisacáridos que aparecen durante el desarrollo de los tejidos humanos, por ello es reconocido por el sistema inmune como un antígeno propio lo que lo hace pobremente inmunogénico aun después de ser conjugado a proteínas transportadoras (Pollard y Moxon, 2002). Además, su uso como vacuna pudiera introducir grandes riesgos de autoinmunidad (Finne y cols., 1983). Las dificultades en la producción de una vacuna de polisacárido efectiva contra el serogrupo B condujeron la investigación hacia otras estructuras de la superficie bacteriana como constituyentes vacunales. Debajo de la cápsula polisacáridica el meningococo está rodeado por la membrana externa, rica en proteínas y LPS.

La obtención de vesículas de membrana externa que contienen las principales proteínas del serogrupo B ha sido la estrategia más exitosa hasta el momento en el desarrollo de vacunas contra este serogrupo (Bjune y cols., 1991; Sierra y cols., 1991; Cartwright y cols., 1999). El PL que se estudia en este trabajo se obtiene a partir de la membrana externa de la cepa Cu 385-83 de *N. meningitidis* B y está constituido fundamentalmente por proteínas mayoritarias de serotipo y subtipo (PorA y PorB) y proteínas de alto PM como P70. Además, contiene fosfolípidos (fosfatidil etanolamina, fosfatidil glicerol, fosfatidil serina y

fosfatidil colina) y cantidades controladas de LPS (2 a 6% respecto al total de proteínas, pudiendo llegar a 10%) (Campa y cols., 1997).

En estudios sobre la respuesta inmune inducida por VA-MENGOC-BC[®], se ha demostrado la capacidad de esta vacuna de inducir anticuerpos con actividad bactericida, proliferación *in vitro* de LΦT, producción de niveles elevados de IFNγ e interleuquina 2 (IL2) por células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y respuestas positivas de hipersensibilidad retardada tanto en humanos como en modelos animales (Pérez y cols., 2001). Se ha demostrado también, la activación de otros mecanismos de tipo celular como la opsonofagocitosis, reclutamiento de macrófagos para la eliminación de las bacterias, así como la participación de radicales reactivos derivados del óxido nítrico (Padrón y cols., 1999). Estos resultados sugieren que VA-MENGOC-BC[®] induce una potente respuesta de tipo Th1 de la cual el PL es el responsable directo como componente antigénico principal de esta vacuna. Además, ha sido previamente demostrada la habilidad de este PL de inducir producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), IL-1β, IL-8, y quimoquinas por neutrófilos de humanos (Lapinet y cols., 2000).

El PL ha sido empleado en formulaciones contra la alergia, enfermedad que se caracteriza por la inducción de un patrón de respuesta Th2. La mezcla de antígenos del ácaro *Dermatophagoide siboney* con este PL ha mostrado revertir el patrón de respuesta inducido hacia Th1 (Lastre y cols., 2004)

Estructuras derivadas del PL, conocidas como proteoliposomas de muy pequeño tamaño, en inglés “very small size proteoliposomes” (VSSP), han sido empleadas en monoterapias anti-tumorales. Las VSSP han mostrado su capacidad de aumentar la inmunogenicidad de

los gangliósidos altamente tolerados induciendo un patrón de respuesta Th1 (Mesa y col., 2004).

II.3 Inmunidad innata

El sistema inmune innato está conservado filogenéticamente y lo poseen casi todos los organismos multicelulares (Hoffman y cols., 1999). La reciente identificación en mamíferos de los TLRs, ha demostrado que la inmunidad innata juega un importante papel en la detección de patógenos. Recientes evidencias demuestran que estos receptores reconocen los PAMPs y regulan la activación tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. En este contexto, las CD juegan un papel central, convirtiéndose en estimuladoras eficientes tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa luego de la activación microbiana (Lanzavecchia, 1998; Rescigno y cols., 1999).

II.4 Células dendríticas

Han sido descritas seis subpoblaciones principales de CD que se dividen en una subpoblación plasmacitoide y cinco subpoblaciones de CD convencionales. Las CD plasmacitoides no parecen ser importantes como CPA sino que su característica fundamental parece ser la producción de IFN $\alpha\beta$, de gran importancia en el control de las enfermedades virales. De las cinco subpoblaciones de CD convencionales, tres son derivadas de la sangre (CD CD4, CD CD8 y CD CD4⁻ CD8⁺) y dos son derivadas de tejidos (células de Langerhans y CD dermicas o intersticiales). De estas cinco subpoblaciones de CD convencionales, las CD CD8 son las principales activadoras de los linfocitos T virgenes (Heath y cols., 2004).

Las CD residen en órganos periféricos como la piel y las membranas mucosas expuestos al contacto con antígenos y también en los órganos linfoides secundarios, en diferentes

estadios de diferenciación y maduración. La función de las CD está directamente relacionada con su estado de diferenciación. Las CD inmaduras, que no han recibido ningún estímulo antigénico, son muy activas e internalizan los antígenos en forma soluble o particulada y emplean una variedad de mecanismos como: pinocitosis, macropinocitosis, fagocitosis o internalización mediada por receptores tales como el receptor de la porción Fc de las moléculas de IgG (FcγR) o receptor de manosa (Sallusto y Lanzavecchia, 1994; Sallusto y cols., 1995; Steinman y Swanson, 1995; Norbury y cols., 1997). Luego de recibir el estímulo antigénico o estar expuestas a otras señales de maduración tales como IL1β o TNFα, la capacidad de las CD para internalizar antígenos decrece dramáticamente mientras que se incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras tales como CD40, CD54, CD80, CD86, así como la expresión de MHC-I y MHC-II (Sallusto y Lanzavecchia, 1994; Sallusto y cols., 1995; Winzler y cols., 1997). La maduración de las CD también involucra una elevada producción de quimoquinas así como el incremento de los receptores de quimoquinas que facilitan su migración de la periferia a las áreas de células T de los órganos linfoides (Cyster, 1999; Sallusto y Lanzavecchia, 1999). De esta forma, las CD responden a múltiples señales que transmiten a los linfocitos para dirigir una respuesta inmune apropiada.

Recientemente, Granucci y cols., (2003) demostraron que las CD son capaces de producir IL2 luego de la estimulación bacteriana y que esta citoquina es la molécula clave que confiere a las CD, previamente activadas por productos bacterianos, la capacidad única de activar linfocitos T vírgenes. Dicho estudio demostró además, que diferentes estímulos microbianos; pero no citoquinas pro-inflamatorias, son capaces de estimular a las CD a producir IL2, lo que indica que las CD pueden distinguir un proceso inflamatorio mediado

por citoquinas de la presencia real de una infección. También recientemente, Jego y cols., (2003) demostraron la capacidad de las CD, previamente activadas, de producir IL6 cuya función parece ser la supresión del efecto regulador de las poblaciones de linfocitos T CD25⁺ sobre linfocitos T CD25⁻ permitiendo la activación y proliferación de los mismos. Crecientes evidencias sugieren que la naturaleza de los estímulos provenientes de los agentes externos recibidos por las CD, pueden condicionar o modular sus interacciones con los linfocitos T y determinar por tanto el tipo de respuesta T (Th1 o Th2) inducido. La capacidad de las CD de promover una respuesta de tipo Th1 se correlaciona con su habilidad de producir IL12 y existen PAMPs tales como el LPS, el motivo CpG del ADN bacteriano y el ARN de doble cadena viral que inducen la producción de IL12 por CD (Cella y cols., 1999; Sparwasser y cols., 1998; de Jong y cols., 2002). En contraste, otros PAMPs tales como la exotoxina de cólera, las hifas de *Candida albicans* y un producto secretado por el nematodo filaria, han sido descritos como moduladores de las CD hacia la promoción del patrón Th2 (d'Ostiani y cols., 2000; Gagliardi y cols., 2000; Whelan y cols., 2000). La naturaleza del estímulo microbiano recibido por las CD determina los patrones de expresión de MHC y moléculas coestimuladoras que tienen una influencia crítica en la diferenciación de los linfocitos T hacia Th1 o Th2 (Rescigno y cols., 1998; Kalinski y cols., 1999; de Jong y cols., 2002).

Recientemente se ha demostrado que el flujo de información entre las CD y los linfocitos es bidireccional. Las CD pueden integrar información proveniente de una célula T CD4⁺ de memoria y aplicarla para la activación de nuevas respuestas contra el mismo antígeno o contra un antígeno diferente. Esta contribución de las células T CD4⁺ de memoria puede

ocurrir tanto en los tejidos como en los nódulos linfáticos (Alpan y cols., 2004; Mosmann y Livingstone, 2004).

II.5 Macrófagos

Los MΦ son células derivadas de la médula ósea que entran en la sangre como monocitos. Los MΦ son células fagocíticas y endocíticas que expresan bajos niveles de MHC-II y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 a menos que sean activados por mediadores tales como el IFN γ (Seljelid y Eskeland, 1993). La exposición de los MΦ a citoquinas inflamatorias como el IFN γ provoca importantes cambios en las células que incluyen: incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras, incremento en la capacidad endocítica, secreción de citoquinas pro-inflamatorias y generación de compuestos reactivos que pueden destruir al patógeno fagocitado (Unanue, 1993). El estímulo inflamatorio recluta además gran número de MΦ del flujo sanguíneo al sitio local de la inflamación. Los MΦ tienen un importante papel como CPA debido a sus capacidades endocíticas y fagocíticas así como sus habilidades de incrementar la expresión de moléculas MHC-II y coestimuladoras luego de ser activados. Sin embargo, su función crítica es el establecimiento de la inflamación (Banchereau y Steinman, 1998; Steinman, 1999).

II.6 Receptores “Toll” de la inmunidad innata

Los receptores Toll fueron descritos por primera vez en *Drosophila* donde fueron originalmente identificados como receptores de transmembrana requeridos para el desarrollo embrionario (Hashimoto y cols., 1988). Posteriormente se descubrió que los receptores Toll de *Drosophila* además tenían un papel en la defensa del organismo contra infecciones fúngicas y un año después un homólogo de esta molécula fue identificado en mamíferos (Medzhitov y cols., 1997). Subsecuentemente, una familia de proteínas

estructuralmente relacionadas con las moléculas Toll fue identificada, llamándolas colectivamente receptores semejantes a Toll. Hasta la actualidad se han identificado 11 miembros (TLR1-TLR11) (Medzhitov y cols., 1997; Rock y cols., 1998; Takeuchi y cols., 1999; Chuang y Ulevitch, 2000; Du y cols., 2000; Chuang y Ulevitch, 2001; Zhang y cols., 2004). Los miembros de la familia TLR se caracterizan estructuralmente por la presencia de un dominio rico en leucina repetido en su dominio extracelular y un dominio citoplasmático similar al del receptor de IL1 conocido como dominio TIR, que está altamente conservado. La ruta de señalizaciones intracelulares de los TLRs conduce a la activación de NF- κ B, factor de transcripción responsable de muchos aspectos de las respuestas inflamatoria e inmune. El primer TLR identificado en mamíferos fue el TLR4 directamente involucrado en el reconocimiento del LPS, principal PAMP de las bacterias Gram negativas. Subsecuentemente, se ha demostrado que otros miembros de la familia TLR son esenciales para el reconocimiento de diferentes componentes microbianos como se muestra en la Tabla I.

La expresión de los TLRs es modulada por variados factores tales como, componentes bacterianos y citoquinas (Takeda y cols., 2003). La presencia de ARNm para la mayoría de los TLRs excepto TLR3 ha sido demostrada en monocitos/macrófagos (Muzio y cols., 2000). Por su parte, las CD expresan diferencialmente los TLRs en dependencia del subgrupo y del estadio de maduración. Las CD mieloides expresan TLR1, 2, 4, 5 y 8 mientras que las plasmacitoides sólo expresan TLR7 y 9 (Kadowaki y cols., 2001; Krug y cols., 2001; Jarrossay y cols., 2001; Ito y cols., 2002). Las CD inmaduras expresan TLR1, 2, 4 y 5; pero esta expresión decrece a medida que las CD maduran (Visintin y cols., 2001b). TLR3 es expresado sólo por CD maduras (Muzio y cols., 2000). La presencia de al

menos un tipo de TLR en todos los tejidos ha sido indicada siendo particularmente abundante en las CPA (Zarembek y Godowski, 2002).

Tabla I. Receptores semejantes a “Toll” de la inmunidad innata y sus ligandos

Familia TLR	Ligandos (origen)
TLR1	Tri-acyl lipopéptidos (bacterias, micobacterias)
	Factores solubles (<i>Neisseria meningitidis</i>)
TLR2	Lipoproteínas/lipopéptidos (patógenos variados)
	Péptidoglicano
	Ácido lipoteicoico (bacterias Gram positivas)
	Lipoarabinomanan (micobacterias)
	Glicoinositolfosfolipidos (<i>Trypanosoma cruzi</i>)
	Modulina fenol-soluble (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)
	Zymosan (hongos)
	Glicolípidos (<i>Treponema maltophilum</i>)
	Porinas (<i>Neisseria</i>)
	LPS atípico (<i>Leptospira interrogans</i>)
	LPS atípico (<i>Porphyrromonas gingivalis</i>)
	HSP70 (hospedero)
TLR3	ARN de doble cadena (virus)
TLR4	LPS (bacterias Gram negativas)
	Taxol (plantas)
	Proteínas de fusión del virus sincitial respiratorio (RSV)
	Proteínas de envoltura del virus de tumor mamario de ratón
	HSP60 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>)
	HSP60 (hospedero)
	HSP70 (hospedero)
	Dominio A tipo III extra repetido de fibronectina (hospedero)
	Oligosacáridos de ácido hialurónico (hospedero)
	Fragmentos de polisacárido de sulfato de heparan (hospedero)
	Fibrinógeno (hospedero)
TLR5	Flagelina (bacterias)
TLR6	Di acyl lipopéptidos (micoplasma)
TLR7	Imidazoquinolina (compuesto sintético)
	Loxoribina (compuesto sintético)
	Bropirimina (compuesto sintético)
TLR8	?
TLR9	CpG ADN (bacterias)
TLR10	?
TLR11	? (bacterias uropatogénicas)

La defensa del hospedero contra los microorganismos depende principalmente de las rutas de señalización intracelulares que se originan del dominio común TIR de los TLRs. La ruta de señalización de los componentes de la familia TLR es homóloga a la de la familia de receptores de IL1 (IL1R). Ambos, TLR e IL1R, interactúan con la proteína adaptadora MyD88 y activan una cascada de señales que conduce a la activación de NF- κ B. Es importante mencionar que, aunque MyD88 es esencial para la producción de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a variados componentes microbianos, el LPS es capaz de inducir activación de NF- κ B en macrófagos deficientes de MyD88; aunque con una cinética retardada (Kawai y cols., 1999). Otros componentes tales como la molécula adaptadora TIRAP/Mal, la molécula IRF-3 y más recientemente Tollip han sido identificados y se sugiere que están involucrados en la señalización independiente de MyD88 (Burns y cols., 2000; Fitzgerald y cols., 2001; Hong y cols., 2001; Kawai y cols., 2001; Bulut y cols., 2002; Zhang y Ghosh, 2002). Actualmente se sugiere que al igual que ocurre en las rutas de señalización del TLR4, cada TLR parece poseer su propia ruta de señalización adicional a la ruta común dependiente de MyD88 (Takeda y cols., 2003).

II.7 Reconocimiento del lipopolisacárido

Dos cepas de ratones, C3H/HeJ y C57BL10/ScCr, han sido identificadas como hiporespondedoras y no respondedoras al LPS, respectivamente. Los ratones C3H/HeJ tienen una mutación natural puntual en el gen que codifica para TLR4 que conduce al reemplazo de una prolina altamente conservada por una histidina en la región intracelular de este receptor. Esta mutación da lugar a la generación de un alelo negativo dominante que afecta la señalización mediada por TLR4 y suprime consecuentemente la respuesta al LPS (Ding y cols., 1995; Hoshino y cols., 1999, Jin y cols., 1999). Por su parte la cepa

C57BL10/CSR posee una mutación nula en el gen que codifica para TLR4 (Poltorak y cols., 1998; Qureshi y cols., 1999).

El reconocimiento del LPS requiere de otras moléculas, además del TLR4. El LPS se une a una proteína presente en el suero llamada proteína de unión al LPS, en inglés "LPS-binding protein" (LBP), formándose el complejo LPS-LBP que es subsecuentemente reconocido por CD14, un receptor glicosilfosfatidilinositol expresado preferencialmente en monocitos/macrófagos y neutrófilos. Luego de la estimulación por el LPS se produce una creciente proximidad física entre CD14 y TLR4, lo que sugiere que ambas moléculas interactúan durante el proceso de señalización (Jiang y cols., 2000 y Da Silva Correia y cols., 2001). La molécula MD-2 ha sido identificada por su capacidad de aumentar la respuesta al LPS mediante su asociación con la porción extracelular de TLR4 en el retículo endoplasmático y en el complejo de Golgi. (Shimazu y cols., 1999; Akashi y cols., 2000). El complejo MD-2/TLR4 se mueve a la superficie celular donde la molécula MD-2 excedente es secretada (Visintin y cols., 2001a). Mientras TLR4 reside en la superficie en células normales, es encontrado en el aparato de Golgi en células deficientes de MD-2, lo que indica que MD-2 es esencial en la distribución intracelular de TLR4 (Nagai y cols., 2002.). Además RP105, otra proteína de superficie celular, ha sido relacionada con el reconocimiento del LPS fundamentalmente en linfocitos B (Miyake y cols., 1995; Ogata y cols., 2000). De esta forma se evidencia que varios componentes están implicados en el reconocimiento del LPS indicando que el receptor funcional del LPS forma un gran complejo.

Existen LPS atípicos como los provenientes de *Leptospira interrogans* y *Pseudomona gingivalis* que son reconocidos a través de TLR2 a diferencia de TLR4, que reconoce LPS

provenientes de enterobacterias tales como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (Ferschfeld y cols., 2001; Werts y cols., 2001) y otras bacterias Gram negativas. Los LPS atípicos difieren estructuralmente de los LPS típicos en el número de cadenas acyl del lípido A (Netea y cols., 2002).

II.8 Procesamiento y presentación antigénica.

La visión clásica de procesamiento y presentación antigénica plantea que existen dos rutas diferentes, definidas por tres características fundamentales: el origen endógeno o exógeno del antígeno a ser presentado; el tipo de molécula MHC que presenta al péptido (MHC-I o MHC-II) y el tipo de células T estimuladas que pueden ser células T CD8⁺ citotóxicas o T CD4⁺ con función auxiliadora (Wolf y Ploegh, 1995; Heemels y Ploegh, 1995). Típicamente, las moléculas MHC-I son cargadas con péptidos derivados de antígenos endógenos sintetizados en el interior de la CPA. Estos antígenos son procesados dentro del citosol por el proteosoma y los péptidos resultantes son transportados al interior del retículo endoplasmático por el transportador asociado al procesamiento antigénico (TAP). Los péptidos se unen a las moléculas MHC-I dentro del retículo endoplasmático. En este proceso interviene un complejo mecanismo de carga en el que participan moléculas como tapasina, calreticulina y Erp57. Los complejos MHC-I-péptido resultantes son transportados a la superficie de la CPA para ser reconocidos por células T CD8⁺ (Heemels y Ploegh, 1995). En contraste, antígenos exógenos como las bacterias son internalizados por la CPA y procesados en el interior de los compartimentos fagolisosómicos. Los péptidos resultantes se unen a las moléculas MHC-II en estos compartimentos del sistema endosomal y son transportados a la superficie celular para ser reconocidos por las células T CD4⁺ (Wolf y Ploegh, 1995; Lechler y cols., 1996). Sin embargo, a pesar de la aparente

segregación de las rutas de clase I y II, antígenos de patógenos intracelulares tales como: micobacterias, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Brucella abortus* y *Leishmania*, han mostrado inducir respuesta de células T CD8⁺ dependiente de MHC-I, un proceso conocido como presentación cruzada (Houde y cols. 2003).

II.9 Presentación cruzada

Las CD CD8 α , fundamentalmente localizadas en las áreas de células T del bazo y de los nódulos linfáticos, son las principales responsables de la presentación cruzada de antígenos celulares. Esta habilidad es importante para la generación de la inmunidad mediada por células T citotóxicas necesaria contra antígenos variados, particularmente aquellos asociados a las infecciones virales, células tumorales y vacunación con ADN (Heath y cols., 2004).

Estudios recientes han demostrado la existencia de un compartimento híbrido resultante de la fusión de vesículas derivadas del retículo endoplasmático con el fagosoma. Estos compartimentos contienen MHC-I de nueva síntesis junto con los componentes requeridos para cargar los péptidos en MHC-I (TAP, tapasina, calreticulina y Erp57). Los antígenos fagocitados son transportados al citosol adyacente al fagosoma y son degradados por el proteosoma. Los péptidos resultantes son transportados por TAP al interior del mismo fagosoma donde son cargados por moléculas de MHC-I (Houde y cols., 2003; Guermonprez y cols., 2003; Heath y cols., 2004).

La presentación cruzada provee al sistema inmune de un importante mecanismo que puede conducir a la activación cruzada o tolerancia cruzada. La activación cruzada de células T requiere que las CD experimenten una maduración completa y expresen las señales requeridas (moléculas coestimuladoras y citoquinas) para la inducción de CTL efectores

y/o de memoria. También se requiere de la cooperación de las células T CD4⁺ auxiliaadoras con las CD para la proliferación de las células T CD8⁺ (Heath y cols., 2004). Sin embargo, las CD inmaduras conducen a la tolerancia cruzada, fenómeno que causa la tolerancia periférica a antígenos propios (Heath y Carbone, 2001 y Melief, 2003;).

II.10 Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa detecta los antígenos usando receptores clonales expresados en la superficie de células B y T. Con el objetivo de responder a un amplio rango de antígenos potenciales, las células B y T reorganizan los genes que codifican para las inmunoglobulinas y los receptores de células T (TCR) respectivamente, para generar más de 10¹¹ receptores de antígenos diferentes (Takeda y cols., 2003). El reconocimiento por parte de estos receptores del antígeno afín provoca la expansión del linfocito y la posterior producción de anticuerpos antígeno-específicos. Este sistema altamente sofisticado es observado sólo en vertebrados y constituye una potente defensa contra infecciones microbianas.

II.11 Diferenciación de la respuesta inmune adaptativa hacia un patrón Th1/Th2/Th3

El desarrollo de un patrón Th1 o Th2 define la diversidad de la respuesta inmune contra enfermedades infecciosas, alérgicas y autoinmunes. Se considera que tanto las células Th1 como las Th2 se diferencian a partir de un precursor común (células T CD4⁺ vírgenes), en dependencia del ambiente de citoquinas presente durante la estimulación antigénica primaria de las células T vírgenes (Kikkawa y cols., 2002). Se conoce que la diferenciación de células Th1 es inducida por IL12 (Kaplan y cols., 1996; Magram y cols., 1996). Por otra parte, se conoce que se requiere IL4 para la diferenciación de células T vírgenes en células Th2 efectoras (Kopf y cols., 1993; Takeda y cols., 1996). Además de las citoquinas antes

mencionadas, las señales mediadas por el TCR también influyen en la generación de células Th1 y Th2 (Constant y Bottomly, 1997).

Evidencias recientes han conducido a la descripción de un nuevo patrón de células T auxiliaoras Th3. Nuevas funciones supresoras de los patrones Th1 y Th2 se han descrito para distintas poblaciones de células T $CD4^+ CD25^+$ además de su bien establecido papel regulador natural (Tr) en el mantenimiento de la tolerancia a los antígenos propios. Se considera que estas células T antígeno específicas, llamadas Tr1 o Th3, son inducidas en la periferia luego del encuentro con patógenos y antígenos foráneos y secretan IL10 y/o factor de crecimiento transformante beta (TGF β); pero no IL4 y muy poco o ningún IFN γ , y son inducidas por CD semi-maduras bajo la influencia de citoquinas reguladoras. Las células Tr1 o Th3 al suprimir las respuestas Th1 y Th2 limitan la inmunopatología inducida por el patógeno (Mills y McGuirk, 2004).

II.12 Respuesta Th1

Basado en la producción de citoquinas, los linfocitos T $CD4^+$ han sido clasificados como células Th1 o Th2. Los linfocitos Th1 producen IFN γ e IL2 y median una respuesta inmune celular. Los linfocitos Th2 producen IL4, IL5 e IL10 y median una respuesta inmune humoral (Mosmann y Coffman, 1989; Romagnani, 1991). La respuesta Th1 se caracteriza por inducir la producción de las subclases de IgG fijadoras de complemento, principalmente IgG1 e IgG3 en humanos e IgG2a en ratones. Estos anticuerpos son los mediadores fundamentales de la actividad bactericida y opsonofagocítica del suero. Este tipo de respuesta Th1 incluye además la producción de IL18 y de citoquinas pro-inflamatorias importantes como IFN α/β (Le Bon y cols., 2003), producción de óxido nítrico y el reclutamiento de otras células no-específicas como los M Φ y los neutrófilos.

Más importante aún se considera la promoción de la actividad CTL, que puede ocurrir como consecuencia de la inducción de un patrón de respuesta Th1, imprescindible en la erradicación de los patógenos intracelulares y de las células tumorales (Romagnani, 1994; Kikkawa y cols., 2002).

II.13 Actividad bactericida del suero contra *Neisseria meningitidis* B

Estudios clásicos realizados por Goldschneider y cols., (1969) evidenciaron que la presencia de actividad bactericida en el suero de humanos se correlaciona con la protección contra la enfermedad meningocócica. No obstante, estos hallazgos se basaron fundamentalmente en resultados de infecciones por los serogrupos A y C; pero no del B. Estudios previos realizados por nuestro grupo han demostrado la inducción de un patrón preferencial Th1 por VA-MENGOC-BC[®] lo que implica la activación de mecanismos efectores diversos entre los que la opsonofagocitosis parece tener un papel importante contra el serogrupos B (Pérez y cols., 2001). No obstante, la actividad bactericida del suero continúa siendo el principal correlato de protección empleado en ensayos clínicos de nuevas formulaciones vacunales contra este serogrupos y es además la prueba exigida como tal en los requerimientos regulatorios existentes.

Los ensayos usados actualmente para la detección de anticuerpos bactericidas son trabajosos y la mayoría no están estandarizados. Sus dificultades radican fundamentalmente en lo engorroso de la siembra y conteo de colonias para la titulación. Estos factores, además de limitar el número de muestras a evaluar en un ensayo, le aportan un alto nivel de subjetividad a los resultados por depender completamente de la apreciación humana. Nuevos protocolos han sido desarrollados con la intención de mejorar los ensayos tradicionales para determinar la actividad bactericida del suero. Por ejemplo, Kriz y cols.,

(1999) describieron una modificación del micro-ensayo bactericida tradicional usando cloruro de trifeniltetrazolio en solución como un indicador para visualizar los resultados. Mountzouros y Howell (2000) describieron un ensayo basado en fluorescencia para el serogrupo B de *N. meningitidis*. La introducción de un nuevo ensayo para determinar la actividad bactericida del suero que elimine las dificultades de los tradicionales y permita disminuir las diferencias entre laboratorios continúa siendo un problema a resolver para la investigación de vacunas contra *N. meningitidis*.

II.14 Adyuvantes

Los adyuvantes ayudan a inducir una respuesta inmune temprana, elevada y de larga duración contra el antígeno, siendo necesario incluso menores concentraciones del mismo.

Los avances en los conocimientos acerca de los mecanismos de la inmunidad innata y el procesamiento y presentación de antígenos han revolucionado la definición tradicional de adyuvante por lo que se distinguen ahora sobre la base de sus mecanismos de acción en dos categorías fundamentales: inmunopotenciadores y sistemas de liberación de antígenos. Mientras los sistemas de liberación de antígenos localizan los componentes vacunales y los hacen diana de las CPA, los inmunopotenciadores activan las CPA a través de receptores específicos como los TLRs y proveen el contexto inflamatorio necesario para una óptima activación inmune antígeno específica (O'Hagan y Valiante, 2003).

Los adyuvantes pueden aumentar la inmunogenicidad de un compuesto por dos vías diferentes. Primero, los adyuvantes pueden convertir antígenos proteicos solubles en materiales particulados, los cuales son mejor procesados por las CPA. Por ejemplo, un antígeno puede ser absorbido en partículas de un adyuvante tal como la alúmina que lo retiene en el sitio de inoculación y aumenta de esta forma la respuesta inmune. También un

antígeno puede convertirse en particulado por emulsificación en adyuvantes tales como los aceites minerales o por incorporación en adyuvantes tales como ISCOMs. Aunque esto aumenta en alguna medida la inmunogenicidad del antígeno, tales adyuvantes son relativamente débiles a menos que contengan inmunopotenciadores. Estos productos son la segunda vía de los adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad de un preparado vacunal y constituyen los componentes más importantes de un adyuvante especialmente en términos de calidad de la respuesta inmune. En la Tabla II se relacionan los adyuvantes actualmente estudiados en el ámbito clínico o cercanos a éste (Kenney y cols., 2002).

Las diferentes ramas de la respuesta inmune adaptativa, incluyendo aquellas mediadas por los subtipos Th1 y Th2 de células T CD4⁺, juegan distintos papeles en la protección contra diferentes patógenos. Más aún, las células T reguladoras (Tr) que secretan citoquinas inmunosupresoras o inhiben la respuesta inmune por el contacto célula-célula, funcionan para mantener la tolerancia inmune y prevenir daños colaterales ocasionados por respuestas Th1 y Th2 hiperactivas. Por ello, las vacunas protectoras deben ser capaces de generar selectivamente la respuesta inmune requerida para proteger contra el patógeno, limitando la inducción de respuestas inhibitorias y sin causar efectos colaterales relacionados a excesivas reacciones inflamatorias (O'Hagan y Valiante, 2003).

Tabla II. Adyuvantes actualmente en el ámbito clínico o cercanos a éste

Adyuvante	Empresa	Comentarios
Sales minerales de Aluminio o Calcio	Superfos, Rehis y otras	Capacidad adyuvante dada por la acción de depósito que permite la liberación controlada de los antígenos a las CPA. Su uso en humanos es común. No se consideran eficientes para inducir la respuesta celular
MF59 (Emulsión microfluidizada de aceite de escualeno en agua)	Chiron	Licenciado para su uso en humanos como parte de una vacuna contra influenza dirigida a ancianos. Puede generar respuesta CTL
QS21 (Saponina glicósido triterpénico aislada de la corteza del árbol <i>Quillaja saponaria Molina</i>)	Aquila	Preparaciones acuosas obtenidas por simple mezcla de QS-21 en solución salina con el antígeno, funciona como un inmunoestimulador más que como un vehículo de depósito del antígeno. Puede generar respuesta CTL
AS02 (antiguo SBAS2)	GlaxoSmithKline	Emulsión aceite en agua que contiene Monofosforil lípido A (MPL) y QS-21. Reactogenicidad aceptable, bien tolerado en humanos en ensayos clínicos. Puede generar respuesta CTL
Montanide ISA-51	AirLiquide Seppic	Emulsión de agua en aceite basada en aceite mineral. Es equivalente al Adyuvante Incompleto de Freund. Permite una lenta liberación del antígeno. Favorece la respuesta de anticuerpos, la proliferación celular, así como la producción de IFN γ
Montanide ISA-720	AirLiquide Seppic	Emulsión de agua en aceite basada en aceite no mineral. Permite una rápida liberación del antígeno. Favorece la respuesta de anticuerpos, la proliferación celular, así como la producción de IFN γ
Virosomas	Berna Biotech	Sistemas de administración de antígenos con ventajas para uso mucosal. Han sido aprobados como parte una vacuna contra la influenza para humanos

Tabla II. Adyuvantes actualmente en el ámbito clínico o cercanos a éste (continuación)

Adyuvante	Empresa	Comentarios
Complejos inmunoestimuladores ISCOMS®	CSL	Complejos de saponinas, colesterol y fosfolípidos. Su toxicidad es moderada y de corto plazo. Puede generar respuesta CTL
Monofosforil lípido A MPL®	Corixa	Derivado lipopolisacárido proveniente de <i>Salmonella minnesota</i> , que contiene 6 ácidos grasos. Su mecanismo de acción involucra interacción con los TLRs de manera similar a lo que ocurre con los LPS. Bien tolerado en humanos en estudios clínicos. Puede generar respuesta CTL
AS04 (antiguo SBAS4)	GlaxoSmithKline	MPL® + sal de aluminio. Reactogenicidad aceptable, bien tolerado en humanos en ensayos clínicos. Puede generar respuesta CTL
Detox	Corixa	Combinación de MPL y el esqueleto de la pared celular de <i>M. phlei</i> . Aprobado para uso en humanos en Canadá como parte de una vacuna contra melanoma
Monosacáridos sintéticos acilados (AGPs)	Corixa	Usados en forma de emulsión de aceite en agua con 1-2% de escualeno o adsorbidos en alúmina. Bien tolerado en conejos.
DC-Chol	Aventis	Fosfolípidos neutros capaces de auto-organizarse en medio acuoso formando superficies catiónicas (liposomas) que pueden adsorber varios antígenos. Pueden generar respuesta CTL
Derivado del lípido A OM-174	OM Pharma	Derivado del lípido A proveniente de <i>E. coli</i> cuya toxicidad ha sido atenuada químicamente. Mantiene el esqueleto de difosfato de glucosamina propio del lípido A con sólo 3 lípidos asociados. Estimula la producción de IgG1 e IgG2a. Puede generar respuesta CTL
Oligodeoxinucleótidos CpG	Coley Pharmaceutical Group	Dinucleótidos citocina-guanina con citocinas no metiladas que aparecen al azar en las bacterias mientras que no se manifiesta en el ADN viral ni en el de los vertebrados. Induce patrón de respuesta Th1. Puede generar respuesta CTL

Tabla II. Adyuvantes actualmente en el ámbito clínico o cercanos a éste (continuación)

Adyuvante	Empresa	Comentarios
Toxina de cólera (CT) y la enterotoxina lábil de <i>E. coli</i> (LT) modificadas	Chiron	CT y LT genéticamente modificadas para proveer efectos adyuvantes no tóxicos
Virus Vaccinia (Ankara) Modificado	Adrian Hill	Virus vaccinia modificado con insertos relevantes, empleado para dosis de refuerzo en vacunas de ADN
Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, en inglés “granulocyte macrophage colony stimulating factor”(GM-CSF)	Vical	Inmunomodulador endógeno humano. Se emplea un plásmido que codifica para esta citoquina para incrementar respuesta inmune a vacunas de ADN
IL12	Genetic Institute	Inmunomoduladores endógenos humanos. IL12 es un potente estimulador de respuesta inmune de tipo Th1. Se encuentra en planes un estudio fase I en humanos
Immudaptin™	Adprotech	Arreglos en tándem de C3d. Es capaz de dirigir a los antígenos hacia las células B y las CD. Estimula la inmunidad humoral
VSSP	Centro de Inmunología Molecular. Cuba	Gangliosidos incorporados en complejos de membrana externa de <i>N. meningitidis</i> . Induce respuesta Th1
Acemanan	-	Polisacárido mayoritario del gel de la hoja de <i>Aloe Barbadensis miller</i> . Estimula actividad citotóxica mediada por células T y NK. Evaluado como adyuvante mucosal en un estudio clínico fase I con el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (CIGB-CENATOX, 2002)
Quitosa	-	Polisacárido de origen natural, de cadena lineal, extraído por procesos químicos del caparazón de crustáceos del que forma parte como quitina. Actividad por vía intranasal

II.15 Citometría de flujo

Los citómetros de flujo analizan células en suspensión que interfieren de forma individual con una fuente de luz. Para ello, cuenta con un sistema transportador de partículas y un sistema de detección de la luz. Las células suspendidas en una solución fisiológica son inyectadas bajo presión en el sistema de fluidos que las transporta hacia un haz de luz focalizada el cual, al chocar con las células, se desvía y es registrado por detectores especiales. La intersección de cada célula con la luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permite diferenciar poblaciones celulares dentro de la muestra analizada por su tamaño relativo y por sus granulaciones. Si además, se acoplan a las células anticuerpos conjugados con un fluorocromo, éstas emitirán luz de determinadas longitudes de onda la cual puede ser registrada por fotodetectores ubicados perpendicularmente al fluido que las transporta. La información se transforma en pulsos eléctricos por el sistema electrónico y se almacena en la memoria de una computadora para ser posteriormente analizada utilizando programas computacionales especializados (Janeway y cols., 2001).

La citometría de flujo, es un método de lectura rápido, que permite analizar un elevado número de células (de 10000 a 50000 para cada anticuerpo monoclonal) y proporciona un registro computarizado de los resultados. El mismo permite medir los más diversos parámetros celulares tales como antígenos de superficie, citoplasmáticos y nucleares, contenido de ácidos nucleicos, actividad enzimática, flujo de calcio, potencial de membranas y pH y la determinación de la actividad proliferativa de la población celular entre otras. La detección y cuantificación de antígenos mediante anticuerpos monoclonales

marcados con diferentes fluorocromos permite la identificación y clasificación de diferentes células tanto normales como patológicas. El isotiocianato de fluoresceína (FITC), la ficoeritrina (PE) y el PerCP son los fluorocromos más empleados en el marcaje de anticuerpos monoclonales. Todos ellos se excitan a 488 nm (luz azul) y emiten en la zona del verde, naranja y rojo, respectivamente. El citómetro mediante una compensación electrónica permite su utilización simultánea. La posibilidad de realizar un triple marcaje con diferentes anticuerpos monoclonales en una misma muestra ha permitido profundizar en el conocimiento de las diferentes poblaciones celulares estudiadas (Simon y Bono, 2002).

III. MATERIALES Y METODOS

III.1 Obtención del Proteoliposoma

EL PL se preparó a partir de la membrana externa de *N. meningitidis* B cepa Cu 385-83 (B:4:P1.19.15;L3,7,9) por extracción con desoxicolato de sodio (DOC) al 10% (Merck, Darmstadt, Alemania) según los procedimientos de manufactura del Instituto Finlay (Campa y cols., 1997). Los restos celulares se removieron por centrifugación y los ácidos nucleicos se eliminaron por tratamiento enzimático con desoxiribonucleasa y ribonucleasa (5 µg/mL) (Merck, Darmstadt, Alemania). EL PL se purificó por cromatografía de filtración en gel Sephacryl S-300 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y se conservó disuelto en DOC al 0,5%. El PL final contenía las principales proteínas de la membrana externa (P1 y P3), un complejo de proteínas de 65 a 95 kDa, 5,4% de LPS insertado (con respecto al total de proteínas) y fosfolípidos. Todos los experimentos se realizaron con un mismo lote de PL con una concentración de proteínas de 3 mg/mL.

III.2 Inclusión de ovoalbúmina en el Proteoliposoma

El PL, a una concentración proteica de 3 mg/mL, se disolvió en 30 mmol/L de solución Tris (Fluka, Suiza) con ácido etilendiaminotetra-acético (sal disódica) (EDTA) (2 mmol/L) (BDH, Poole, Reino Unido) (Tris-EDTA) y 1,5% de DOC con el objetivo de desestabilizar la estructura proteoliposómica y obtener micelas mixtas proteínas/lípidos/detergente. Se adicionó la ovoalbúmina (OVA) fracción V (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) a una concentración final de 2,6 mg/mL. Se dializó la mezcla contra cinco cambios de Tris-EDTA en 24 h para eliminar el detergente y formar las estructuras proteoliposómicas con OVA encapsulada (PL-OVA). Los PL-OVA, se purificaron por cromatografía de filtración en gel en Sephacryl S-300 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia). Teniendo en

cuenta que el PL eluye en el volumen muerto de esta matriz, se colectó el pico cuyo perfil cromatográfico coincidió con el perfil conocido de los PL no tratados. La presencia de OVA en el interior del PL se confirmó por la técnica de electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y por inmunotransferencia (Western blotting) con un suero policlonal específico contra OVA. La concentración final de OVA incorporada en el PL se estimó por densitometría al analizar las bandas correspondientes en el gel de poliacrilamida (BDH, Poole, Reino Unido) teñido con Azul Coomassie (Serva, New York, EUA) con el empleo de un digitalizador de imágenes ImageMaster[®]VDS y del programa ImageMaster 1D elite, ambos de Pharmacia Biotech.

III.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio

El análisis electroforético se realizó en gel de acrilamida al 12,5%, con un 1 mm de espesor y con duodecil sulfato de sodio (SDS) (Merck, Alemania) al 0.1% (Ausbel y cols., 1995). Las muestras se prepararon a una concentración de 1 mg/mL de proteína en el tampón para el tratamiento de las muestras (2% (p/v) SDS, 60 mmol/L de solución Tris con HCl (Tris-HCl) (pH 6,8), 10% (v/v) glicerol (Merck, Alemania), 0,001% (p/v) bromofenol azul (SIGMA, St. Louis, MO, EUA)) y se calentaron a 100°C durante 10 min. Se aplicaron 10-25 µg de proteína por carrilera. Las corridas electroforéticas se realizaron a 80 V, durante 90 min y los geles fueron teñidos con Azul Coomassie para la visualización de las bandas proteicas.

III.4 Inmunotransferencia

La transferencia electroforética se realizó en cámara sumergida (BioRad, EUA) durante 14-16 h, a 4°C, con una intensidad de corriente de 30 mA y se empleó una membrana de

nitrocelulosa (Hybond™-C extra, EUA). Después de la transferencia, se procedió a bloquear los sitios libres de la membrana con leche descremada (Merck, Alemania) al 5% en solución salina tamponada con fosfato (SSTF) 0,15 mol/L (pH 7,2) durante 1 h, a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió un suero policlonal específico contra OVA diluido 1:200 en SSTF con leche descremada al 1% (p/p) y Tween 20 al 0,01% (v/v) (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) y se incubó durante 14-16 h a 4°C. Se adicionó un anticuerpo conjugado a peroxidasa (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) específico contra la IgG de ratón, diluido 1:5000 en SSTF y Tween 20 al 0,01% (v/v), durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, se realizó el revelado de las bandas mediante la adición de la solución de sustrato que contenía peróxido de hidrógeno (0,015%, v/v) (Fluka, Suiza), diaminobencidina (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) (0,5 mg/mL), dimetilsulfóxido (1%, v/v) (Merck, Alemania) y cloruro de cobalto (2%, v/v) (Merck, Alemania) en tampón citrato (ácido cítrico 0,1 mol/L (BDH, Reino Unido) y Na₂HPO₄ 0,2 mol/L, pH 5). Entre cada paso de incubación se realizaron cinco lavados de 5 min cada uno, con SSTF y Tween 20 al 0,01% (v/v).

III.5 Preparación de la emulsión TiterMax Gold-ovoalbúmina

El adyuvante comercial TiterMax Gold (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) se empleó como control positivo para inducir respuesta inmune contra OVA. TiterMax Gold se atemperó a la temperatura del laboratorio y se agitó durante 30 segundos para asegurar una suspensión homogénea antes de proceder a la emulsificación. Para preparar 1 mL de la emulsión agua en aceite, TiterMax Gold-OVA (T-OVA), se cargó una jeringuilla con 0,5 mL de TiterMax Gold y otra jeringuilla con 0,25 mL de OVA en solución acuosa (100 µg/mL). Las jeringuillas se conectaron entre sí a través de una llave de paso plástica de tres direcciones y

se dejó pasar el antígeno acuoso al interior del adyuvante. Se mezcló el contenido de ambas jeringuillas durante dos minutos. Se pasó todo el contenido a una de las jeringuillas y se repitió el proceso con 0,25 mL más de OVA en solución acuosa. Para ello, se reconectaron las jeringuillas y se emulsificó el contenido durante 60 segundos.

III.6 Animales de experimentación

Ratones C57BL/6 (H2-D), C3H/HeN (H2-K) y C3H/HeJ (H2-K), hembras de 6-8 semanas de edad, se adquirieron de Harlan Olac Ltd. (Blackthorn, Bicester, Reino Unido) y se mantuvieron en la unidad de animales del Departamento de Medicina Clínica Veterinaria de la Universidad de Cambridge, Reino Unido.

Los ratones C57BL/6 (H2-D) se seleccionaron para los experimentos de estimulación antigénica de CD y MΦ y para los experimentos de presentación antigénica debido a que el hibridoma de células T CD8⁺ empleado es específico para el fragmento peptídico OVA(257-264) presentado en el contexto de una molécula MHC-I de tipo H2-D. Los ratones C3H/HeN (H2-K) y C3H/HeJ (H2-K) se seleccionaron como modelo para estudiar el papel del LPS en la inmunogenicidad y capacidad adyuvante del PL.

III.7 Inmunización

Se emplearon cuatro grupos de ratones C3H/HeN y cuatro de ratones C3H/HeJ, con cinco animales cada uno. Antes de la inmunización, se tomaron muestras de sangre para evaluar respuesta inmune contra el PL o contra OVA. Ratones de ambas cepas se inmunizaron intramuscularmente con dos dosis de 5 µg de PL o PL-OVA con un intervalo de 14 días. SSTF se empleó como control negativo aplicado bajo las mismas condiciones que PL-OVA. Un grupo de cada cepa se inmunizó con una dosis de 10 µg de la emulsión T-OVA dividida en cuatro inoculaciones de 25 µL que se aplicaron en diferentes sitios

intramusculares según las indicaciones del proveedor de TiterMax Gold (SIGMA, St. Louis, MO, EUA). Todos los sueros se obtuvieron a los 14 días de la segunda dosis de PL-OVA y única de T-OVA.

III.8 Obtención de macrófagos y células dendríticas

Las células de la médula ósea se extrajeron del fémur de ratones C57BL/6, C3H/HeN o C3H/HeJ. Para ello, se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se desinfectaron con alcohol al 70% antes de comenzar la técnica de aislamiento de células de médula ósea. Se limpiaron los huesos de las patas traseras en placas de Petri con RPMI 1640. Se cortaron cuidadosamente las cabezas de los huesos y se extrajo la médula ósea con jeringuilla de 1 mL (aguja de 0,45 mm). Se centrifugaron las células a 1600 rpm durante 10 min a 4°C.

Los MΦ se obtuvieron a partir de las células de médula ósea de ratones C57BL/6, C3H/HeN o C3H/HeJ según describieron Yrliid y Wick (2000). Las células de médula ósea se cultivaron a una concentración de 3×10^5 células/mL en placas de Petri con RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF, 5% de suero de caballo, L-glutamina 2 mmol/L, 2-mercaptoetanol (2-ME) 0,05 mmol/L, gentamicina (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), piruvato de sodio 1 mmol/L y 15% de sobrenadante de cultivo de la línea celular L929 (Colección Americana de Cultivos Tipo, en inglés “American Type Culture Collection” (ATCC)) que produce factor estimulador de colonias de macrófagos, en inglés “macrophage colony stimulating factor” M-CSF (Rettenmier y Sherr, 1989; Majorov y cols., 2003; Pang, 2003). Los días 3 y 6 de cultivo la población de MΦ, células adherentes, se recogió por raspado del fondo de las placas de Petri, se centrifugó a 1600 rpm durante 10 min a 4°C y se volvieron a distribuir en Placas de Petri con medio de cultivo fresco suplementado como se describió

anteriormente. Finalmente la población de MΦ recogió siempre entre los días 8-14 y para ello se lavó con SSTF, se removió del plástico con SSTF y 0,1% EDTA frío y posteriormente se lavó dos veces con SSTF. La población obtenida se confirmó por Citometría de flujo empleando AcMs anti-CD11c, -CD11b, -CD19 y -TCRαβ. El criterio fenotípico asumido para caracterizar MΦ fue que siempre expresaran CD11b y no expresaran CD11c, CD19 y TCRαβ (Yrlid y Wick 2000).

Para obtener CD, se cultivaron las células de médula ósea durante 6 días a una concentración de 3×10^5 células/mL en placas de 6 pozos con medio RF10 (RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), L-glutamina 2 mmol/L, 2-ME 0,05 mmol/L, y gentamicina (5 μg/μL)) suplementado al 20% con sobrenadante de cultivo de la línea celular X63-Ag8, plasmacitoma transfectado con un vector para la expresión de GM-CSF (Inaba y cols., 1992; Lu y co. 1999; Yokota y cols., 2003). La población obtenida se confirmó por Citometría de flujo empleando AcMs anti-CD11c, -CD11b, -CD19 y -TCRαβ. El criterio fenotípico asumido para caracterizar las CD fue que siempre expresaran CD11c y CD11b y no expresaran CD19 y TCRαβ (Yokota y cols., 2003).

III.9 Estimulación antigénica de macrófagos y células dendríticas

Los MΦ se pasaron a placas de 6 pozos con medio RF10 (2×10^6 /mL). En ensayos realizados para seleccionar la concentración de PL, se estimularon MΦ por adición de 1, 5 ó 10 μg/mL de PL. En ensayos realizados para determinar efecto del DOC en la activación de los macrófagos, se estimularon los MΦ con DOC al 0,5% (3 μL/pozo) durante 18 h. Posteriormente, se estimuló siempre con 5 μg/mL de PL. Células no estimuladas (incubadas sólo con medio de cultivo) y células estimuladas con 1 μg/mL de LPS de

Salmonella typhimurium (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) se incluyeron como controles negativo y positivo, respectivamente, en todos los ensayos realizados.

Las CD se estimularon con PL (5 µg/mL), LPS (1 µg/mL) o medio de cultivo directamente en los pozos en los que fueron diferenciadas (3×10^5 /mL). Para medir la expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) las células se estimularon durante 18 h a 37° C y 5% de CO₂. Para medir la producción de TNFα e IL12 los sobrenadantes de cultivo se colectaron entre 4 h ó 24-48 h luego de la estimulación antigénica. Todos los productos empleados fueron suministrados por SIGMA (St. Louis, MO, EUA).

III.10 Citometría de flujo

Los AcMs contra los marcadores de superficie celular de ratón CD16/CD32, TCR-αβ, CD19, CD11b, CD11c, CD80, CD86, CD40, MHC-II (I-A/I-E), así como los controles de isotipo apropiados y el resto de los reactivos usados para la citometría de flujo se adquirieron de BD PharMingen (Cowley, Oxford, Reino Unido). Todos los anticuerpos empleados estaban directamente conjugados a FITC o PE.

Las células se incubaron a 4°C durante 25 min en 25 µL de solución de bloqueo (AcM anti-CD16/CD32 diluido en solución salina de Hanks balanceada (SSHB) con 2% de SBF, 10% de suero de ratón, 0,01% de azida sódica y 1% de ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES)). Las células se inmunotñeron con el anticuerpo apropiado marcado con un fluorocromo a 4°C durante 30 min en 25 µL de la solución de trabajo para el equipo clasificador de células activadas por fluorescencia, en inglés “fluorescence activated-cell sorter” (FACS) (SSHB con 2% de SBF, 0,01% azida sódica y 1% HEPES). Las células fueron lavadas con solución de FACS y adquiridas en un

citómetro de flujo FACSCalibur de Becton Dickinson Ltd. (Cowly, Oxford, Reino Unido). El análisis de los datos se basó en la adquisición de 10000 células en todas las muestras procesadas y se realizó con el programa WinMDI versión 2,8.

III.11 Determinación de TNF α e IL12(p70)

El TNF α y el heterodímero funcional de 70 kDa de la IL12 (IL12(p70)) se determinaron por un Inmunoensayo de enzima unida, en inglés “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) con pares de anticuerpos y citoquinas recombinantes suministrados por Becton & Dickinson Ltd. (Cowly, Oxford, Reino Unido).

Para determinar las concentraciones de TNF α , las placas de 96 pozos (Maxisorp Nunc Immuno plate, Nunc, Roskilde, Dinamarca) se recubrieron con 50 μ L/pozo de un AcM de rata purificado, IgG1 anti-TNF α de ratón (clon G281-2626) que se usó como anticuerpo de captura. Este anticuerpo fue diluido en 0,1 mol/L de solución de fosfato de sodio (pH 6,0) a 5 μ g/mL. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Luego de bloquear con SSTF suplementado con 10% de SBF 1 h a 37°C, se distribuyeron 100 μ L/pozo de los sobrenadantes de los ensayos de estimulación de CD y M Φ (tres réplicas de cada muestra). Las placas se incubaron a 37°C por 2 h. Diluciones dobles seriadas de TNF α recombinante de ratón en un rango entre 10 ng/mL y 156 pg/mL se incluyeron como curva estándar en todas las placas. Se adicionaron 100 μ L/pozo de un AcM de rata biotinilado, IgG1 anti-TNF α de ratón (clon MP6-XT3) a una concentración de 2 μ g/mL en SSTF-10% SBF por 1 h a 37°C, luego de lo cual se adicionaron 100 μ L/pozo de estreptavidina-peroxidasa a 2,5 μ g/mL (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) durante 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron cinco veces con SSTF y se adicionaron 100 μ L/pozo de una solución del sustrato peróxido de hidrógeno 0,01% (v/v) y del cromógeno *ortho*-

fenilendiamina (OPD) 0,6 mg/mL en solución tampón sustrato (Na_2HPO_4 52 mmol/L y ácido cítrico 25 mmol/L (pH 5,6)) y se incubaron en la oscuridad durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μL de una solución de H_2SO_4 2 mol/L. La densidad óptica (DO) se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Labsystems Multiskan[®] Multisoft). Las concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ se determinaron por comparación con la curva estándar y se expresan en pg/mL. El límite de detección de este ensayo, menor cantidad de $\text{TNF}\alpha$ que puede ser detectada bajo nuestras condiciones experimentales, fue 59 pg/mL. Este límite de detección se calculó luego de verificar la normalidad de la distribución de los valores de DO de 20 muestras negativas. Al promedio de estos valores se le adicionó la desviación estándar (DE) de los mismos multiplicada por tres. La concentración correspondiente se obtiene interpolando este valor en una curva de calibración (Broughton y cols., 1986)

Para las determinaciones de IL12, se utilizó un ELISA como el descrito anteriormente. El AcM de captura, purificado de rata, IgG2b anti-IL12(p70) de ratón (clon 9A5) se diluyó en solución de fosfato de sodio 0,1 mol/L (pH 9,0) a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se incluyeron como estándar diluciones dobles seriadas de IL12 recombinante de ratón en un rango entre 10 ng/mL y 156 pg/mL. Se usó un AcM de rata biotinilado, 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$, IgG2a anti-IL12(p40/p70) de ratón (clon C17.8) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las concentraciones de IL12(p70) se determinaron por comparación con la curva estándar y se expresan en pg/mL. El límite de detección de este ensayo fue de 94 pg/mL. El mismo se calculó según se describió anteriormente.

III.12 Determinación de células dendríticas productoras de TNF α e IL12(p70)

Las CD productoras de TNF α e IL12 se determinaron por un ensayo inmunoenzimático, en inglés “Enzyme-linked immunospot assay” (ELISPOT). Las placas de ELISPOT de 96 pozos con fondo de nitrocelulosa (MultiScreen HA, Millipore, Watford, Reino Unido) se cubrieron con 100 μ L del AcM de captura anti-TNF α o anti-IL12 de ratón a 4 μ g/mL en SSTF y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, las placas se lavaron con SSTF y se saturaron con 100 μ L de medio de cultivo RF10. Las CD se distribuyeron en las placas en diluciones dobles seriadas (comenzando en 1×10^5 células/pozo), por duplicado y se incubaron con 5 μ g/mL de PL, 1 μ g/mL de LPS de *S. typhimurium* (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) o con medio de cultivo durante 18 ó 48 h para medir la producción de TNF α o IL12, respectivamente. Se incluyeron TNF α o IL12 recombinante de ratón, 0,01 μ g/pozo, por duplicado como control positivo en todas las placas. Las placas se lavaron con SSTF y se incubaron con 1 μ g/mL de AcM biotinilado anti-TNF α o anti-IL12 por 2 h a 37°C. Luego de varios lavados con SSTF se adicionó ExtrAvidin fosfatasa alcalina (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) (dilución 1:1000) por 1 h a 37°C. Las placas se lavaron nuevamente con SSTF y se revelaron con sustrato cromogénico conjugado a fosfatasa alcalina SIGMA Fast[®] (SIGMA, St. Louis, MO, EUA). Luego de 30 min, se lavaron las placas con agua corriente y se dejaron secar al aire toda la noche. Las manchas (en inglés: “spots”) se visualizaron a través de un microscopio estereoscópico (magnificación 40X). Sólo las manchas grandes y redondas se contaron como células formadoras de manchas (CFS) que se consideran células productoras de TNF α o IL12. Los resultados se presentan como el número de CFS por

millón de células detectado cuando las CD se cultivaron en presencia del antígeno, luego de ser corregido con el nivel de fondo obtenido en ausencia del antígeno.

III.13 ELISA de IgG

Placas de 96-pozos de alta capacidad de unión (Costar Laboratories, Cambridge, Mass, EUA) se cubrieron con una solución de 20 µg/mL de PL o de 25 µg/mL de OVA diluidas en solución tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 11 mmol/L, NaHCO_3 35 mmol/L (pH 9,6)). Las placas se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda y se lavaron tres veces con SSTF. Luego de bloquear con solución de bloqueo (seroalbúmina bovina (SAB) al 1% (p/v) en SSTF) 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda, las placas se lavaron tres veces con solución de lavado (SSTF, Tween 20 0,1% (v/v), pH 7,4). El suero de referencia y los sueros a evaluar se diluyeron 1:100 en solución de bloqueo más Tween 20 0,1% (v/v). Se aplicaron 100 µl/pozo por duplicado de las diluciones de los sueros individuales y del suero de referencia. Las placas se incubaron a 37°C por 2 h luego de lo cual se lavaron cinco veces con SSTF. Se adicionaron 100 µl/pozo de un AcM de carnero anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), diluido 1:2000 en solución de bloqueo más Tween 20 0,1% (v/v), durante 2 h a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, se lavaron las placas cinco veces con SSTF, se adicionaron 100 µL/pozo de una solución del sustrato peróxido de hidrógeno 0,01% (v/v) y del cromógeno OPD 0,6 mg/mL en solución tampón sustrato (Na_2HPO_4 52 mmol/L y ácido cítrico 25 mmol/L (pH 5,6)) y se incubaron en la oscuridad durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de una solución de H_2SO_4 2 mol/L. La DO se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Labsystems Multiskan[®] Multisoft). Como estándar interno de anticuerpos, para los ensayos de IgG anti-PL, se empleó una curva elaborada con diluciones dobles seriadas de

un suero de ratón positivo, obtenido a partir de un suero de referencia para el serogrupo B de meningo, proveniente del Centro para el Control de las Enfermedades, en inglés “Center for Control of Diseases” (CDC de Atlanta). Mediante el empleo de la curva sigmoideal estándar, se le asignaron 4000 U/mL de anticuerpos IgG anti-PL al máximo punto de la curva y 31,25 U/mL al punto mínimo (Ferriol y cols., 1999). Los resultados de IgG anti-PL se calcularon interpolando la DO obtenida en cada uno de los sueros con la curva patrón elaborada con el suero de referencia y se expresan en U/mL. El límite de detección de este ELISA de IgG anti-PL fue de 63 U/mL. El mismo se calculó según se describió anteriormente. Los resultados de IgG anti-OVA se expresan en DO.

III.14 ELISA de subclases de IgG

Las subclases de IgG se determinaron por un ELISA con el sistema de amplificación estreptavidina-biotina. Placas de 96-pozos de alta capacidad de unión (Costar Laboratories, Cambridge, Mass, EUA) se cubrieron con una solución de PL 20 µg/mL o de OVA 25 µg/mL diluida en solución tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 11 mmol/L, NaHCO_3 35 mmol/L (pH 9,6)). Las placas se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda y se lavaron tres veces con SSTF. Luego de bloquear con solución de bloqueo (solución de SAB al 1% (p/v) en SSTF 1X) 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda, las placas se lavaron nuevamente tres veces con SSTF 1X, Tween 20 0,1% (v/v), pH 7.4. Los sueros a evaluar y el suero de referencia se diluyeron de 1:100 hasta 1:800 en diluciones dobles seriadas en solución de bloqueo más Tween 20 0,1% (v/v). Se aplicaron 100 µL/pozo por duplicado de las diluciones de los sueros individuales y del suero de referencia. Las placas se incubaron a 37°C por 2 h luego de lo cual se lavaron cinco veces con SSTF. Se aplicaron 100 µL/pozo de los AcMs de carnero anti-IgG1 o anti-IgG2a de ratón biotinilados

(Amersham International, Little Chalfont, Reino Unido), diluidos 1:1000 en solución de bloqueo más Tween 20 0.1% (v/v), durante 2 horas a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, se añadió estreptavidina-peroxidasa (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) en una dilución 1:2000 en solución de bloqueo más Tween 20 0,1% (v/v) y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente, las placas se lavaron cinco veces con SSTF y se adicionaron 100 µL/pozo de una solución del sustrato peróxido de hidrógeno 0,01% (v/v) y del cromógeno OPD 0,6 mg/mL en solución tampón sustrato (Na₂HPO₄ 52 mmol/L y ácido cítrico 25 mmol/L (pH 5,6)) y se incubaron en la oscuridad durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de una solución de H₂SO₄ 2 mol/L. La DO se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Labsystems Multiskan[®] Multisoft). Los resultados se expresan como la media de la relación matemática IgG2a/IgG1 en el suero de cinco animales por grupo. Además se presentan los niveles medios de DO por grupo, para cada subclase, en las diferentes diluciones del suero evaluadas.

III.15 Aislamiento, cultivo y re-estimulación *in vitro* de células de bazo de animales inmunizados con Proteoliposoma

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se desinfectaron con alcohol al 70% antes de comenzar la técnica de aislamiento de células de bazo. Una vez extraído el bazo de la cavidad abdominal, se extrajeron las células por perfusión, se lavó tres veces con SSTF y se resuspendieron las células en el medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF y gentamicina (5 µg/µL). Se realizó una tinción con tripán azul y el conteo celular en un hematocitómetro de Neubauer. La concentración celular se ajustó a 8x10⁶ células/mL. Estas células se re-estimularon *in vitro* con 1, 5 ó 10 µg/mL de PL y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Se incubaron cultivos paralelos sólo con medio de cultivo o con fitohemaglutinina A

(PHA) (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) (10 µg/mL) activador inespecífico de clones de linfocitos T. Para medir la producción de IFN γ , los sobrenadantes de cultivo se colectaron 24 h luego de la estimulación.

III.16 Determinación de IFN γ

El IFN γ se determinó por ELISA con los anticuerpos y la citoquina recombinante suministrados por Becton Dickinson Ltd. (Cowly, Oxford, Reino Unido). Para determinar las concentraciones de IFN γ , las placas de 96-pozos (Maxisorp Nunc Immuno plate, Nunc, Roskilde, Dinamarca) se recubrieron con 50 µL/pozo de un AcM purificado de rata anti-IFN γ de ratón (clon R4-6A2) que se usó como anticuerpo de captura. Este anticuerpo se diluyó en solución de fosfato de sodio 0,1 mol/L (pH 9,0) a 4 µg/mL. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Luego de bloquear con solución de bloqueo (SSTF suplementado con 10% de SBF) 1 h a 37°C, los sobrenadantes de cultivo de células de bazo aisladas de ratones inmunizados con PL o con SSTF (control negativo) y posteriormente re-estimuladas *in vitro* con diferentes concentraciones de PL se distribuyeron en 100 µL/pozo por triplicado y las placas se incubaron 2 h a 37°C. Diluciones dobles seriadas de IFN γ recombinante de ratón en un rango entre 10 ng/mL y 156 pg/mL se incluyeron como curva estándar en todas las placas. Se aplicaron 100 µL/pozo de un AcM de rata biotinilado anti-IFN γ murino (clon XMG1.2) a una concentración de 2 µg/mL en SSTF-10% SBF, durante 1 h a 37°C, luego de lo cual se adicionaron 100 µL/pozo de estreptavidina-peroxidasa a 2,5 µg/mL (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) durante 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron cinco veces con SSTF y se adicionaron 100 µL/pozo de una solución del sustrato peróxido de hidrógeno 0,01% (v/v) y del cromógeno OPD 0,6 mg/mL en solución tampón sustrato (Na₂HPO₄ 52 mmol/L y ácido cítrico 25 mmol/L (pH

5,6)) y se incubaron en la oscuridad durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de una solución de H₂SO₄ 2 mol/L. La DO se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Labsystems Multiskan[®] Multisof). Las concentraciones de IFN γ se expresan en pg/mL y se determinaron por comparación con la curva estándar. El límite de detección de este ensayo fue 71 pg/mL. El mismo se calculó según se describió anteriormente.

III.17 Ensayo colorimétrico para evaluar la actividad bactericida del suero

III.17.1 Preparación del antígeno

Como antígeno en este ensayo se usó la cepa *N. meningitidis* serogrupo B Cu 385-83 conservada en leche descremada (OXOID, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) a -70°C en múltiples alícuotas. El día anterior a la realización del ensayo se tomó una alícuota congelada y se sembró por agotamiento para obtener colonias aisladas en placas Agar Mueller-Hinton (OXOID, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) suplementado con SBF 10% (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) y el inhibidor vancomicina-colimicina-nistatina (VCN) (bioMerieux SA, Marcy l'Etoile, Francia). Las placas se incubaron toda la noche a 37°C en atmósfera de CO₂ 5%. Una colonia aislada fue transferida a una placa del mismo medio previamente atemperada e incubada durante 4 h a 37°C en 5% de CO₂. Las células se recogieron con solución salina fisiológica pH 7,2-7,4 y la suspensión celular se ajustó espectrofotométricamente a una DO en un rango entre 0,5-0,55 leído a 600 nm.

III.17.2 Muestras de suero y complemento

Para la validación del ensayo colorimétrico para la actividad bactericida del suero (EBSc) se emplearon muestras de sueros de dos voluntarios vacunados con VA-MENGOC-BC[®] y

de un individuo no vacunado. La fuente de complemento usada fue un suero humano obtenido en el laboratorio, carente de actividad bactericida intrínseca contra la cepa diana.

Para investigar el impacto del LPS en la actividad bactericida inducida por el PL se titularon los sueros de cinco ratones C3H/HeN y de cinco ratones C3H/HeJ previamente inmunizados con PL. Para estos ensayos se usó como fuente de complemento el suero de gazapos (conejos de 3-4 semanas de nacidos) (Pel-Freeze, EUA).

III.17.3 Procedimiento

Todos los pasos del EBS_c fueron realizados en un Gabinete de Seguridad Biológica. Las muestras de suero se diluyeron en placas de micro-titulación (Costar Laboratories, Cambridge, Mass, EUA) desde 1:2 hasta 1:4096 en SSHB con SAB 0,1% (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) (pH 7,2). Se añadieron 12,5 μ L por pozo de la suspensión celular, aproximadamente 100 unidades formadoras de colonias (UFC), en todos los pozos de la microplaca. Posteriormente se añadieron 12,5 μ L del complemento. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera sin CO₂ durante 30 min. Luego se añadió 150 μ L por pozo de Caldo Mueller-Hinton (OXOID, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) con glucosa 2% (BDH Laboratory Supplies Poole, Reino Unido), indicador de pH Púrpura de Bromocresol 0,002% (Fluka Chemika, Suiza) y VCN. El indicador de pH se preparó previamente al 1,6% en etanol. El inhibidor VCN se empleó para asegurar la ausencia de contaminaciones que pudieran afectar el resultado de este ensayo. Las placas se incubaron 20 h a 37°C en atmósfera de CO₂ 5%. El título bactericida se determinó como el recíproco de la máxima dilución del suero que causó >90% de muerte de la cepa Cu 385-83 y se detectó por la invariabilidad de color del indicador de pH. La titulación se realizó a simple vista y se leyó

la DO a 405 nm en un lector de microplacas (Labsystems Multiskan[®] Multisoft) para confirmar los resultados.

III.17.4 Validación del ensayo colorimétrico para evaluar la actividad bactericida del suero

La precisión se evaluó en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operaciones, o sea, la precisión intra-ensayo ya que la realiza un sólo analista, usando las mismas soluciones, instrumentos y equipos en todas las réplicas, un mismo día. La precisión intermedia expresa las variaciones dentro del laboratorio ya que la realiza otro analista del mismo laboratorio, en otro día y con soluciones preparadas por él. La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios ya que la realiza un tercer analista en otro laboratorio con instrumentos y equipos diferentes.

Se titularon tres muestras de sueros humanos bien caracterizadas como alto positivo, bajo positivo y negativo. En cada placa se incluyeron seis réplicas de la muestra problema, un suero control positivo y uno control negativo, así como los controles de suspensión y complemento. Un analista determinó la repetibilidad del ensayo mientras otro analista determinó su precisión intermedia en días diferentes; pero en el mismo laboratorio. Un tercer analista en otro laboratorio determinó la reproducibilidad del EBSc. Se asumió como criterio de aceptación una coincidencia en el título entre réplicas por placa ≥ 50 y una diferencia de sólo ± 1 dilución entre los títulos obtenidos por cada analista.

III.18 Líneas celulares e hibridomas

Los hibridomas de células T CD4⁺ y T CD8⁺ específicos para OVA, OT4H (Li y cols., 1994) y CD8OVA (Pfeifer y cols., 1993), fueron amablemente donados por las Dras. M. J.

Wick, Universidad de Göterborg, Suecia y J. Kapp, Escuela de Medicina de la Universidad Emory, Atlanta, EUA, respectivamente. Las células se mantuvieron en medio Iscove Dulbecco modificado suplementado con 5% de SBF, L-glutamina 2 mmol/L, 2-ME 0,05 mmol/L y penicilina-estreptomicina.

Las células CTLL-2 dependientes de IL2 se cultivaron en medio RF10 con IL2 (2 µg/mL). Todos los reactivos usados para el cultivo celular fueron suministrados por SIGMA (St. Louis, MO, EUA).

III.19 Ensayo de procesamiento y presentación antigénica

Las CPA empleadas fueron CD derivadas de la médula ósea cultivadas como se describió anteriormente. Las CD se incubaron con PL-OVA (5 µg/mL), PL (5 µg/mL) o OVA (0,56 µg/mL) durante 2 h a 37°C. Los cultivos se lavaron con SSHB y se incubaron 4 h en medio RF10 fresco. Se adicionó mitomicina C (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) a una concentración de 25 µg/mL durante 25 min para evitar la proliferación de las CD, seguido por cuatro lavados con SSHB. Las CD se distribuyeron a razón de 1×10^5 células/pozo en placas de 96 pozos y se co-cultivaron 24 h con los hibridomas de células T (1×10^5 células/pozo), OT4H específico para el péptido OVA(265-277) (Li y cols., 1994) o CD8OVA específico para el péptido OVA(257-264) (Pfeifer y cols., 1993). Los sobrenadantes de estos co-cultivos se colectaron cuidadosamente y congelaron a -20°C para ser evaluados en el bioensayo para la determinación de IL2.

III.20 Bioensayo para la determinación de IL2

Los dos días previos a la realización del ensayo, las células CTLL-2 se lavaron con SSTF y se pasaron a medio RF10 sin IL2 (1×10^6 células/mL). El día del ensayo, las células CTLL-2 se lavaron con RF10 y distribuyeron en placas de microtitulación de 96 pozos de fondo

plano (5×10^4 células/pozo). Las células se incubaron los sobrenadantes de cultivo (50 μL /pozo) colectados en el ensayo de presentación antigénica durante 5 h a 37°C en atmósfera de CO_2 5%. Posteriormente se marcaron por triplicado con 0,37 MBq de Timidina [^3H]/pozo (Amersham International, Little Chalfont, Reino Unido) para medir la proliferación de las células CTLL-2 durante las últimas 18 h de incubación. Se empleó IL2 recombinante de ratón (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y medio de cultivo como controles positivo y negativo, respectivamente. La incorporación de Timidina se determinó luego de cosechar las células en alfombrillas de fibra de vidrio. Para ello, se usó un cosechador Tomtek de 96-pozos (Tomtek, EUA) y se contó por centelleo líquido en un contador Wallac Microbeta 1450 (Wallac, Perkin Elmer, EUA). La proliferación de las células CTLL-2 se expresa en centelleos por minuto (cpm) (Gillis y cols., 1978).

III.21 Procesamiento estadístico

Antes de realizar los análisis estadísticos se comprobó el ajuste de todos los datos a una distribución normal con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Además, se comprobó la homogeneidad de varianzas empleando la prueba de Barlett. Las pruebas estadísticas utilizadas para el procesamiento de los datos obtenidos fueron las siguientes:

- Para los ELISA de IL12(p70) e $\text{IFN}\gamma$, los ensayos de ELISPOT de $\text{TNF}\alpha$ e IL12(p70), el ensayo para detectar actividad bactericida del suero, la determinación de IgG anti-PL, así como para analizar la relación matemática $\text{IgG2a}/\text{IgG1}$ anti-PL se compararon las medias entre dos grupos experimentales con la prueba “t” de Student con un 95% de confianza ($p < 0,05$).
- Para los ensayos de presentación antigénica, el ELISA de IgG anti-OVA, así como para comparar la relación matemática $\text{IgG2a}/\text{IgG1}$ anti-OVA se realizó un análisis

de varianza (ANOVA) de clasificación simple para conocer si existían diferencias entre las medias de los grupos comparados. Finalmente, se empleó la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) para identificar entre cuales de las medias comparadas existían diferencias significativas.

Todos los análisis se realizaron empleando el programa STATGRAPHICS®*Plus* versión 4,1.

IV. RESULTADOS

IV.1 Obtención de las poblaciones de macrófagos y células dendríticas

Las células de la médula ósea se extrajeron del fémur de ratones C57BL/6, C3H/HeN o C3H/HeJ se diferenciaron *in vitro* a MΦ o a CD. Las poblaciones obtenidas se analizaron por Citometría de Flujo. Tanto los MΦ como las CD se identificaron primeramente por su tamaño y granulosidad (Figs. 1 y 2). Estos parámetros permitieron seleccionar las poblaciones en las que se analizó la expresión de las diferentes moléculas de superficie evaluadas. Los niveles de corte para cada color se fijaron a partir de la fluorescencia de los controles de isotipos. Esto permitió descartar la fluorescencia debida a las uniones inespecíficas entre los anticuerpos y las células (Figs. 1 y 2).

En los cultivos diferenciados a MΦ, se obtuvieron células adherentes que al ser analizadas por Citometría de Flujo fueron CD11b⁺ en un 87%. Estas células fueron además, uniformemente negativas para CD11c, CD19 y TCRαβ con lo que se descartó la presencia en esta población de CD, linfocitos B o T (Fig. 1).

En los cultivos diferenciados a CD, se realizó un doble marcaje con AcMs anti-CD11b y anti-CD11c y se obtuvo un 73% de células que expresaban ambas moléculas. Estas células se consideraron CD ya que CD11c es un marcador exclusivo de las mismas. La población obtenida fue además, negativa para CD19 y TCRαβ que son marcadores de células B y T, respectivamente (Fig. 2).

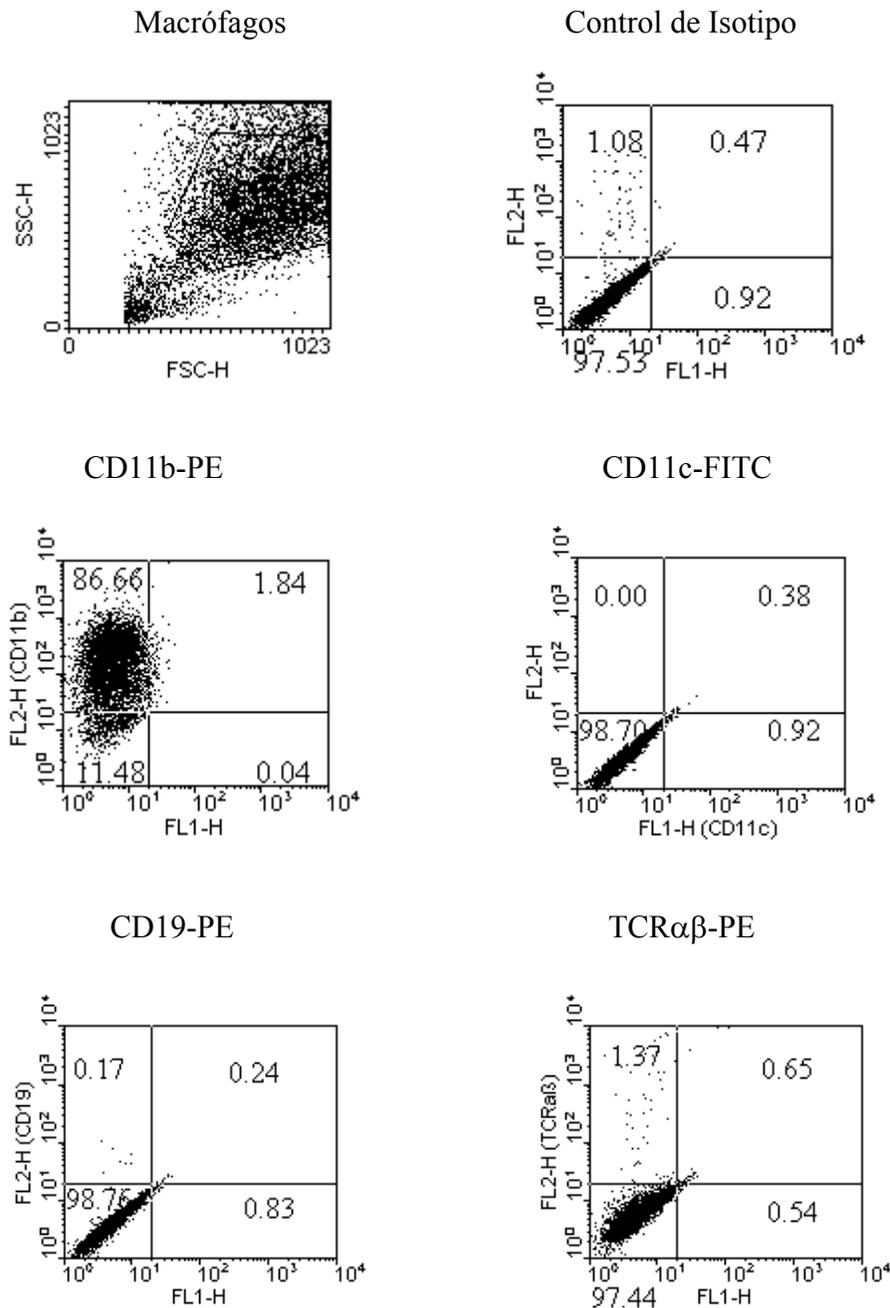


Figura 1. Obtención de macrófagos. La población de macrófagos derivados de médula ósea de ratones C57BL/6 mostró ser CD11b⁺ en un 87% y uniformemente negativa para CD11c, CD19 y TCRαβ. Los valores mostrados en cada panel representan el porcentaje de células por cuadrante. Los datos son representativos de cinco experimentos independientes que rindieron resultados similares.

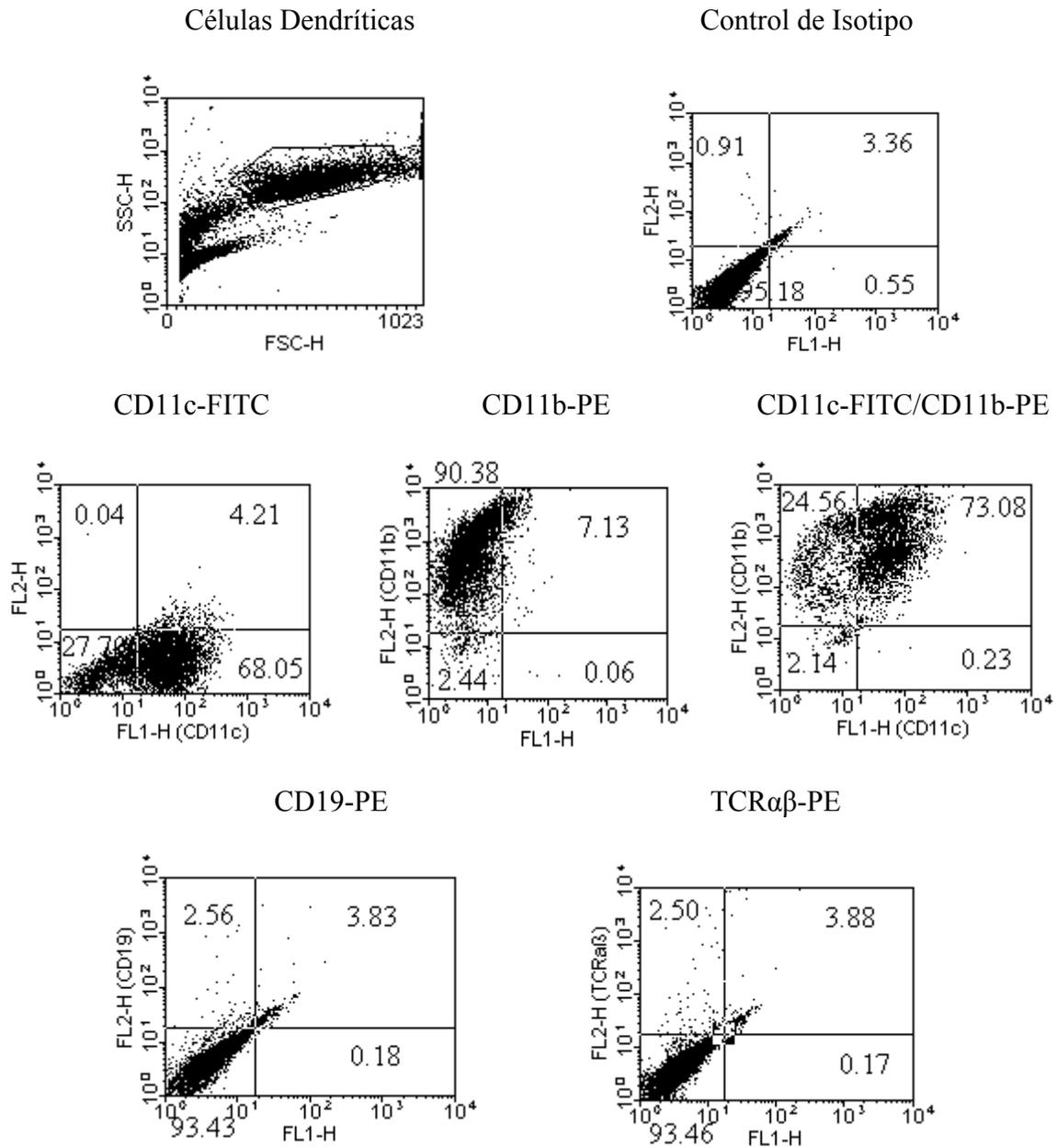


Figura 2. Obtención de células dendríticas. La población de células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratones C57BL/6 mostró ser CD11c⁺ y CD11b⁺ en un 73% y negativa para CD19 y TCR $\alpha\beta$. Los valores mostrados en cada panel representan el porcentaje de células por cuadrante. Los datos son representativos de cinco experimentos independientes que rindieron resultados similares.

IV.2 Determinación de las condiciones para la activación de los macrófagos con el Proteoliposoma

Se incubaron los MΦ de ratones C57BL/6 con diferentes concentraciones de PL (1, 5 ó 10 μg/mL), LPS (1 μg/mL) o medio de cultivo durante 18 ó 42 h. Se obtuvieron niveles de intensidad media de fluorescencia (IMF) similares al marcar los MΦ tratados con cada concentración de PL a los dos tiempos de incubación evaluados con los AcMs anti-MHC-II, -CD40, -CD80 o -CD86 (Fig. 3). Se seleccionó una concentración de 5 μg/mL de PL y 18 h de incubación para la estimulación de las CPA.

IV.3 Expresión de moléculas de superficie en los macrófagos de ratones C57BL/6 estimulados con el Proteoliposoma

Luego de 18 h de incubación de los MΦ con el PL (5 μg/mL), se incrementó la expresión de CD40, CD80 y CD86; pero no variaron los niveles del MHC-II en la superficie celular. Un efecto similar se observó en los MΦ incubados con LPS (1 μg/mL). Además, los MΦ se incubaron con DOC al 0,5% (3 μL/pozo), detergente en el que está conservado el PL. No se obtuvo incremento en la expresión de las moléculas del MHC-II ni de las coestimuladoras en los MΦ incubados con DOC (Fig. 4).

La expresión del MHC-II en MΦ *in vitro* aumentó sólo cuando las células fueron tratadas con IFNγ (10 ng/mL). Sin embargo, la exposición simultánea de los MΦ a IFNγ y al PL indujo un decrecimiento en la expresión de MHC-II en la superficie celular, mientras que la expresión de las moléculas coestimuladoras fue mayor que en MΦ estimulados sólo con PL (Fig. 5).

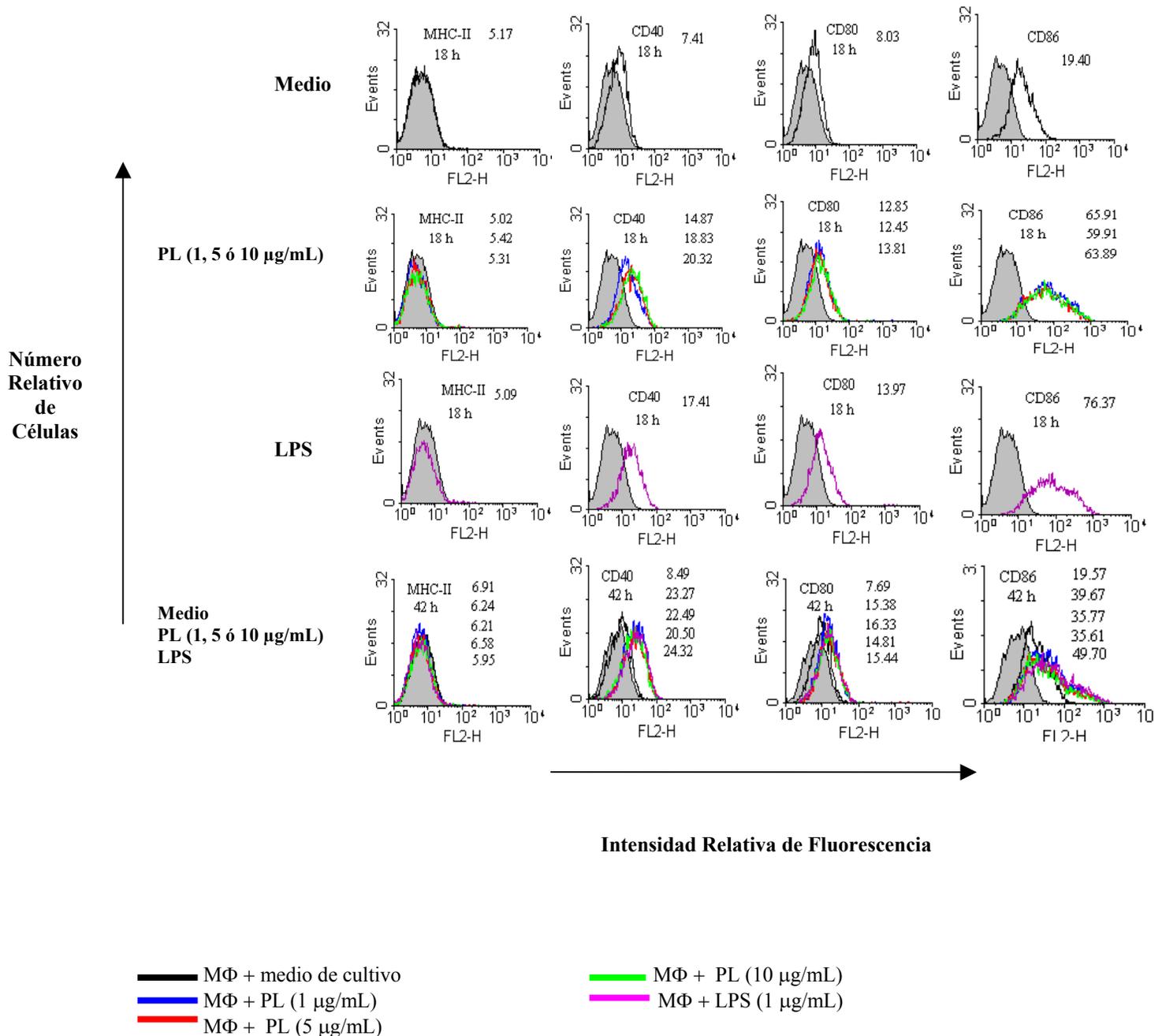


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones de Proteoliposoma (PL) en la activación de los macrófagos (MΦ) de ratones C57BL/6. Se muestra la expresión de MHC-II, CD40, CD80 y CD86 en la superficie de los MΦ luego de 18 h de incubación con el PL (1, 5 ó 10 µg/mL), el lipopolisacárido (LPS) (1µg/mL) o con medio de cultivo. Los histogramas grises muestran el nivel de fluorescencia usando anticuerpos controles de isotipos el cual no se afectó por el tratamiento con PL o LPS. Los números en cada histograma corresponden a la intensidad media de fluorescencia de los AcM en cada uno de los marcajes realizados. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que rindieron resultados similares.

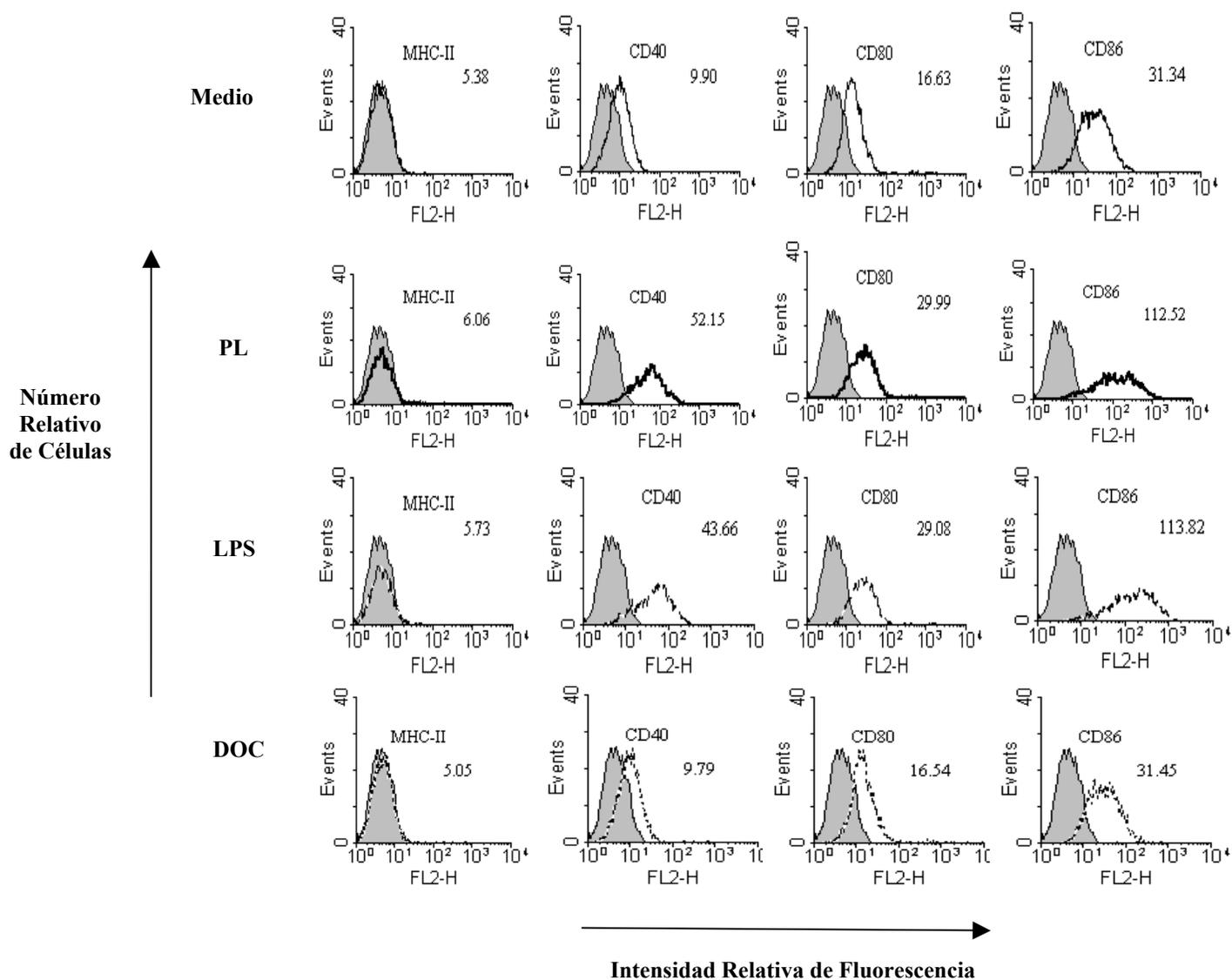
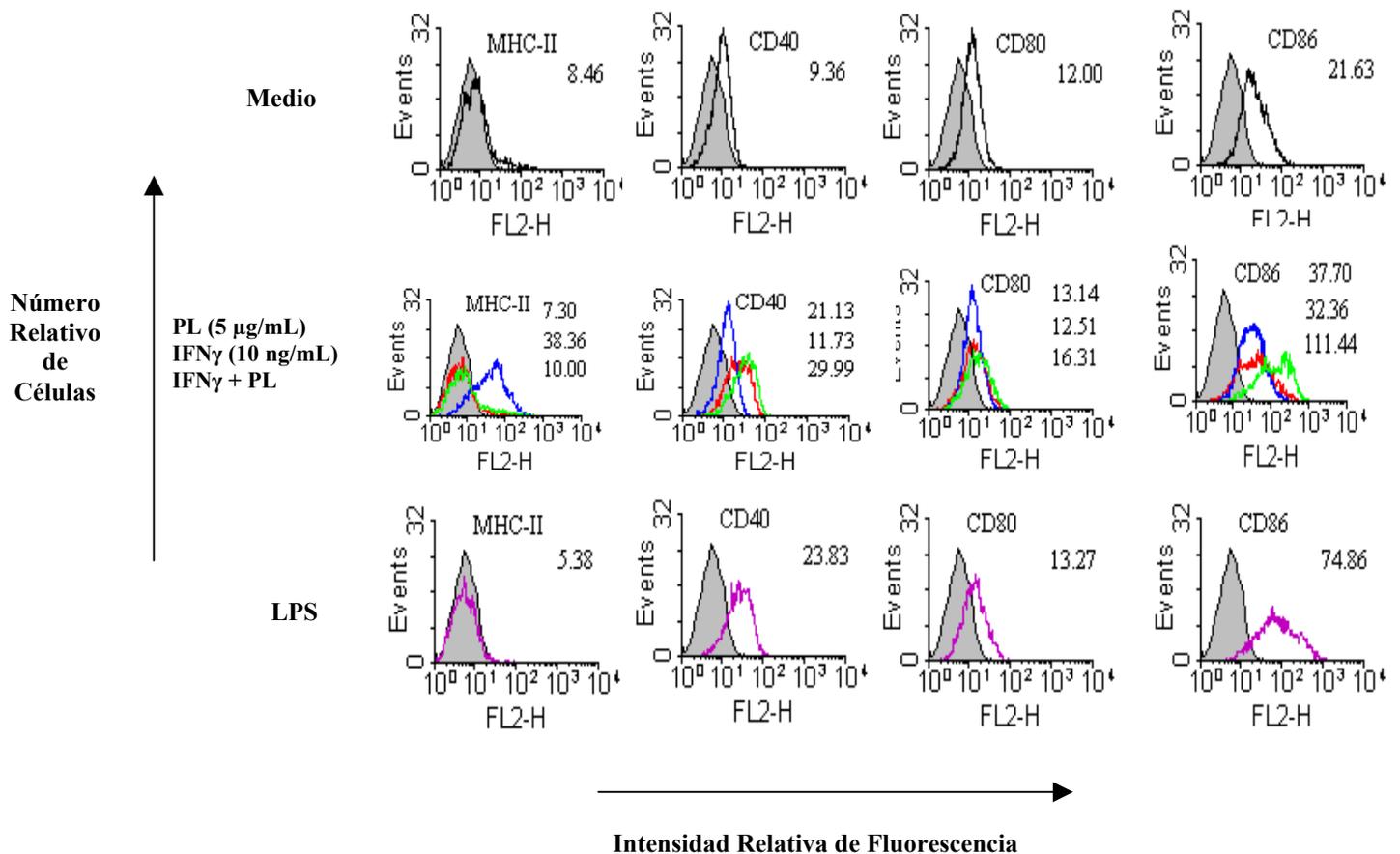


Figura 4. Efecto del Proteolisosoma (PL) en la activación de los macrófagos (MΦ) de ratones C57BL/6. Se muestra la expresión de MHC-II, CD40, CD80 y CD86 en la superficie de los MΦ luego de 18 h de incubación con el PL (5 μg/mL), el lipopolisacárido (LPS) (1μg/mL), el desoxicolato de sodio (DOC) (0,5%) o con medio de cultivo. Los histogramas grises muestran el nivel de fluorescencia usando anticuerpos controles de isotipos el cual no se afectó por el tratamiento con PL, LPS o DOC. Los números en cada histograma corresponden a la intensidad media de fluorescencia de los AcM en cada uno de los marcajes realizados. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que rindieron resultados similares.



- MΦ + medio de cultivo
- MΦ + PL (5 µg/mL)
- MΦ + IFN γ (10 ng/mL)
- MΦ + IFN γ (10 ng/mL) + Proteoliposoma (5 µg/mL)
- MΦ + LPS (1 µg/mL)

Figura 5. Efecto del IFN γ sobre la expresión del MHC-II en macrófagos (MΦ) de ratones C57BL/6. Se muestra la expresión de MHC-II, CD40, CD80 y CD86 en la superficie de los MΦ luego de 18 h de incubación con el PL (5 µg/mL), el IFN γ (10 ng/mL), el PL y el IFN γ , el lipopolisacárido (LPS) (1 µg/mL) o con medio de cultivo. Los histogramas grises muestran el nivel de fluorescencia usando anticuerpos controles de isotipo el cual no se afectó por el tratamiento con IFN γ , PL o LPS. Los números en cada histograma corresponden a la intensidad media de fluorescencia de los AcM en cada uno de los marcajes realizados. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que rindieron resultados similares.

IV.4 Expresión de moléculas de superficie en las células dendríticas de ratones C57BL/6 estimuladas con el Proteoliposoma

Luego de 18 h de incubación de las CD con el PL (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la expresión de MHC-II y de las moléculas coestimuladoras aumentó con respecto a las CD incubadas sólo con medio de cultivo. Un efecto similar se observó en las CD incubadas con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig. 6). Este resultado evidencia que el PL induce la maduración de las células dendríticas. La expresión de CD11c, marcador de superficie de CD, no varió ante la estimulación antigénica.

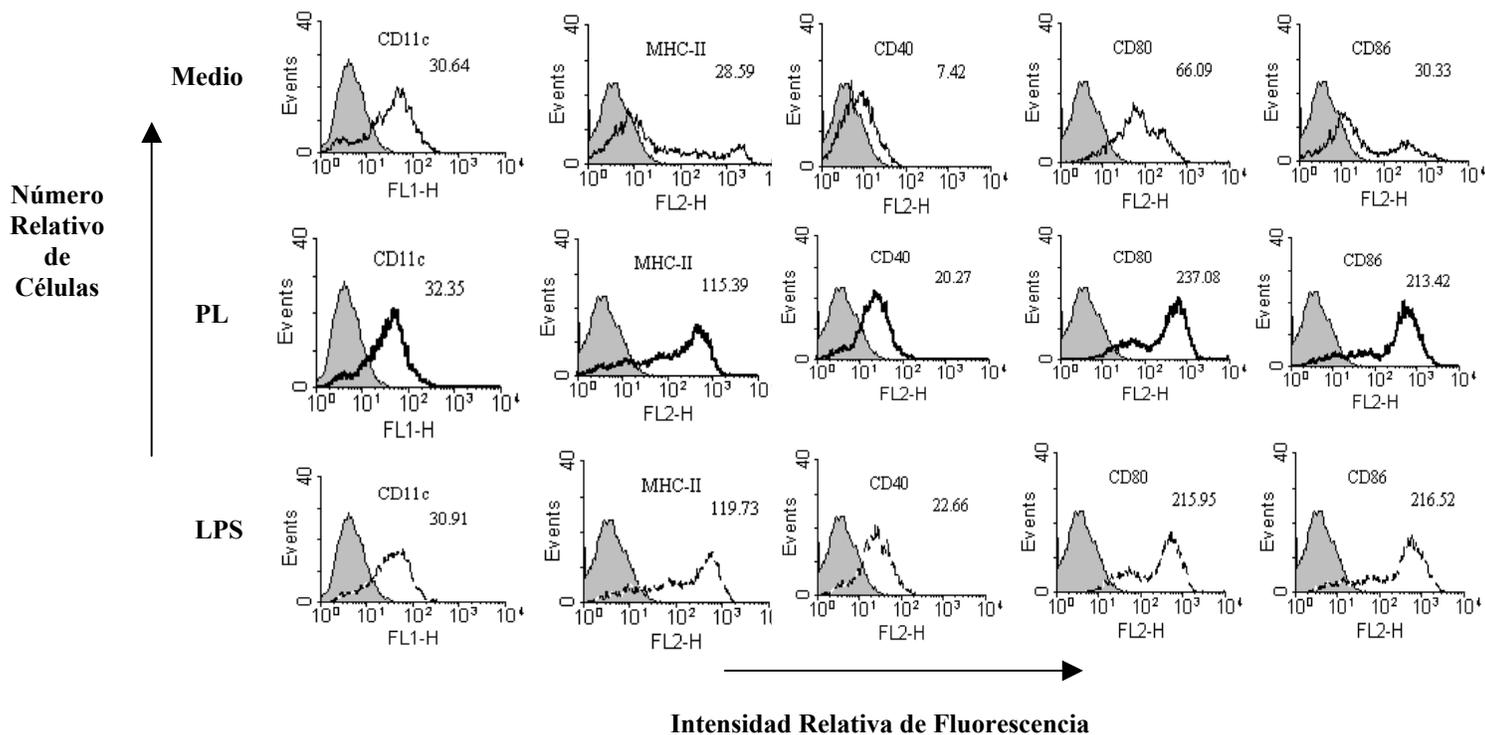


Figura 6. Efecto del Proteoliposoma (PL) en la maduración de las células dendríticas (CD) de ratones C57BL/6. Se muestra la expresión de CD11c, MHC-II, CD40, CD80 y CD86 en la superficie de las CD luego de 18 h de incubación con el PL (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el lipopolisacárido (LPS) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o con medio de cultivo. Los histogramas grises muestran el nivel de fluorescencia usando anticuerpos controles de isotipos el cual no se afectó por el tratamiento con PL o LPS. Los números en cada histograma corresponden a la intensidad media de fluorescencia de los AcM en cada uno de los marcajes realizados. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que rindieron resultados similares.

IV. 5 Secreción de TNF α e IL12(p70) por las células dendríticas y los macrófagos de ratones C57BL/6 estimulados con el Proteoliposoma

El TNF α es una citoquina pro-inflamatoria crucial en la maduración de las CD que además, participa en un amplio espectro de actividades biológicas, mientras que la IL12 es una citoquina directamente implicada en el desarrollo del patrón de respuesta Th1. Teniendo en cuenta estos elementos determinamos los niveles de TNF α e IL12 producidos por las CD y los M Φ de ratones C57BL/6 luego de ser incubados con PL, LPS o medio. Las CD produjeron elevados niveles de TNF α e IL12(p70) luego de la estimulación con PL durante 4 y 24 h, respectivamente (Fig. 7). En contraste, los M Φ produjeron una menor concentración de TNF α luego de 4 h de incubación con PL ($906 \pm 0,008$ pg/mL) o con LPS ($391 \pm 0,012$ pg/mL). No se detectó la producción de IL12(p70) luego de la incubación de los M Φ con PL o con LPS.

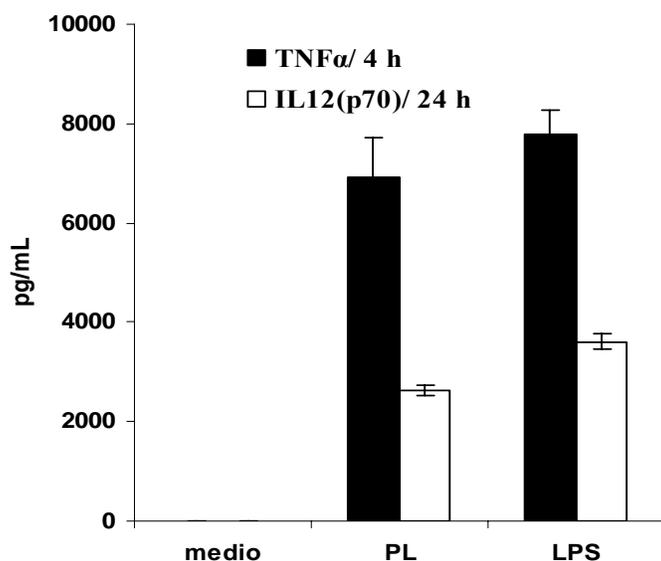


Figura 7. Producción de TNF α e IL12(p70) en las células dendríticas de ratones C57BL/6 incubadas con el Proteoliposoma. Se muestra la concentración media de las citoquinas detectadas por ELISA (pg/mL) \pm la desviación estándar. Los datos corresponden a cultivos duplicados en tres experimentos de estimulación independientes (n=6).

IV.6 Expresión de moléculas de superficie en las células dendríticas y los macrófagos de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ estimulados con el Proteolisosoma

La expresión de MHC-II y de las moléculas coestimuladoras evaluadas aumentó en las CD de los ratones C3H/HeN luego de ser estimuladas con PL o con LPS. En los ratones C3H/HeJ, hiporespondedores al LPS, hubo un incremento de MHC-II y CD86 en respuesta al PL (Fig. 8). La expresión de CD11c no varió en las CD de los ratones de ambas cepas ante la estimulación antigénica.

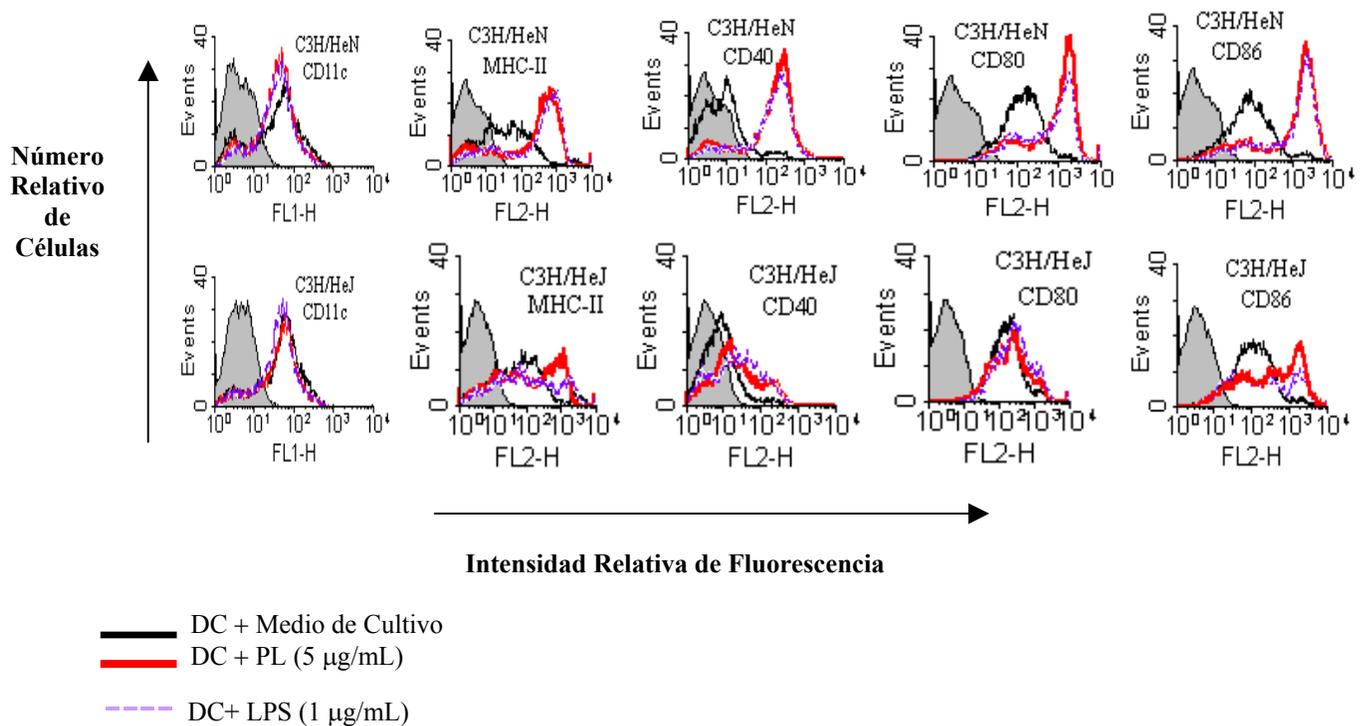


Figura 8. Efecto del Proteolisosoma (PL) en la maduración de las células dendríticas (CD) de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ. Se muestra la expresión de CD11c, MHC-II, CD40, CD80 y CD86 en la superficie de las CD de ratones C3H/HeN (arriba) y de ratones C3H/HeJ (abajo) luego de 18 h de incubación con el PL (5 µg/mL), el lipopolisacárido (LPS) (1 µg/mL) o con medio de cultivo. Los histogramas grises muestran el nivel de fluorescencia usando anticuerpos controles de isotipos el cual no se afectó por el tratamiento con PL o con LPS. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que rindieron resultados similares.

La expresión de MHC-II, CD80 y CD86 en los MΦ de los ratones de ambas cepas no experimentó cambios luego de 18 h de incubación con PL o LPS. En los MΦ de ratones C3H/HeN se incrementó la expresión de CD40 luego de la incubación con PL o LPS mientras que en los MΦ de ratones C3H/HeJ no se observó incremento de CD40 (Fig. 9).

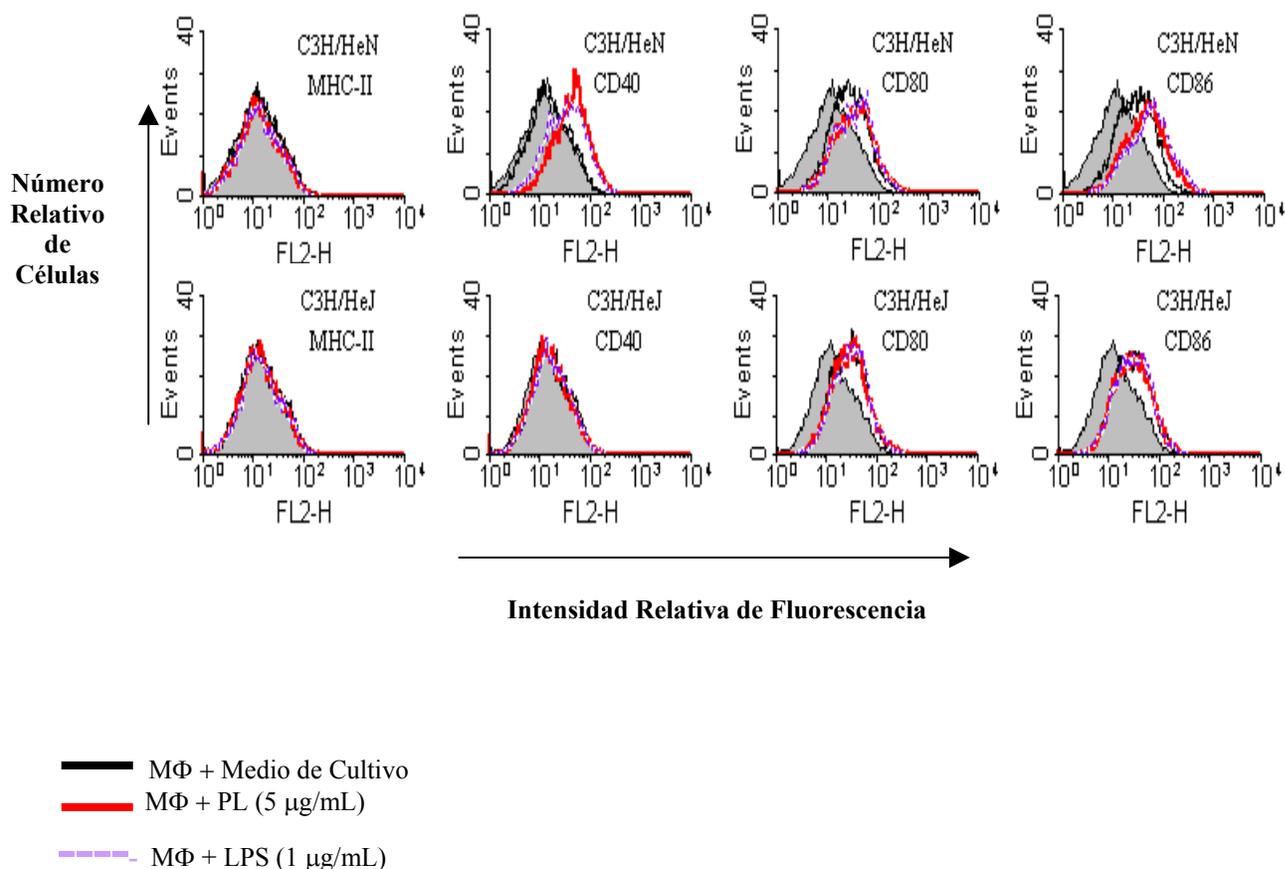


Figura 9. Efecto del Proteolisosoma (PL) en la activación de los macrófagos (MΦ) de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ. Se muestra la expresión de MHC-II, CD40, CD80 y CD86 en la superficie de los MΦ de ratones C3H/HeN (arriba) y de ratones C3H/HeJ (abajo) luego de 18 h de incubación con el PL (5 µg/mL), el lipopolisacárido (LPS) (1 µg/mL) o con medio de cultivo. Los histogramas grises muestran el nivel de fluorescencia usando anticuerpos controles de isotipos el cual no se afectaron por el tratamiento con PL ni con LPS. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que rindieron resultados similares.

IV.7 Secreción de TNF α e IL12(p70) por las células dendríticas y los macrófagos de ratones C3H/HeJ y C3H/HeN estimulados con el Proteoliposoma

Tanto las CD como los M Φ de ratones C3H/HeN produjeron TNF α e IL12(p70) luego de ser estimulados con PL o LPS. Por el contrario, en los sobrenadantes de cultivo de las CD y los M Φ de ratones C3H/HeJ no se detectó TNF α (Tab. III).

Se detectó la producción de IL12(p70) en las CD de ratones C3H/HeJ 48 h después de haber sido incubadas con el PL, aunque ésta fue significativamente menor ($p < 0,05$) según la prueba “t” de Student con un 95% de confianza, que en los animales C3H/HeN (Tab. IV).

Tabla III. Producción de TNF α por las células dendríticas (CD) y los macrófagos (M Φ) de ratones C3H/HeN o C3H/HeJ estimulados con el Proteoliposoma (PL). Las células se incubaron con PL (5 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL) como control positivo o medio de cultivo como control negativo. Las concentraciones de TNF α (pg/mL) en los sobrenadantes se determinaron por ELISA.

Cepa de Ratón	Estímulos	Concentración media de TNF α (pg/mL) \pm DE ¹ (n=6)	
		CD	M Φ
C3H/HeN	Medio	<59	<59
	PL	9103 \pm 0,06	504 \pm 0,03
	LPS	8979 \pm 0,2	525 \pm 0,04
C3H/HeJ	Medio	<59	<59
	PL	<59	<59
	LPS	<59	<59

¹ Media de la concentración de TNF α \pm la desviación estándar, determinadas en cultivos duplicados pertenecientes a tres experimentos de estimulación independientes.

Tabla IV. Producción de IL12(p70) por las células dendríticas (CD) y los macrófagos (MΦ) de ratones C3H/HeN o C3H/HeJ estimulados con el Proteoliposoma (PL). Las células se incubaron con PL (5 µg/mL), LPS (1 µg/mL) como control positivo o medio de cultivo como control negativo. Las concentraciones de IL12(p70) (pg/mL) en los sobrenadantes de cultivo se determinaron por ELISA.

Cepa de Ratón	Estímulos	Concentración media de IL12(p70) (pg/mL) ± DE ¹ (n=6)			
		CD		MΦ	
		24 h	48 h	24 h	48 h
C3H/HeN	Medio	<94	<94	<94	<94
	PL	3458±0,006	2215±0,004*	197±0,008	<94
	LPS	3177±0,01	2051± 0,006	362±0,002	455±0,008
C3H/HeJ	Medio	<94	<94	<94	<94
	PL	<94	573±0,04	<94	<94
	LPS	<94	<94	<94	<94

¹ Media de la concentración de IL12(p70) ± la desviación estándar, determinadas en cultivos duplicados pertenecientes a tres experimentos de estimulación independientes.

* Diferencias significativas con ($p < 0,05$), según la prueba “t” de Student, entre las concentraciones medias de IL12(p70) producidas por las CD de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ luego de 48 h de incubación con el PL.

Para verificar este resultado se determinó por ELISPOT, en cultivos de CD de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ estimuladas con el PL o con el LPS, la presencia de células productoras de TNFα o IL12(p70). Los resultados se analizaron con la prueba “t” de Student con un 95% de confianza. El número de CD productoras de TNFα en los ratones C3H/HeN fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que en los ratones C3H/HeJ luego de la estimulación con PL o con LPS (Fig. 10 A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el número de células productoras de IL12(p70) en las CD de ambas cepas de ratones estimuladas con el PL. En contraste, el número de CFS en las CD de los ratones C3H/HeN fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que en las CD de los ratones C3H/HeJ luego de la estimulación con el LPS (Fig. 10 B).

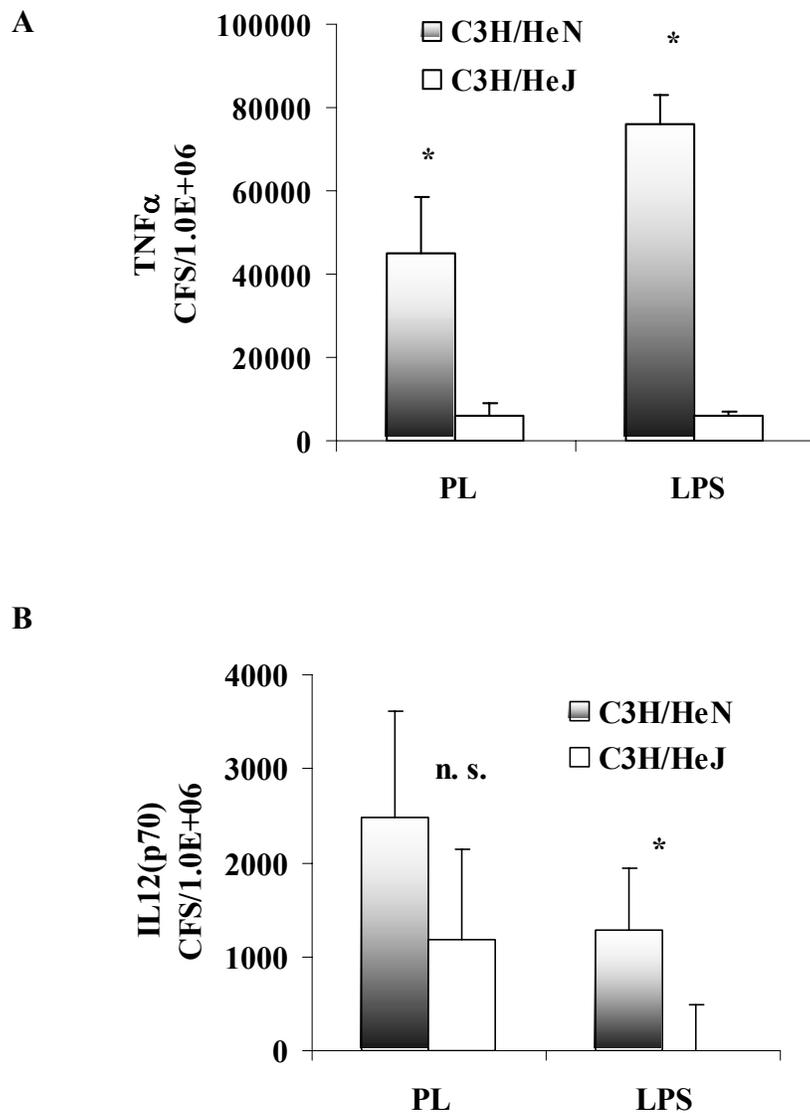


Figura 10. Proporción de células productoras de TNF α e IL-12(p70) en cultivos de células dendríticas (CD) de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ estimuladas con Proteoliposoma (PL). El número de células formadoras de “spots” (CFS) por millón de células detectado cuando las CD fueron cultivadas en presencia del antígeno, corregido con los niveles de fondo detectados en ausencia del antígeno, son presentadas como la media \pm la desviación estándar. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que rindieron resultados similares. * Diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba “t” de Student, entre los dos grupos experimentales incubados con PL o con LPS. n. s. No existen diferencias significativas ($p > 0,05$), según la prueba “t” de Student, entre los dos grupos experimentales incubados con PL.

IV.8 Respuesta de clase IgG y de las subclases IgG1 e IgG2a en ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con el Proteoliposoma

Se inmunizaron ratones C3H/HeN y C3H/HeJ con dos dosis de 5 μ g de PL cada una. Los animales antes de la inmunización no presentaron niveles detectables de IgG anti-PL. El PL indujo una elevada respuesta de IgG tanto en los ratones C3H/HeN como en los C3H/HeJ (Fig. 11). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los niveles de IgG anti-PL detectados en el suero de los ratones inmunizados de ambas cepas al compararlos con la prueba “t” de Student con un 95% de confianza.

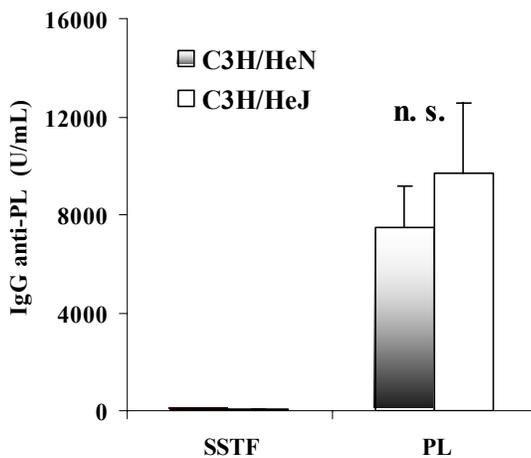


Figura 11. Respuesta de IgG en ratones inmunizados con el Proteoliposoma (PL). Los ratones C3H/HeN y C3H/HeJ fueron inmunizados con dos dosis de PL (5 μ g) o con solución salina tamponada de fosfato (SSTF) como control negativo. Los sueros se colectaron 14 días luego de la segunda inmunización y se evaluaron por ELISA. Los datos muestran la concentración media de IgG del suero de cinco animales en cada grupo \pm la desviación estándar. Los datos son representativos de tres experimentos independientes que rindieron resultados similares. ^{n. s.} No existen diferencias significativas ($p > 0,05$), según la prueba “t” de Student, entre los dos grupos experimentales inmunizados con el PL.

La relación matemática IgG2a/IgG1 anti-PL fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los sueros de los animales respondedores que en los sueros de los no respondedores al LPS, según la prueba “t” de Student con un 95% de confianza (Fig. 12). Los niveles de IgG1 e IgG2a anti-PL en el suero de ambas cepas de ratones se muestran en la Figura 13.

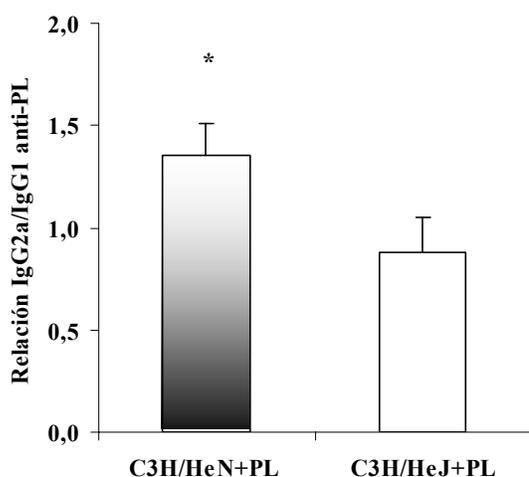


Figura 12. Proporción IgG2a/IgG1 en ratones inmunizados con Proteoliposoma. Los sueros de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ, inmunizados con dos dosis de PL (5 μ g) fueron colectados 14 días luego de la segunda inmunización y se evaluaron por ELISA. Los datos muestran la media de la relación IgG2a/IgG1 en el suero de cinco animales en cada grupo \pm la desviación estándar. * Diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba “t” de Student, entre los dos grupos experimentales inmunizados con el PL.

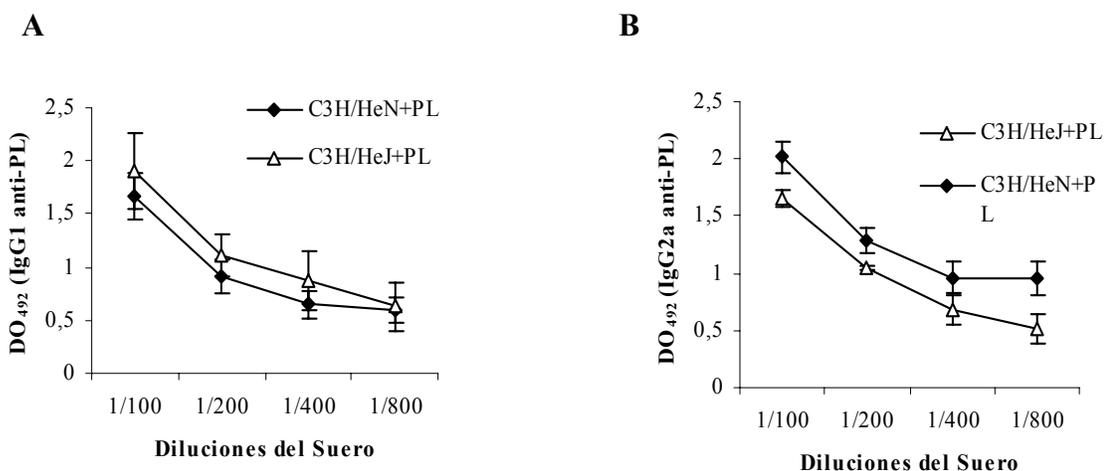


Figura 13. Niveles de IgG1 e IgG2a anti-Proteoliposoma (PL) en el suero de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ. (A) muestra los niveles medios de IgG1 anti-PL. (B) muestra los niveles medios de IgG2a anti-PL. Los datos se expresan como la densidad óptica media \pm la desviación estándar en cuatro diluciones de los sueros de cinco animales por grupo.

IV.9 Producción de IFN γ en ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con el Proteoliposoma

Se evaluó la producción de IFN γ en células aisladas de bazo de los ratones C3H/HeN y C3H/HeJ previamente inmunizados con el PL y re-estimuladas *in vitro* con diferentes concentraciones del PL, con medio de cultivo o con PHA. Se detectaron altos niveles de IFN γ en los sobrenadantes de cultivo de células de bazo de ratones C3H/HeN. Sin embargo, en las células de ratones C3H/HeJ la concentración de IFN γ disminuyó significativamente ($p < 0,05$) según la comparación realizada con prueba “t” de Student con un 95% de confianza (Fig. 14).

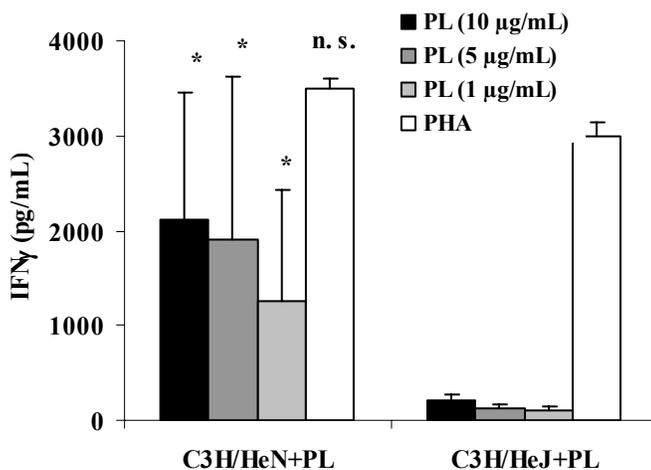


Figura 14. Producción de IFN γ por células de bazo de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con el Proteoliposoma (PL). Las células fueron re-estimuladas *in vitro* con diferentes concentraciones de PL, medio de cultivo o fitohemaglutinina A (PHA). Se muestra la concentración media de IFN γ (pg/mL) \pm la desviación estándar (tres animales por grupo) determinada por ELISA. * Diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba “t” de Student, entre los dos grupos experimentales re-estimulados con iguales concentraciones de PL. n. s. No existen diferencias significativas ($p > 0,05$), según la prueba “t” de Student, entre los dos grupos experimentales re-estimulados con PHA.

IV.10 Validación del ensayo colorimétrico para evaluar la actividad bactericida del suero

Se determinó la precisión del EBSc a través de su repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Para todos los sueros se obtuvo el título o ± 1 dilución en cada una de las determinaciones realizadas, excepto para el suero alto positivo para el cual se obtuvo un título dos diluciones menor en el ensayo de reproducibilidad (Tabla V). Todas las placas mostraron un porcentaje en la coincidencia del título ≥ 50 entre las seis réplicas de cada suero evaluado. A través de este estudio el EBSc mostró ser preciso.

Tabla V. Títulos obtenidos en los ensayos para determinar la precisión del EBSc contra el serogrupo B de *N. meningitidis*. Se evaluaron seis réplicas de cada suero y un suero control positivo en cada placa. El criterio de aceptación fue obtener un porcentaje de coincidencia del título del suero problema ≥ 50 en cada placa.

Ensayos de Precisión	Títulos del EBSc (% de coincidencia del título)		
	Alto Positivo	Bajo Positivo	Negativo
Repetibilidad	512(67)	16(83)	<1(100)
Precisión Intermedia	256(67)	32(83)	<1(100)
Reproducibilidad	128(67)	8(100)	<1(100)

IV.10.1 Actividad bactericida del suero de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con el Proteoliposoma

Los sueros de ratones de ambas cepas colectados antes de la inmunización no presentaron niveles detectables de actividad bactericida. La presencia de anticuerpos bactericidas contra el serogrupo B de *N. meningitidis* fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los sueros de

ratones respondedores al LPS que en los sueros de ratones hiporespondedores al LPS inmunizados con PL según la prueba “t” de Student con un 95% de confianza (Fig. 15).

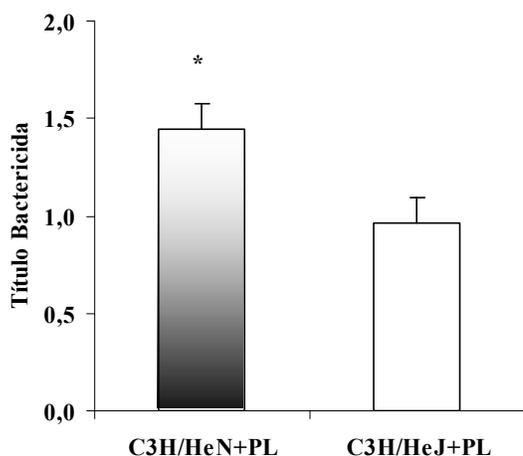


Figura 15. Actividad de anticuerpos bactericidas, mediada por el complemento, en el suero de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con PL. El título bactericida fue determinado como el recíproco de la máxima dilución del suero que causó >90% de muerte de la cepa Cu 385-83 y se expresa como la media del \log_{10} del título \pm la desviación estándar (cinco animales por grupo). * Diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba “t” de student, entre los dos grupos experimentales inmunizados con el PL.

IV.11 Inclusión de ovoalbúmina en el Proteoliposoma

OVA fue incluida en el PL mediante la desestabilización de la estructura proteoliposómica con concentraciones elevadas de DOC en el medio y posterior re-estructuración del PL por la eliminación del detergente durante el proceso de diálisis. El PL-OVA se purificó por cromatografía de filtración en gel. La Figura 16 A muestra el cromatograma obtenido durante la purificación de PL-OVA donde se observó un pico similar al del PL de partida. Este PL eluye, debido a su tamaño de aproximadamente 70 nm, en el volumen muerto de la columna y su perfil cromatográfico típico se muestra en la Figura 16 B. La presencia de OVA en el interior del PL se confirmó por SDS-PAGE e inmunotransferencia. El análisis de la imagen digital de los geles obtenidos demostró la presencia en el PL-OVA, de una proteína de igual migración que la OVA. En contraste, esta banda no fue observada en el PL. Estas dos bandas fueron posteriormente reconocidas por el suero policlonal anti-OVA empleado en la inmunotransferencia (Fig. 17).

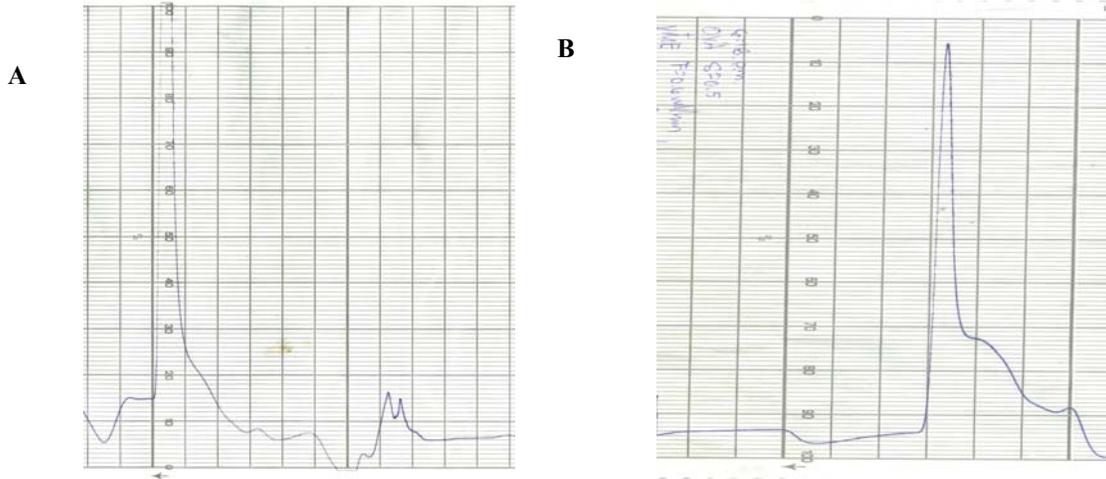


Figura 16. Cromatograma de la purificación del Proteoliposoma con Ovoalbúmina incorporada (PL-OVA). (A) PL-OVA purificado por cromatografía de filtración en gel Sephacryl S-300. Columna XK16, 1,6x100 cm; eluente, solución Tris (30 mmol/L) con EDTA (2 mmol/L) y 0.5% de DOC y una velocidad de flujo de 0,6 mL/min. (B) muestra el cromatograma típico del proceso de purificación del PL.

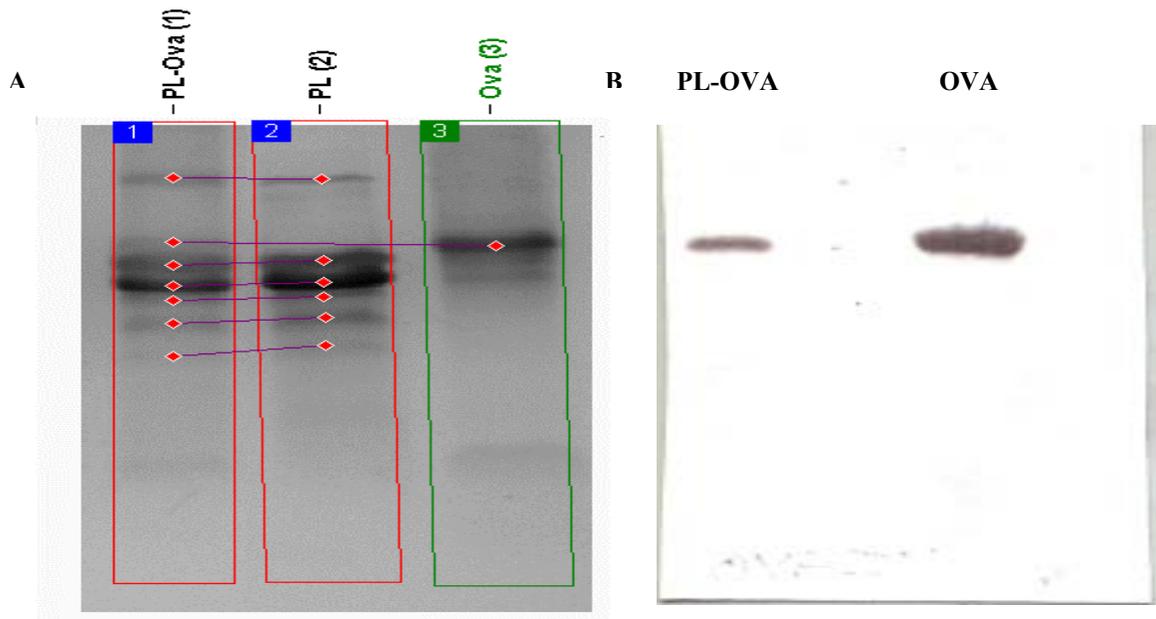


Figura 17. Estudio de la presencia de Ovoalbúmina incorporada en el Proteoliposoma (PL-OVA). (A) muestra el análisis densitométrico del perfil proteico de PL-OVA, PL y OVA en geles de poliacrilamida teñidos con azul Coomassie luego de la corrida electroforética. (B) muestra las proteínas reconocidas en PL-OVA y OVA cuando las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y enfrentadas a anticuerpos específicos contra OVA.

La concentración final de OVA incorporada en el PL se estimó por densitometría con el empleo del programa ImageMaster 1D elite. Como resultado del análisis del área bajo la curva del perfil densitométrico se estimó que el 11,26% del total de proteínas de la preparación PL-OVA correspondía a la OVA incorporada.

IV.12 Activación de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ específicos para péptidos de ovoalbúmina

Se incubaron CD de ratones C57BL/6 con PL-OVA y luego se co-cultivaron con un hibridoma de células T CD4⁺ (OT4H) específico para OVA(257-264)/MHC-II o con un hibridoma de células T CD8⁺ (CD8OVA) específico para OVA(265-267)/MHC-I (Pfeifer y cols., 1993; Li y cols., 1994). La Figura 18 muestra que las CD presentaron el péptido OVA(257-264) proveniente de PL-OVA y activaron el hibridoma OT4H. Además, el PL-OVA propició la presentación cruzada del péptido OVA(265-267) en CD y la activación cruzada del hibridoma CD8OVA (Fig. 18). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la proliferación de la línea celular CTLL dependiente de IL2 cultivada con los sobrenadantes de los co-cultivos de OT4H con las CD estimuladas con PL-OVA o con OVA, aunque se aprecia una tendencia a que la presentación en MHC-II de CD estimuladas con PL-OVA sea mayor que en CD estimuladas sólo con OVA. Sin embargo, se alcanzaron niveles de proliferación significativamente mayores ($p < 0,05$) de CTLL cultivada con los sobrenadantes de los co-cultivos de CD8OVA con CD estimuladas con PL-OVA en comparación con CD estimuladas sólo con OVA. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en la proliferación de CTLL con los sobrenadantes de los co-cultivos de CD8OVA con CD(OVA) o con CD(PL). Los resultados se analizaron con un ANOVA de

clasificación simple y con la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan con un nivel de confianza del 95%.

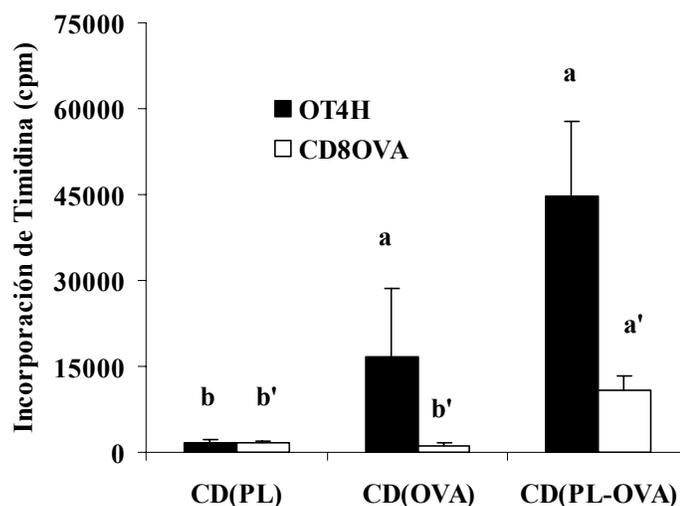


Figura 18. Activación de linfocitos T CD4⁺ y activación cruzada de linfocitos T CD8⁺ por células dendríticas (CD) de ratones C57BL/6 estimuladas con Proteoliposoma-ovoalbúmina (PL-OVA). La respuesta de los hibridomas de células T OT4H y CD8OVA, luego de ser co-incubado con CD estimuladas con PL, OVA o PL-OVA se determinó por la incorporación de Timidina [³H] en la línea celular CTLL dependiente de IL2. Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. ^{a b} Diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan, en la activación del hibridoma OT4H. ^{a' b'} Diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan, en la activación del hibridoma CD8OVA.

IV.13 Respuesta de clase IgG y de las subclases IgG1 e IgG2a en ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con Proteoliposoma-ovoalbúmina

Los animales C3H/HeN y C3H/HeJ antes de la inmunización no presentaron niveles detectables de IgG anti-OVA. Los resultados se analizaron con un ANOVA de clasificación simple y con la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan con un nivel de confianza del 95%. El PL-OVA indujo altos niveles de IgG anti-OVA en los ratones respondedores al LPS que no tuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) con los inducidos

por el T-OVA en los ratones de ambas cepas. El PL-OVA también indujo respuesta de IgG anti-OVA en los ratones hiporespondedores al LPS aunque ésta fue significativamente menor ($p < 0,05$) que la inducida en los animales respondedores al LPS (Fig. 19).

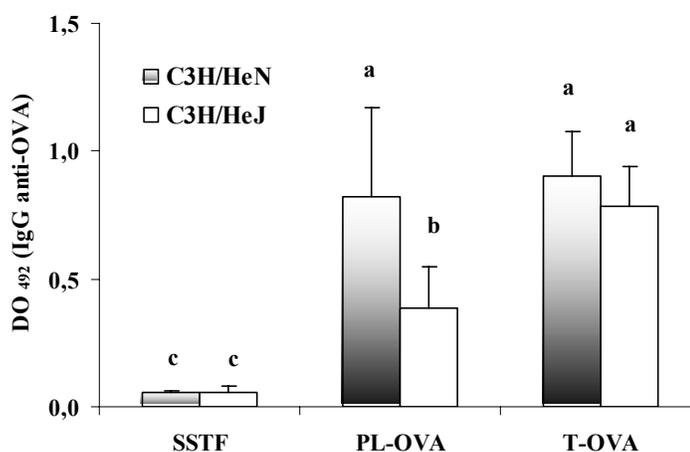


Figura 19. Respuesta de IgG anti-ovoalbúmina (OVA) en ratones inmunizados con Proteoliposoma-ovoalbúmina (PL-OVA). Ratones C3H/HeN y C3H/HeJ fueron inmunizados con PL-OVA (5 μ g), con solución salina tamponada de fosfato (SSTF) como control negativo o con una dosis de 10 μ g de la emulsión TiterMax Gold-OVA (T-OVA) como control positivo. Los sueros fueron colectados 14 días luego de la segunda inmunización con PL-OVA y única con T-OVA y se evaluaron por ELISA. Los datos muestran la concentración media de IgG del suero de cinco animales por cada grupo \pm la desviación estándar. ^{a b c} Diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan, entre los grupos experimentales inmunizados con SSTF, PL-OVA o T-OVA.

La relación IgG2a/IgG1 anti-OVA inducida por PL-OVA en los animales C3H/HeN fue significativamente mayor ($p < 0,05$), según un ANOVA de clasificación simple y la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan con un nivel de confianza del 95%, que la inducida en los animales hiporespondedores al LPS y también que la inducida por T-OVA en ambas cepas de ratones (Fig. 20). Los niveles de IgG1 e IgG2a anti-OVA inducidos por PL-OVA en el suero de animales C3H/HeN y C3H/HeJ se muestran en la Figura 21.

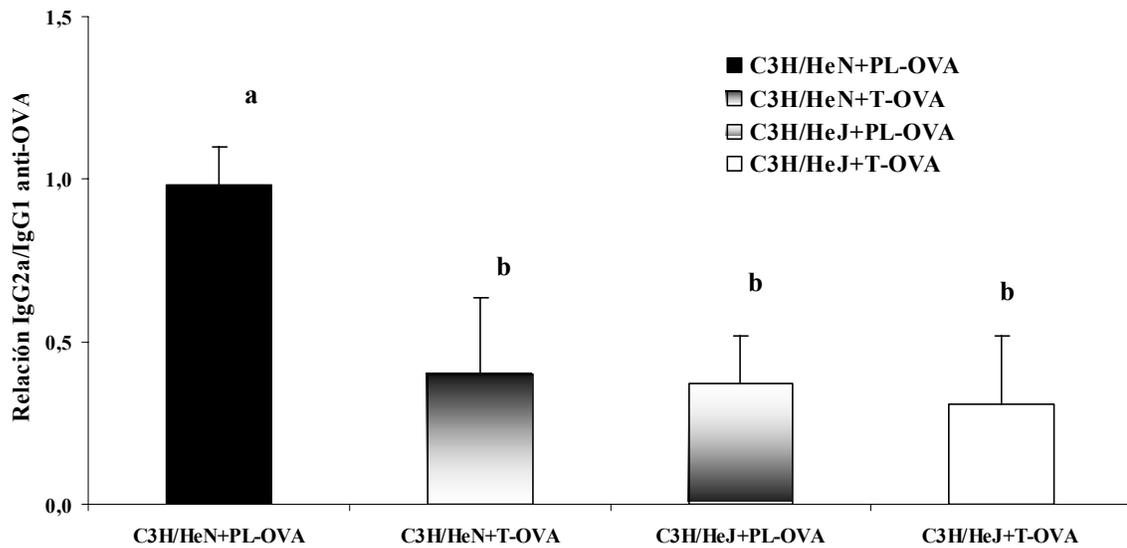


Figura 20. Relación IgG2a/IgG1 en ratones inmunizados con Proteolisosoma-ovoalbúmina (PL-OVA). Los sueros de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ, inmunizados con dos dosis de PL-OVA (5 μ g) o una dosis de TiterMax Gold-OVA (T-OVA) (10 μ g) fueron colectados 14 días luego de la segunda inmunización con PL-OVA y única con T-OVA y se evaluaron por ELISA. Los datos muestran la media de la relación IgG2a/IgG1 en el suero de cinco animales en cada grupo \pm la desviación estándar. ^{a b} Diferencias significativas ($p < 0,05$), según la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan, entre los grupos experimentales inmunizados con PL-OVA o T-OVA.

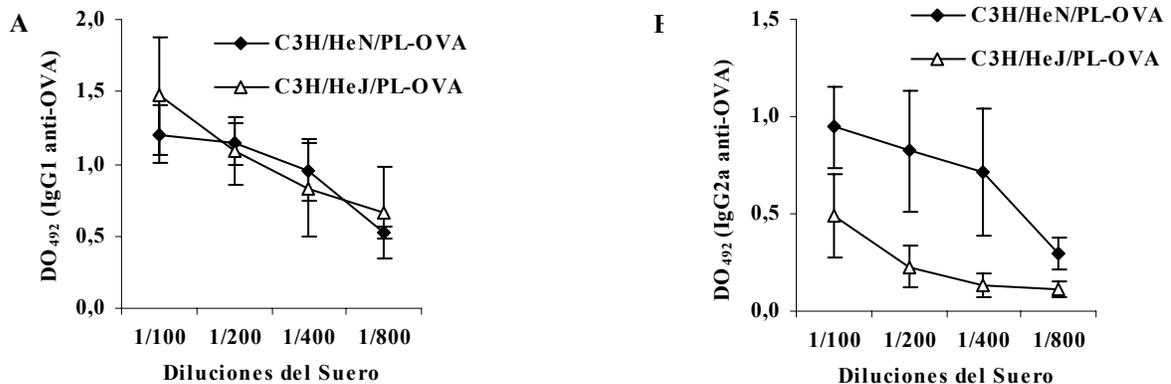


Figura 21. Niveles de IgG1 e IgG2a anti-ovoalbúmina (OVA) en el suero de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con Proteolisosoma-ovoalbúmina (PL-OVA). (A) muestra los niveles medios de IgG1 anti-OVA. (B) muestra los niveles medios de IgG2a anti-OVA. Los datos se expresan como la densidad óptica media \pm la desviación estándar en cuatro diluciones de los sueros de cinco animales por grupo.

V. DISCUSION

Como resultado de una mejor comprensión de los mecanismos inmunológicos y del desarrollo de requerimientos reguladores más estrictos (Dellepiane y cols., 2000), la vacunología moderna se ha encaminado hacia el diseño de vacunas mejor definidas. Esta estrategia, especialmente basada en el desarrollo de vacunas por sub-unidades garantiza la seguridad de los compuestos vacunales; pero atenta contra la eficacia de los mismos al eliminar las señales activadoras de la respuesta inmune. Por ello, cobra gran importancia el desarrollo y uso de adyuvantes que aporten las señales de peligro capaces de activar apropiadamente al sistema inmune (O'Hagan y Valiante, 2003).

Debido a las crecientes evidencias de que la respuesta inmune innata juega un papel crítico en la activación y direccionamiento de la respuesta inmune adaptativa se reconoce que el mayor beneficio de un adyuvante, especialmente en términos de la calidad de la respuesta inmune, es su habilidad de activar específicamente células del sistema inmune innato. Se considera como buen adyuvante, aquel compuesto que sea capaz de localizar el antígeno y hacerlo diana de las CD, inducir la maduración de las mismas y cuya reactogenicidad sea aceptable para su aplicación en humanos (O'Hagan y Valiante, 2003).

Existen muy pocos adyuvantes disponibles para su uso en humanos debido fundamentalmente a que muchos de los compuestos ensayados con estos fines resultan ser muy reactogénicos. Sin embargo, el PL evaluado en el presente trabajo ha sido extensivamente empleado en humanos como componente antigénico fundamental de VA-MENGOC-BC[®] (Sierra y cols., 1991), con más de 50 millones de dosis aplicadas, por lo que su empleo como adyuvante en nuevas formulaciones vacunales para humanos debe ser seguro y no reactogénico. Por ello, nos propusimos explorar: los cambios fenotípicos y

funcionales que ocurren en las CD y los MΦ en respuesta a la estimulación con el PL; la implicación del LPS y de los componentes no-LPS en la inmunogenicidad del PL; las habilidades del PL para entregar un antígeno incorporado en su estructura a las CD e inducir la activación cruzada de células T CD8⁺ y finalmente la capacidad del PL como adyuvante *in vivo* en ratones.

El Proteoliposoma activa a los macrófagos e induce la maduración de las células dendríticas imprescindible para iniciar y polarizar la respuesta inmune

Para realizar este estudio se aislaron células de la médula ósea murina las cuales se diferenciaron *in vitro* hasta obtener poblaciones de MΦ o de CD (Figs. 1 y 2). Se emplearon en todos los experimentos medios de cultivo y materiales plásticos (estériles y apirogénicos), comercialmente disponibles, para minimizar las probabilidades de contaminación con endotoxinas capaces de causar la maduración de las CD y activación de los MΦ.

La estimulación con diferentes concentraciones del PL (1, 5 ó 10 µg/mL) durante 18 ó 42 h causó similar efecto en los niveles de activación de los MΦ comprobado por los valores de IMF de las moléculas evaluadas (Fig. 3). Se escogió 5 µg/mL durante 18 h como concentración y tiempo de incubación ya que ésta es la concentración de PL que se ha empleado en estudios previos *in vitro* con el PL, así como en inmunizaciones de animales (Padrón y cols., 1999; Lapinet y cols., 2000; Perez y col. 2001).

Luego de estimular los MΦ con el PL se evidenció el incremento de CD40, CD80 y CD86; pero no de MHC-II (Fig. 4). La estimulación de los MΦ con LPS tampoco indujo incremento en la expresión de MHC-II. Resultados similares han sido encontrados al estimular los MΦ con el LPS proveniente de otros microorganismos (Steege y cols., 1982;

Koerner y cols., 1987). El IFN γ es la principal citoquina inductora de la expresión de MHC-II en los M Φ según ha sido demostrado con diferentes tipos de M Φ (Unanue, 1993). Bajo nuestras condiciones experimentales el IFN γ indujo la expresión de moléculas MHC-II en la superficie de los M Φ ; pero el PL adicionado simultáneamente inhibió este incremento (Fig. 5). Otros trabajos describen efectos similares con diferentes tipos de M Φ y antígenos. Por ejemplo, el Bacilo Calmette-Guérin de *Mycobacterium bovis* (Wojciechowski y cols., 1999) y el LPS purificado de *E. coli* (Steege y cols., 1982; Sicher y cols., 1995) han mostrado inhibir la expresión de MHC-II inducida por el IFN γ en los M Φ . Algunos mecanismos de inhibición han sido documentados, por ejemplo se conoce que una lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* inhibe la expresión de MHC-II y el procesamiento antigénico por los M Φ (Noss y cols., 2001). También se ha demostrado que, los mecanismos de inhibición por el LPS están mediados por el óxido nítrico (Sicher y cols., 1995). Sin embargo, alterando la secuencia de adición del LPS y del IFN γ a los M Φ se han encontrado resultados completamente diferentes. El LPS inhibe el incremento del MHC-II cuando se adiciona simultáneamente; pero aumenta su expresión cuando se adiciona después del tratamiento con IFN γ (Sicher y cols., 1995). Nuestros resultados evidencian que el PL adicionado simultáneamente con el IFN γ produce efecto de inhibición del MHC-II en M Φ similar al encontrado con el LPS.

Los M Φ derivados de la cepa C57/BL6 produjeron TNF α y los derivados de la cepa C3H/HeN produjeron TNF α e IL12(p70) (Tablas III y IV) en respuesta a la estimulación con el PL; pero siempre en menores concentraciones que las CD sometidas a igual estímulo (Fig.7 y Tablas III y IV). Otros estudios han demostrado que la exposición de los M Φ a

bacterias puede resultar en una secreción sustancial de la subunidad de 40 kDa de la IL12 (IL12(p40)); pero mínima secreción de IL12(p70) (Bost y Clements, 1997; Svensson y cols., 2001). El incremento en la expresión de las moléculas coestimuladoras y la producción de citoquinas como el TNF α se consideran señales de la activación de los M Φ luego de una estimulación antigénica (Gordon, 1999; Svensson y cols., 2001). La importante función de los M Φ en los sitios inflamatorios y su característica de no migrar a las áreas inductoras de la respuesta inmune, como lo hacen las CD, sugiere que la presentación antigénica no es su función fundamental y puede explicar el no incremento de MHC-II en ausencia de IFN γ . El hecho de que el PL active los M Φ , además de los neutrófilos (Lapinet y cols., 2000) permite que estas importantes células de la respuesta innata ayuden a controlar la infección natural, de curso inmediato, aún cuando no se ha desarrollado la respuesta adaptativa y contribuyan a crear el ambiente inflamatorio.

Al incubar las CD con el PL se evidenció un incremento en la expresión de MHC-II, CD40, CD80 y CD86 (Fig. 6), así como altos niveles de producción de TNF α e IL12(p70) (Fig.7). Estos cambios morfológicos y funcionales evidencian la maduración de las CD, lo cual se traduce en un incremento de su capacidad para presentar antígenos y armonizar una respuesta inmune específica *in vivo* (Hart, 1997; Kalinski y cols., 1999). La expresión de CD11c, molécula de superficie medida para monitorear los cultivos de CD, no cambió en presencia de los estímulos antigénicos empleados estando (Figs. 6 y 8). Este resultado está acorde con resultados similares obtenidos por otros investigadores (Rescigno y cols., 1999; Niedergang y cols., 2000).

La expresión de CD80 y la producción de IL12 se consideran, en el ámbito de la iniciación de la respuesta inmune, como evidencias de la polarización de la misma hacia un patrón

Th1, mientras que CD86 ha mostrado dirigir la respuesta inmune hacia Th2 por coestimular la producción de IL4 (Freeman y cols., 1993; Freeman y cols., 1995). Algunos informes al respecto aseguran que la administración de anti-CD80 junto a una inmunización ha mostrado generar predominantemente clones Th2 y prevenir la inducción de encefalomielitis alérgica experimental (enfermedad murina experimental inducida por células Th1 auto-reactivas). En contraste, el empleo de anti-CD86 aumenta la severidad de la misma y suprime la producción de IL4 e IL10 en células T (Kuchroo y cols., 1995). Bajo nuestras condiciones experimentales, obtuvimos un aumento en la expresión de ambas moléculas coestimuladoras al incubar las CD con PL. Sin embargo, las elevadas concentraciones de IL12(p70) inducidas sugieren la polarización de la respuesta hacia Th1. El mismo estímulo que indujo un incremento en la expresión del MHC-II en las CD no indujo ningún cambio apreciable en la expresión de esta molécula en los MΦ. El análisis comparativo de los cambios fenotípicos en las CD y los MΦ reveló que el PL ejerce efectos diferentes en la modulación de la expresión del MHC-II y en la producción de TNFα e IL12(p70) en estos dos tipos celulares lo que puede tener importantes implicaciones en sus funciones durante la infección por *N. meningitidis*. Además estos resultados sugieren que, las CD pueden ser una de las dianas potenciales de la actividad inmunoestimuladora del PL durante la inducción de la respuesta inmune por lo que proveen nuevas evidencias para la comprensión de los mecanismos inmunológicos tempranos desencadenados por los adyuvantes basados en PL.

Recientemente, se ha demostrado que las CD son capaces de producir IL2 e IL6 luego de la estimulación bacteriana. Esto sugiere que la IL2 es la molécula clave que confiere a las CD previamente activadas la capacidad única de activar linfocitos T vírgenes mientras que la

IL6 parece suprimir el efecto regulador de las poblaciones de linfocitos T CD25⁺ sobre los linfocitos T CD25⁻ (Granucci y cols., 2003; Jego y cols., 2003). Como complemento a la caracterización del PL como adyuvante, sería interesante determinar la producción de estas citoquinas por las CD incubadas con el PL, así como desarrollar un estudio similar con CD humanas.

Los componentes no-LPS del Proteoliposoma están implicados en la iniciación de la respuesta inmune; pero el LPS es esencial en la potenciación del patrón Th1

En este trabajo se ha explorado, por primera vez, el papel del LPS y de los componentes no-LPS en la inmunogenicidad del PL. El LPS, especialmente la porción del lípido A, es considerado el mediador inmune más efectivo en infecciones de bacterias Gram negativas (Heumann y Roger, 2002) y particularmente en la infección meningocócica (Steeghs y cols., 1999; Ingalls y cols., 2000). La presencia del LPS, unido a las vesículas de membrana externa naturales que se liberan durante la infección por *N. meningitidis*, se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Brandtzaeg y cols., 2001). De otro lado, entre los componentes no-LPS fundamentales del PL se encuentran las porinas, especialmente PorA, importante inmunógeno que contienen epítopes bactericidas y son reconocidas además como PAMPs (Kim y cols., 1989; van der Voort y cols., 1996; Massari y cols., 2002).

El empleo de ratones C3H/HeJ, hiporespondedores al LPS, permitió la realización de este estudio. Esta cepa de ratones posee una mutación puntual en el gen que codifica para el TLR4. Esta mutación genera un alelo negativo dominante que afecta la señalización mediada por TLR4 y suprime consecuentemente la respuesta al LPS (Hoshino y cols., 1999).

Para explorar el papel del LPS y de los componentes no-LPS del PL en la iniciación de la respuesta inmune, se estimularon las CD y los MΦ de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ con el PL. El incremento en la expresión de MHC-II y CD86 (Fig. 8) y la producción de IL12(p70) (Tabla IV y Fig. 10 B) en CD de animales hiporespondedores al LPS en respuesta al PL evidenciaron que los componentes no-LPS también están implicados en la iniciación de la respuesta inmune. Este resultado concuerda con evidencias previas acerca de la maduración de las CD de animales hiporespondedores al LPS incubadas con células completas de *N. meningitidis* (Bhasin y cols., 2001; Sprong y cols., 2001; Sprong y cols., 2002). Estos resultados coinciden particularmente con un estudio publicado recientemente por Al-Bader y cols. (2003) en el que también se obtuvo un incremento moderado en la expresión de MHC-II y CD86 en las CD derivadas de monocitos, estimuladas con membrana externa de una cepa mutada de *N. meningitidis* B deficiente de LPS. Además, ha sido reportada la habilidad de otras bacterias Gram negativas para inducir citoquinas pro-inflamatorias en ausencia del LPS (Uronen y cols., 2000; Rescigno y cols., 2002).

Para explorar el impacto del LPS y de los componentes no-LPS en la fase eferente de la respuesta inmune, se inmunizaron con el PL ratones C3H/HeN y C3H/HeJ. Se evaluó la inducción de IgG anti-PL, la composición de IgG1 e IgG2a en el suero de estos animales y la producción de IFNγ en células esplénicas re-estimuladas *in vitro* con PL. Los linfocitos T CD4⁺ capaces de crear un ambiente predominante de IFNγ e IL2 han sido clasificados como Th1 y se consideran promotores de una respuesta inmune de tipo celular (Mosmann y Coffman 1989; Romagnani, 1991). Entre las características distintivas de este patrón de respuesta se encuentra la producción de las subclases de IgG fijadoras de complemento, principalmente IgG1 en los humanos e IgG2a en los ratones, mediadoras fundamentales de

la actividad bactericida y opsonofagocítica del suero (Romagnani, 1994; Kikkawa y cols., 2002). Los elevados niveles de IgG anti-PL detectados en el suero de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ inmunizados con PL (Fig. 11) pudieran sugerir que el LPS no influye en la inducción de anticuerpos de clase IgG anti-PL. Sin embargo, al analizar las subclases de IgG inducidas por el PL en ambas cepas de ratones se encontró una relación IgG2a/IgG1 significativamente mayor ($p < 0,05$) en los animales respondedores que en los hiporespondedores al LPS (Fig. 12 y 13). Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Bhasin y cols., (2001), quienes al inmunizar ratones C3H/HeN o C3H/HeJ con una cepa salvaje de *N. meningitidis* B y una cepa mutante LPS negativa, sugirieron que el LPS modula la inducción de respuesta de IgG anti-porinas aunque no es esencial para que ésta se produzca. La influencia del LPS sobre la producción de IgG2a, sugiere que el LPS insertado en el PL potencia la inducción del patrón Th1.

La producción de citoquinas asociada a la proliferación de células T es una de las formas más importantes de evaluar la respuesta inmune. Especialmente, la producción de IFN γ es considerada una evidencia capital de la activación de células T CD4⁺ de tipo Th1 (Mosmann y Coffman, 1989; Romagnani, 1994). En trabajos previos, Pérez y cols., (2001), demostraron la presencia de IFN γ en CMSP de voluntarios inmunizados con VAMENGOC-BC[®]. Por ello, nos propusimos investigar la influencia de los componentes no-LPS en la producción de IFN γ inducida por el PL. Los altos niveles de IFN γ detectados en los sobrenadantes de cultivo de células de bazo de ratones respondedores al LPS, inmunizados con PL y re-estimuladas *in vitro* con el mismo, confirmaron la potente capacidad del PL para inducir un patrón de respuesta Th1. Sin embargo, en ratones hiporespondedores al LPS la producción de IFN γ disminuyó significativamente ($p < 0,05$)

(Fig. 14). Este resultado puede considerarse una evidencia de que el LPS es esencial en la potenciación de la respuesta Th1 inducida por el PL

Estos resultados en su conjunto, demuestran que el LPS no es el único PAMP involucrado en la iniciación de la respuesta inmune anti-PL, aunque modula la misma al potenciar la inducción del patrón Th1. En estudios futuros, sería interesante profundizar en la acción de las porinas presentes en el PL al realizar ensayos similares en animales deficientes de TLR2.

La actividad bactericida inducida por el Proteoliposoma es modulada por el LPS

El mecanismo efector clásicamente aceptado como correlato de protección contra la infección meningocócica es la actividad bactericida del suero. Un ensayo para determinar la actividad bactericida del suero exitoso es aquel que crea las condiciones para que el anticuerpo se una a los antígenos expuestos en la superficie bacteriana y active al complemento (activación clásica), resultando en bacteriólisis y muerte del organismo diana. Los ensayos usados actualmente para la detección de anticuerpos bactericidas son trabajosos y la mayoría no están validados. La validez de un nuevo método sólo puede ser demostrada a través de estudios interlaboratorios que deben ser adecuadamente descritos y planificados en un protocolo de validación. En este trabajo validamos un nuevo método capaz de reducir la variabilidad inherente a los ensayos tradicionales y asegurar la confiabilidad de los resultados.

Se realizaron ensayos de precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad) en los que se titularon muestras de sueros representativas de los tres niveles de actividad bactericida del suero (alto positivo, bajo positivo y negativo). La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones

realizadas a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. Teniendo en cuenta que se evaluaron seis réplicas de cada muestra por placa, se asumió como criterio de aceptación un porcentaje de coincidencia del título ≥ 50 .

En estos ensayos se obtuvo el título ± 1 dilución para todos los sueros evaluados, excepto para el suero alto positivo para el cual se obtuvo, en el ensayo de reproducibilidad, el título menos dos diluciones (Tabla V). Este resultado está acorde con estudios multilaboratorios realizados con el micro-ensayo tradicional para determinar la actividad bactericida del suero que informan que una variación en el título de ± 2 diluciones puede ocurrir cuando el ensayo es realizado en diferentes laboratorios (Maslanka y cols., 1997).

Este método nos permitió evaluar la funcionalidad de los anticuerpos presentes en el suero de ratones C3H/HeN y C3H/HeJ previamente inmunizados con el PL. El título bactericida obtenido en los ratones C3H/HeN fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que el obtenido en los ratones C3H/HeJ (Fig. 15). Este resultado se corresponde con la diferencia en la composición de subclases de IgG encontrada entre los sueros de ambas cepas de ratones. Las proteínas de membrana externa de *N. meningitidis B*, especialmente PorA, son los antígenos dianas fundamentales de los anticuerpos bactericidas. Sin embargo, los resultados obtenidos evidencian que las señales de peligro aportada por el LPS son necesarias para que se induzca una elevada respuesta bactericida funcional contra estas proteínas. Recientemente Arigita y cols. (2003) realizaron estudios de inmunogenicidad de la proteína PorA purificada que evidenciaron que, si bien ésta es capaz de inducir niveles de anticuerpos significativos, sólo en los animales inmunizados con esta proteína embebida en la membrana externa es su forma natural se indujo actividad bactericida. Estos resultados demostraron que la conformación tridimensional apropiada de PorA para la exposición de

los epítopes inmunodominantes, la forma en que es presentada esta proteína en la estructura de bicapa de la membrana, el tamaño de partícula, las cargas en la superficie y la presencia del LPS son factores que influyen directamente en la inducción de la respuesta bactericida funcional contra esta proteína (Aringita y cols., 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran, por primera vez, que el PL adyuva las proteínas del meningococo que contiene ya que, el LPS potencia la inducción de la actividad bactericida del suero al influir en la producción preferencial de la subclase IgG2a sobre la IgG1. Aunque la reactogenicidad del LPS lo ha hecho un elemento indeseado en el desarrollo de las vacunas anti-meningocócicas (Steeghs y cols., 1999), estos resultados esclarecen la importancia que el mismo tiene en la iniciación y polarización de la respuesta inmune y por tanto avalan la necesidad de mantenerlo en cantidades controladas dentro de estas formulaciones.

El Proteoliposoma puede potenciar la activación de los linfocitos T CD4⁺ e inducir la activación cruzada de los linfocitos T CD8⁺ específicos contra un antígeno incorporado en su estructura

El papel de las CPA del hospedero es muy importante en la inducción de una buena respuesta inmune. Entre ellas, las CD son cruciales por su capacidad de presentar antígenos proteicos exógenos en MHC-I y activar los linfocitos T CD8⁺ vírgenes. Este proceso conocido como activación cruzada ha sido demostrado para antígenos derivados de tumores, células infectadas con virus y también ha sido demostrado para microorganismos infecciosos (Yrlid y cols., 2000; Harding y cols., 2003). El hecho de que se induzca activación cruzada o tolerancia cruzada depende del estado de maduración de las CD y de los niveles de presentación del péptido en MHC-I (Melief y cols., 2003). Sin embargo, la

exposición de las CD a antígenos solubles (Ej. OVA) puede resultar en una presentación eficiente a células T CD4⁺ mientras que, una presentación cruzada de OVA soluble a células T CD8⁺ es difícil de alcanzar en ausencia de un estímulo y/o de un sistema liberador de antígenos apropiados (Simmons y cols., 1999; Delamarre y cols., 2003).

Nuestros resultados han evidenciado que el PL induce cambios en las CD que según es conocido se correlacionan con la maduración y el incremento de las habilidades de presentación antigénica en estas células. La inclusión de OVA como antígeno modelo en el PL nos permitió caracterizar sus habilidades para favorecer la presentación antigénica. Las CD incubadas con PL-OVA presentaron los péptidos de OVA tanto en MHC-II como en MHC-I y activaron ambos hibridomas de células T. Interesantemente, las CD expuestas a PL-OVA indujeron la activación cruzada del hibridoma de células T CD8⁺ que no pudo ser activado por las CD expuestas sólo a OVA soluble (Fig. 18). Estos resultados evidencian que el PL puede constituir un sistema para entregar antígenos a las CD, favorecer la activación cruzada de células T CD8⁺ y aumentar la activación de células T CD4⁺. Además, constituyen la primera evidencia, en el ámbito de la iniciación de la respuesta inmune, de las potencialidades del PL como posible inductor de actividad CTL.

La actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ es uno de los mecanismos inmunes más eficientes para eliminar las células infectadas por patógenos intracelulares o las células tumorales. Estas infecciones y el cáncer implican la producción de gran cantidad de antígenos en el citosol celular, muchos de los cuales son trasladados hacia la superficie celular asociados a moléculas del MHC-I (Heemels y Ploegh, 1995; Rock, 1996; Jondal y cols., 1996; Reimann y Kaufmann, 1997). Los linfocitos T CD8⁺ reconocen antígenos presentados en el contexto del MHC-I y son capaces de eliminar a las células infectadas a

través de la liberación de perforinas, producción de granzimas e interacción de los mediadores Fas-FasL (O'Hagan y cols., 2001).

Entre los adyuvantes que inducen la activación de CTL se encuentran el: MF59; QS21; AS02; AS04; MPL; ISCOM; oligonucleótidos CpG del ADN bacteriano y cocleatos derivados de lípidos. Sin embargo, sólo el MF59 ha sido licenciado en una vacuna para uso en humanos (Edelman, 2002; Kenney y cols., 2002). Es importante destacar que por mucho tiempo se consideró a la actividad CTL como el principal componente de la respuesta celular. Hoy se sabe que a pesar de que ésta es inducida durante la respuesta Th1, no todas las respuestas de este tipo provocan la inducción de CTL. Por ello, la necesidad de buscar adyuvantes que induzcan, además de un patrón Th1, actividad CTL. Todas las evidencias anteriores sustentan la importancia de los resultados obtenidos en esta tesis que caracterizan al PL en su capacidad de favorecer la presentación antigénica, lo cual puede tener implicaciones en la inducción de respuestas citotóxicas. Una vez que se incorporen al PL antígenos de virus, bacterias intracelulares o tumores sería importante evaluar la respuesta CTL inducida contra los mismos.

El Proteoliposoma ejerce *in vivo* efecto adyuvante sobre un antígeno incorporado en su estructura

Finalmente, nos propusimos explorar la capacidad adyuvante del PL *in vivo*. Para ello, inmunizamos ratones C3H/HeN y C3H/HeJ con PL-OVA, OVA o T-OVA y determinamos la inducción de IgG anti-OVA y de las subclases IgG1 e IgG2a anti-OVA.

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los niveles de IgG anti-OVA inducidos en ratones C3H/HeN por PL-OVA o por T-OVA (Fig. 19). El TiterMax Gold es un adyuvante que sólo puede ser empleado en ensayos de laboratorio debido a su toxicidad.

El hecho de que el PL, sin ser un compuesto tóxico, pueda adyugar tan eficientemente como el TiterMax Gold a una proteína soluble poco inmunogénica como OVA tiene gran relevancia. Además, PL-OVA indujo respuesta de IgG anti-OVA en ratones hiporespondedores al LPS, aunque ésta fue significativamente menor ($p < 0,05$) que en los ratones respondedores al LPS (Fig. 19). Este resultado evidencia que el LPS influye en la capacidad adyuvante del PL.

El análisis de la relación IgG2a/IgG1 inducida por PL-OVA o T-OVA en animales C3H/HeN evidenció que el PL, a diferencia del TiterMax Gold, favorece la inducción de anticuerpos de la subclase IgG2a específicos contra el antígeno incorporado en su estructura (Fig. 20). Además, se evidenció que esta capacidad de inducir IgG2a depende del LPS puesto que disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en los ratones C3H/HeJ inmunizados con PL-OVA. Este conjunto de resultados demuestra la capacidad del PL como adyuvante inductor de una respuesta Th1 contra un antígeno proteico, incorporado en su estructura y administrado por vía intramuscular en ratones.

Consideraciones generales

Los datos obtenidos sugieren que el PL posee actividad inmunopotenciadora sobre aquellas células involucradas en la iniciación de la respuesta inmune ya que induce la maduración de las CD y la activación de los MΦ. EL LPS nativo insertado en la estructura proteoliposómica tiene una función importante en la fase aferente de la respuesta inmune donde potencia la polarización de la respuesta hacia el patrón Th1, aunque otros componentes no-LPS del PL también influyen en la iniciación y polarización de la respuesta inmune. El PL adyuva en primer lugar a las proteínas de *N. meningitidis* B presentes en su estructura ya que un mecanismo efector tan importante como la actividad

bactericida se afecta en ausencia de las señales de peligro que aporta el LPS. Además, el PL es capaz de entregar a las CD un antígeno incorporado en su estructura, inducir la maduración de éstas y favorecer la activación cruzada de linfocitos T CD8⁺. El PL induce preferencialmente anticuerpos de la subclase IgG2a contra un antígeno proteico poco inmunogénico como OVA incorporado en su estructura. En su conjunto, los resultados esclarecen los mecanismos de iniciación y polarización de la respuesta inmune inducida por el PL y evidencian el potencial del mismo como adyuvante para el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales.

VI. CONCLUSIONES

1. El Proteoliposoma induce la maduración de las células dendríticas y la activación de los macrófagos murinos.
2. Los componentes no-LPS del Proteoliposoma influyen en la maduración de las células dendríticas de murinos.
3. El LPS es esencial en la polarización de la respuesta inmune hacia el patrón Th1 inducida por el Proteoliposoma en murinos. Particularmente en la producción de IFN γ , la inducción de IgG2a anti-PL y por tanto en la actividad bactericida del suero.
4. El Proteoliposoma potencia la activación de los linfocitos T CD4⁺ e induce la activación cruzada de los linfocitos T CD8⁺ en respuesta a la ovoalbúmina incorporada en su estructura.
5. El Proteoliposoma administrado intramuscularmente en murinos, ejerce un efecto adyuvante sobre la ovoalbúmina incorporada en su estructura.

VII. RECOMENDACIONES

1. Determinar la producción de IL2 e IL6 por las células dendríticas estimuladas con Proteoliposoma.
2. Determinar la actividad inmunopotenciadora del Proteoliposoma sobre células dendríticas humanas.
3. Profundizar en la acción de otros PAMPs (porinas y posiblemente peptidoglicano) presentes en el Proteoliposoma.
4. Evaluar la inducción de la respuesta CTL contra ovoalbúmina u otros antígenos incorporados en el Proteoliposoma.
5. Evaluar la capacidad adyuvante del Proteoliposoma sobre otros antígenos empleando diferentes vías de inmunización y aplicarlo en humanos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Abdillahi H, JT Poolman. 1987.** *Neisseria meningitidis* group B sero/subtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. *Microb. Pathog.* 4:27-32.
2. **Akashi S, R Shimazu, H Ogata, Y Nagai, K Takeda, M Kimoto, K Miyake. 2000.** Cutting Edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 164(7):3471-5.
3. **Al-Bader T, M Christodoulides, JE Heckels, J Holloway, AE Semper, PS Friedmann. 2003.** Activation of human dendritic cells is modulated by components of the outer membranes of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 71(10):5590-7.
4. **Alpan O, E Bachelder, E Isil, H Arnheiter, P Matzinger. 2004.** 'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. *Nat Immunol.* 6:615-22.
5. **Arigita C, GF Kersten, T Hazendonk, WE Hennink, DJ Crommelin, W Jiskoot. 2003.** Restored functional immunogenicity of purified meningococcal PorA by incorporation into liposomes. *Vaccine* 21(9-10):950-60.
6. **Arko RJ. 1989.** Animal model from pathogenic *Neisseria* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:S56-9.
7. **Ausubel FM, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith, K Struhl. 1995.** Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
8. **Banchereau J, RM Steinman. 1998.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673):245-52.

9. **Batista FD, D Iber, MS Neuberger. 2001.** B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 411(6836):489-94.
10. **Bhasin N, Y Ho, LM Wetzler. 2001.** *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharide modulates the specific humoral immune response to neisserial porins but has no effect on porin-induced upregulation of co-stimulatory ligand B7-2. *Infect. Immun.* 69:5031-6.
11. **Bjune G, EA Høiby, JK Grønnesby, O Arnesen, JH Fredriksen, A Halstensen, E Holten, AK Lindbak, H Nokleby, E Rosenqvist. 1991.** Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 338(8775):1093-6.
12. **Bost KL, DJ Clements. 1997.** Intracellular *Salmonella dublin* induces substantial secretion of the 40-kilodalton subunit of interleukin-12 (IL-12) but minimal secretion of IL-12 as a 70-kilodalton protein in murine macrophages. *Infect. Immun.* 65:3186-92.
13. **Brandtzaeg P, A Bjerre, R Ovstebo, B Brusletto, GB Joo, P Kierulf. 2001.** *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharides in human pathology. *J.Endotoxin Res.* 7:401-20.
14. **Broome CV. 1986.** The carrier state: *Neisseria meningitidis*. *J. Antimicrob. Chemoter.* 18 Suppl A:25-34.
15. **Broughton PMG, C Bergonzi, G Lindstedt, IG Loeber, PG Malan, M Mathieu, S Pozet. 1986.** Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use. Part 1. Quantitative tests. Vol 3, No. 3. London: European Committee for Clinical Laboratory Standards.

16. **Bulut Y, E Faure, L Thomas, O Equils, M Arditi. 2002.** Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J. Immunol.* 167:987-94.
17. **Burns K, J Clatworthy, L Martin, F Martinon, C Plumpton, B Maschera, A Lewis, K Ray, J Tschopp, F Volpe. 2000.** Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell Biol.* 2(6):346-51.
18. **Campa C, VG Sierra, MM Gutiérrez, G Biset, LG García, G Puentes, MC Sampedro, F Sotolongo, EX Le Riverand, MA Galguera. 1997.** Method of producing *Neisseria meningitidis* B vaccine, and vaccine produced by method. United States Patent. Patent Number: 5,597,572.
19. **Cartwright K, R Morris, H Rumke, A Fox, R Borrow, N Begg, P Richmond, J Poolman. 1999.** Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (Por A) outer membrane proteins. *Vaccine* 17:2612-9.
20. **Cartwright K, JM Stuart, DM Jones, ND Noah. 1987.** The Stonehouse survey: nasofaringeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol. Infect.* 99:591-601.
21. **Cella M, M Salio, Y Sakakibara, H Langen, I Julkunen, A Lanzavecchia. 1999.** Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* 189:821-9.

22. **Chuang T-H, RJ Ulevitch. 2000.** Cloning and characterization of a sub-family of human Toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw.* 11:372-78.
23. **Chuang T-H, RJ Ulevitch. 2001.** Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1518:157-61.
24. **Constant SL, K Bottomly, 1997.** Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15:297-322.
25. **Cyster JG. 1999.** Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 189:447-50.
26. **Da Silva Correia J, K Soldau, U Christen, PS Tobias, J Ulevitch. 2001.** Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the protein in its membrane receptor complex. *J. Biol Chem.* 276:21129-35.
27. **Davidson HW, PA Reid, A Lanzavecchia, C Watts. 1991.** Processed antigen binds to newly synthesized MHC class II molecules in antigen-specific B lymphocytes. *Cell* 67(1):105-16.
28. **de Jong EC, PL Vieira, P Kalinski, JH Schuitemaker, Y Tanaka, EA Wierenga, M Yazdanbakhsh, ML Kapsenberg. 2002.** Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cell-polarizing signals. *J. Immunol.* 168:1704-09.
29. **Delamarre L, H Holcombe, I Mellman. 2003.** Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J. Exp. Med.* 198:111-22.

30. **Dellepiane N, E Griffiths, BJ Milstien. 2000.** New challenges in assuring vaccine quality. Bull WHO 78:155-62.
31. **Ding A, Hwang S, Lander HM, Xie QW. 1995.** Macrophages derived from C3H/HeJ (Lpsd) mice respond to bacterial lipopolysaccharide by activating NF-kappa B. J Leukoc Biol. 57(1):174-9.
32. **d'Ostiani CF, G Del Sero, A Bacci, C Montagnoli, A Spreca, A Mencacci, P Ricciardi-Castagnoli, L Romani. 2000.** Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. J. Exp. Med.191:1661-74.
33. **Du X, A Poltorak, Y Wei, B Beutler. 2000.** Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. Eur. Cytokine Netw. 11:362-71.
34. **Dustin ML, LB Dustin. 2001.** The immunological relay race: B cells take antigen by synapse. Nat Immunol 2(6):480-2.
35. **Edelman R. 2002.** The development and use of vaccine adjuvant. Mol. Biothechnol. 21(2):129-48.
36. **Ferriol X, AG García, R Ochoa, I Bravo, R Blanco, E Estrada. 1999.** Validación de un ELISA para la cuantificación de IgG humana anti proteína de *Neisseria meningitidis* serogrupo B. Rev. Cuba. Med. Trop. 51:99–105.
37. **Finne J, M Leinonen, PH Makela. 1983.** Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. Lancet 2(8346):355-7.

38. **Fitzgerald KA, EM Palsson-McDermott, AG Bowie, CA Jefferies, AS Mansell, G Brady, E Brint, A Dunne, P Gray, MT Harte, D McMurray, DE Smith, JE Sims, TA Bird, LA O'Neill. 2001.** Mal (MyDS8-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413(6851):78-83.
39. **Frasch CE. 1994.** Serogroup and serotype classification of bacterial pathogens. *Methods Enzymol.* 235:159-74.
40. **Frasch CE. 1995.** Meningococcal vaccines: past, present and future. In: Cartwright, K., ed. *Meningococcal disease.* New York: John Wiley & Sons p 245-83.
41. **Freeman GJ, F Borriello, RJ Hodes, H Reiser, JG Gribben, JW Ng, J Kim, JM Goldberg, K Hathcock, G Laszlo. 1993.** Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J Exp Med.* 178(6):2185-92.
42. **Freeman GJ, VA Boussiotis, A Anumanthan, GM Bernstein, XY Ke, PD Rennert, GS Gray, JG Gribben, LM Nadler. 1995.** B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 2(5):523-32.
43. **Gagliardi MC, F Sallusto, M Marinaro, A Langenkamp, A Lanzavecchia, MT DeMagistris. 2000.** Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur. J. Immunol.* 30:2394-2403.
44. **Gillis S, MM Ferm, W Ou, KA Smith. 1978.** T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol.* 120(6):2027-32
45. **Goldschneider I, EC Gotschlich, MS Arstenstein. 1969.** Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med.* 129:1307-26.

46. **Gordon S. 1999.** Macrophages and the immune response. In: Paul, W. E., ed. *Fundamental Immunology*. LipincottRaven, Philadelphia, PA, 4th ed. p. 533-46.
47. **Granucci F, S Feau, V Angeli, F Trottein, P Ricciardi-Castagnoli. 2003.** Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J Immunol* 170(10):5075-81.
48. **Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena. 2003.** ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425(6956):397-402.
49. **Harding CV, L Ramachandra, MJ Wick. 2003.** Interaction of bacteria with antigen presenting cells: influences on antigen presentation and antibacterial immunity. *Curr Opin Immunol* 15: 112-9.
50. **Harris DP, L Haynes, PC Sayles, DK Duso, SM Eaton, NM Lepak, LL Johnson, SL Swain, FE Lund. 2000.** Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 1(6):475-82.
51. **Hart DNJ. 1997.** Dendritic cells: unique leukocyte populations, which control the primary immune response. *Blood* 90:3245-87.
52. **Hashimoto C, KL Hudson, KV Anderson. 1988.** The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
53. **Heath WR, GT Belz, GMN Behrens, CM Smith, SP Forehan, IA Parish, GM Davey, NS Wilson, FR Carbone, JA Villadangos. 2004.** Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological Reviews* 199: 9–26.

54. **Heath WR, FR Carbone. 2001.** Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature Rev. Immunol.* 1:126–134.
55. **Heemels M-T, H Ploegh. 1995.** Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 64:463-91.
56. **Heumann D, T Roger. 2002.** Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin. Chim. Acta* 323(1-2):59-72.
57. **Hirschfeld M, JJ Weis, V Toshchakov, CA Salkowski, MJ Cody, DC Ward, N Qureshi, SM Michalek, SN Vogel. 2001.** Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.* 69(3):1477-82.
58. **Hoffman JA, FC Kafatos, CA Janeway Jr, RAB Ezekowitz. 1999.** Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-18.
59. **Hong T, GM Barton, R Medzhitov. 2001.** TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2:835-41.
60. **Hoshino K, O Takeuchi, T Kawai, H Sanjo, T Ogawa, Y Takeda, K Takeda, S Akira. 1999.** Cutting Edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J. Immunol.* 162(7):3749-52.
61. **Houde M, S Bertholet, E Gagnon, S Brunet, G Goyette, A Laplante, MF Princiotta, P Thibault, D Sacks, M Desjardins. 2003.** Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425(6956):402-6.
62. **Inaba K, M Inaba, N Romani, H Aya, M Deguchi, S Ikehara, S Muramatsu, RM Steinman. 1992.** Generation of large numbers of dendritic cells from mouse

- bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176:1693–1702.
63. **Ingalls RR, E Lien, DT Golenbock. 2000.** Differential roles of TLR2 and TLR4 in the host response to Gram-negative bacteria: lessons from a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*. *J Endotoxin Res.* 6(5):411-5.
64. **Ito T, R Amakawa, T Kaisho, H Hemmi, K Tajima, K Uehira, Y Ozaki, H Tomizawa, S Akira, S Fukuhara. 2002.** Interferon- α and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J. Exp. Med.* 195(11):1507-12.
65. **Janeway ChA Jr., P Travers, M Walport, M Shlomchik. 2001.** Flow cytometry and FACS analysis. In: Austin P and E Lawrence (Ed.). *Immunobiology, the immune system in health and disease.* Garland Publishing, 5th edn. p. 636-8
66. **Jarrossay D, G Napolitani, M Colonna, F Sallusto, A Lanzavecchia. 2001.** Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31:3388-93.
67. **Jego G, AK Palucka, JP Blanck, C Chalouni, V Pascual, J Banchereau. 2003.** Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 19(2):225-34.
68. **Jiang Q, S Akashi, K Miyake, HR Petty. 2000.** Cutting Edge: Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and Toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-KB. *J. Immunol.* 165:3541-4.

69. **Jin F, CF Nathan, A Ding. 1999.** Paradoxical preservation of a lipopolysaccharide response in C3H/HeJ macrophages: induction of matrix metalloproteinase-9. *J. Immunol.* 162(6):3596-600.
70. **Jondal M, R Schirmbeck, J Reimann. 1996.** MHC class I restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 5:295-302.
71. **Kadowaki N, S Ho, S Antonenko, RW Malefyt, RA Kastelein, F Bazan, YJ Liu. 2001.** Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 194(6):863-69.
72. **Kaisho T, S Akira. 2003.** Regulation of Dendritic Cell Function Through Toll-Like Receptors. *Curr. Mol. Med.* 3:759-771.
73. **Kalinski P, CM Hilkens, EA Wierenga, ML Kapsenberg. 1999.** T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* 20:561-7.
74. **Kaplan MH, YL Sun, T Hoey, MJ Grusby. 1996.** Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature.* 382(6587):174-7.
75. **Kawai T, O Adachi, T Ogawa, K Takeda, S Akira. 1999.** Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11:115-22.
76. **Kawai T, O Takeuchi, T Fujita, J Inoue, PF Muhlradt, S Sato, K Hoshino, S Akira. 2001.** Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IRF-3 and the expression of a subset of LPS-inducible genes. *J. Immunol.* 167(10):5887-94.

77. **Kenney RT, RN Rabinovich, S Pichyangkul, VL Price, HD Engers. 2002.** 2nd meeting on novel adjuvants currently in/close to human clinical testing. World Health Organization-Organization Mondiale de la Sante Fondation Merieux, Annecy, France, 5-7 June 2000. *Vaccine* 20(17-18):2155-63.
78. **Kikkawa E, M Yamashita, M Kimura, M Omori, K Sugaya, C Shimizu, T Katsumoto, M Ikekita, M Taniguchi, T Nakayama. 2002.** T(h)1/T(h)2 cell differentiation of developing CD4 single-positive thymocytes. *Int Immunol.* 14(8):943-51.
79. **Kim JJ, RE Mandrell, JM Griffiss. 1989.** *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* share oligosaccharide epitopes but lack common capsular and 1, 2 and 3 protein epitope. *Infec. Immun.* 57:602-8.
80. **Koerner TJ, TA Hamilton, DO Adams. 1987.** Suppressed expression of surface Ia on macrophages by lipopolysaccharide: evidence for regulation at the level of accumulation of mRNA. *J Immunol.* 139(1):239-43.
81. **Kopp EB, R Medzhitov. 1999.** The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11:13-8.
82. **Kopf M, Y Le Gros, M Bachmann, MC Lamers, H Bluethmann, G Kohler. 1993.** Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362:245-8.
83. **Kriz P, B Kriz, E SvandOva, M Musilek. 1999.** Antimeningococcal herd immunity in the Czech Republic-influence of an emerging clone, *Neisseria meningitidis* ET-15/37. *Epidemiol. Infect.* 123:193-200.

84. **Krug A, A Towarowski, S Britsch, S Rothenfusser, V Hornung, R Bals, T Giese, H Engelmann, S Endres, AM Krieg, G Hartmann. 2001.** Toll like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* 31(10):3026-37.
85. **Kuchroo VK, MP Das, JA Brown, AM Ranger, SS Zamvil, RA Sobel, HL Weiner, N Nabavi, LH Glimcher. 1995.** B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 10;80(5):707-18.
86. **Lanzavecchia A. 1998.** Immunology. Licence to kill. *Nature* 393(6684):413-4.
87. **Lapinet JA, P Scapini, F Calzetti, O Pérez, MA Cassatella. 2000.** Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun.* 12:6917-23.
88. **Lastre M, Pérez O, Labrada A, Pérez DA, Bracho GR, del Campo JM, Sierra VG, Bidot I, Zayas C, Facenda E, Pérez JE, Rodríguez C. 2004.** Composición vacunal contra las alergias y método para su obtención y empleo en el tratamiento de las mismas. OCPI, Patente No. 22983.
89. **Le Bon A, N Etchart, C Rossmann, M Ashton, S Hou, D Gewert, P Borrow, DF Tough. 2003.** Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol.* 4:1009-15.

90. **Lechler R, G Aichinger, L Lightstone. 1996.** The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* 151:51-79.
91. **Li Y, Y Ke, PD Gottlieb, JA Kapp. 1994.** Delivery of exogenous antigen into the major histocompatibility complex class I and class II path-way by electroporation. *J. Leukoc. Biol.* 56:616–24.
92. **Lu HT, DD Yang, M Wysk, E Gatti, I Mellman, RJ Davis, RA Flavell. 1999.** Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J.* 18:1845–57.
93. **Maclennan J. 2001.** Meningococcal group C conjugate vaccines. *Arch. Dis. Child.* 84:383-6.
94. **Magram J, SE Connaughton, RR Warriar, DM Carvajal, CY Wu, J Ferrante, C Stewart, U Sarmiento, DA Faherty, MK Gately. 1996.** IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4(5):471-81.
95. **Majorov KB, IV Lyadova, TK Kondratieva, EB Eruslanov, EI Rubakova, MO Orlova, VV Mischenko, AS Apt 2003.** Different Innate Ability of I/St and A/Sn Mice To Combat Virulent Mycobacterium tuberculosis: Phenotypes Expressed in Lung and Extrapulmonary Macrophages. *Infect Immun.* 71(2):697-707
96. **Marsh CB, MD Wewers. 1996.** The pathogenesis of sepsis. Factors that modulate the response to Gram negative bacterial infection. *Clinics in Chest Medicine* 17:183-197.
97. **Maslanka SE, LL Gheesling, DE Libutti, KBJ Donaldson, HS Harakeh, JK Dykes, FF Arhin, SJN Devi, CE Frasch, JC Huang, P Kriz-Kuzemenska, RD**

- Lemmon, M Lorange, CCAM Peeters, S Quataert, JY Tai, GM Carlone, The Multilaboratory Study Group. 1997.** Standardization and a Multilaboratory Comparison of *Neisseria meningitidis* Serogroup A and C Serum Bactericidal Assays. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:156-167.
98. **Massari P, P Henneke, Y Ho, E Latz, DT Golenbock, LM Wetzler. 2002.** Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. J Immunol. 168(4):1533-7.
99. **Medzhitov R, P Preston-Hurlburt, CA Jr Janeway. 1997.** A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388:394-397.
100. **Melief CJ. 2003.** Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by Dendritic Cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? Eur J Immunol. 33(10):2645-54.
101. **Mesa C, J De Leon, K Rigley, LE Fernandez. 2004.** Very small size proteoliposomes derived from *Neisseria meningitidis*: an effective adjuvant for Th1 induction and dendritic cell activation. Vaccine 22(23-24):3045-52.
102. **Milagres LG, SR Ramos, CT Sacchi, CE Melles, VS Vieira, H Sato, GS Brito, JC Moraes, CE Frasch. 1994.** Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. Infect Immun. 62: 4419-24.
103. **Mills KH, P McGuirk. 2004.** Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. Semin Immunol. 16:107-17.

104. **Miyake K, Y Yamashita, M Ogata, T Sudo, M Kimoto. 1995.** RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J. Exp. Med.* 154:3333-40.
105. **Mosmann TR, AM Livingstone. 2004.** Dendritic cells: the immune information management experts. *Nat Immunol.* 6:564-6.
106. **Mosmann TR, RL Coffman. 1989.** Th1 and Th2 cell: different pattern of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-73.
107. **Mountzouros KT, AP Howell. 2000.** Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in a fluorescent-based serum bactericidal assay for serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* 38:2878-84.
108. **Muzio M, D Bosisio, N Polentarutti, OD'Amico, A Stoppacciaro, R Mancinelli, C van't Veer, G Penton-Rol, LP Ruco, P Allavena, A MantOvani. 2000.** Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164(11):5998-6004.
109. **Nagai Y, S Akashi, M Nagafuku, M Ogata, Y Iwakura, S Akira, T Kitamura, A Kosugi, M Kimoto, K Miyake. 2002.** Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 3(7):667-72.
110. **Netea MG, M van Deuren, BJ Kullberg, JM Cavaillon, WM Van der Maer. 2002.** Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol.* 23:135-39.

111. **Niedergang F, JC Sirard, CT Blanc, JP Kraehenbuhl. 2000.** Entry and survival of *Salmonella typhimurium* in dendritic cells and presentation of recombinant antigens do not require macrophage-specific virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97(26):14650-5.
112. **Norbury CC, BJ Chambers, AR Prescott, HG Ljunggren, C Watts. 1997.** Constitutive macropinocytosis allows TAP-de-pendent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. Eur. J. Immunol. 27:280-8.
113. **Noronha CP, CJ Struchiner, ME Halloran. 1995.** Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro, Brazil: a case-control study. Int J Epidemiol. 24:1050-70.
114. **Noss EH, RK Pai, TJ Sellati, JD Radolf, J Belisle, DT Golenbock, WH Boom, CV Harding. 2001.** Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol. 167(2):910-8.
115. **O'Hagan D, M Mackicham, M Singh. 2001.** Recent advance in adjuvants for infection disease. Biomol Eng 18(3):69-85.
116. **O'Hagan D, NM Valiante. 2003.** Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. Nature Review Drug Discovery 2:727-735.
117. **Ogata H, I Su, K Miyake, Y Nagai, S Akashi, I Mecklenbrauker, K Rajewsky, M Kimoto, A Tarakhovsky. 2000.** The Toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharides signaling in B cells. J. Exp. Med. 192(1):23-29.

118. **Ozinsky A, DM Underhill, JD Fontenot, AM Hajjar, KD Smith, CB Wilson, L Schroeder, A Aderem. 2000.** The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13766-71.
119. **Padrón J, Y Bebelagua, M Lastre, J Lapinet, C Zayas, Y Quintero, M Diaz, O Pérez. 1999.** Nitric Oxide participates in the immune response against *Neisseria meningitidis* serogroup B. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 25:385-9.
120. **Pang ZJ. 2003.** Effect of polysaccharide Krestin on the up-regulation of macrophage colony-stimulating factor gene expression in protecting mouse peritoneal macrophages from oxidative injury. *Am J Chin Med.* 31(1):11-23.
121. **Peltola H. 1983.** Meningococcal disease: still with us. *Rev. Infect. Dis.* 5:71-91.
122. **Pérez O, M Lastre, J Lapinet, G Bracho, M Díaz, C Zayas, C Taboada, G Sierra. 2001.** Immune response induction and new effector mechanisms possibly involved in protection conferred by the Cuban anti-meningococcal BC vaccine. *Infect Immun.* 69:4502-8.
123. **Perkins BA, K Jonsdottir, H Briem, E Griffiths, BD Plikaytis, EA Hoiby, E Rosenqvist, J Holst, H Nokleby, F Sotolongo, G Sierra, HC Campa, GM Carlone, D Williams, J Dykes, D Kapczynski, E Tikhomirov, JD Wenger, CV Broome. 1998.** Immunogenicity of two efficacious outer membrane protein-based serogroup B meningococcal vaccines among young adults in Iceland. *J Infect Dis.* 177(3):683-91.

124. **Pfeifer JD, MJ Wick, RL Roberts, K Findlay, SJ Normark, CV Harding. 1993.** Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361:359-62.
125. **Pollard AJ, ER Moxon. 2002.** The meningococcus tamed?. *Arch Dis Child.* 87:13-17.
126. **Poltorak A, X He, I SmirnOva, MY Liu, C Van Huffel, X Du, D Birdwell, E Alejos, M Silva, C Galanos, M Freudenberg, P Ricciardi-Castagnoli, B Layton, B Beutler. 1998.** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in *Tlr4* gene. *Science* 282(3396):2085-8.
127. **Qureshi ST, L Lariviere, G Leveque, S Clermont, KJ Moore, P Gros, D Malo. 1999.** Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (*Tlr4*). *J. Exp. Med.* 189(4):615-25.
128. **Reimann J, SHE Kaufmann. 1997.** Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 9:462-9.
129. **Rescigno M, F Granucci, S Citterio, M Foti, P Ricciardi-Castagnoli. 1999.** Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today* 20(5):200-3.
130. **Rescigno M, M Martino, CL Sutherland, MR Gold, P Ricciardi-Castagnoli. 1998.** Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signalling pathways. *J. Exp. Med.* 188:2175-80.
131. **Rescigno M, M Urbano, M Rimoldi, B Valzasina, G Rotta, F Granucci, P Ricciardi-Castagnoli. 2002.** Toll-like receptor 4 is not required for the full

- maturation of dendritic cells or for the degradation of Gram-negative bacteria. Eur J Immunol. 32(10):2800-6.
132. **Rettenmier CW, CJ Sherr. 1989.** The mononuclear phagocyte colony-stimulating factor (CSF-1, M-CSF). Hematol Oncol Clin North Am. 3(3):479-93.
133. **Rivera A, CC Chen, N Ron, JP Dougherty, Y Ron. 2001.** Role of B cells as antigen-presenting cells *in vivo* revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. Int Immunol 13(12):1583-93.
134. **Rock FL, G Hardiman, JC Timans, RA Kastelein, JF Bazan. 1998.** A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:588-93.
135. **Rock KL. 1996.** A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. Immunol. Today 17:131-7.
136. **Romagnani S. 1991.** Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. Immunol. Today 12(8):256-7.
137. **Romagnani S. 1994.** Human TH1 and TH2 subsets: "eppur si muove"! Eur Cytokine Netw. 5(1):7-12.
138. **Ruggeberg JU, AJ Pollard. 2004.** Meningococcal vaccines. Pediatr. Drugs 6(4):251-66.
139. **Sallusto F, A Lanzavecchia. 1994.** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down regulation by tumor necrosis factor K. J. Exp. Med. 179:1109-18.

140. **Sallusto F, A Lanzavecchia. 1999.** Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J. Exp. Med.* 189:611-4.
141. **Sallusto F, M Cella, C Danieli, A Lanzavecchia. 1995.** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389-400.
142. **Seljelid R, T Eskeland. 1993.** The biology of macrophages: I. General principles and properties. *Eur. J. Haematol.* 51(2):267-75.
143. **Shimazu R, S Akashi, U Ogata, Y Nagai, K Fukudome, K Miyake, M Kimoto. 1999.** MD-2, a molecule that confers Lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp. Med.* 189(11):1777-82.
144. **Sicher SC, GW Chung, MA Vazquez, CY Lu. 1995.** Augmentation or inhibition of IFN-gamma-induced MHC class II expression by lipopolysaccharides. The roles of TNF-alpha and nitric oxide, and the importance of the sequence of signaling. *Immunol.* 155(12):5826-34.
145. **Sierra GV, HC Campa, MN Varcарcel, IL Garcia, PL Izquierdo, PF Sotolongo, GV Casanueva, CO Rico, CR Rodriguez, MH Terry. 1991.** Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann.* 14: 195-210
146. **Simmons CP, P Mastroeni, R Fowler, M Ghaem-maghani, N Lycke, M Pizza, R Rappuoli, G Dougan. 1999.** MHC class I-restricted cytotoxic lymphocyte responses induced by enterotoxin-based mucosal adjuvants. *J Immunol* 163:6502-10.

147. **Simon V, MR Bono. 2002.** Citometría de Flujo: Principios Básicos y aplicaciones. En: Palomo I, A Ferreira, C Sepúlveda, M Roseblatt y U Vergara (Ed.). Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica. Editorial Universidad de Talca p. 701-705.
148. **Sparwasser T, E-S Koch, RM Vabulas, K Heeg, GB Lipford, JW Ellwart, H Wagner. 1998.** Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. Eur. J. Immunol. 28:2045-54.
149. **Sprong T, N Stikkelbroeck, P van der Ley, L Steeghs, L van Alphen, N Klein, MG Netea, JW van der Meer, M van Deuren. 2001.** Contributions of *Neisseria meningitidis* LPS and non-LPS to proinflammatory cytokine response. J Leukoc Biol. 70:283-8.
150. **Sprong T, P van der Ley, L Steeghs, WJ Taw, TJ Verver-Janssen, MG Netea, JW Meer, MV Deuren. 2002.** *Neisseria meningitidis* can induce pro-inflammatory cytokine production via pathways independent from CD14 and toll-like receptor 4. Eur Cytokine Netw. 13:411-7.
151. **Steeghs L, B Kuipers, HJ Hamstra, G Kersten, L van Alphen, P van der Ley. 1999.** Immunogenicity of outer membrane proteins in a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*: influence of adjuvants on the immune response. Infect. Immun. 67:4988-93.
152. **Steege PS, HM Johnson, JJ Oppenheim. 1982.** Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by an immune interferon-like lymphokine: inhibitory effect of endotoxin. J Immunol. 129(6):2402-6.

153. **Steinman RM. 1999.** Dendritic cells. In: Paul WE (Ed.). *Fundamental Immunology*. Lipincott-Raven, Philadelphia, PA, 4th edn. p. 547-73
154. **Steinman RM, J Swanson. 1995.** The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 182:283-8.
155. **Steven N, M Wood. 1995.** Clinical Spectrum of Meningococcal Disease. In: Cartwright K (Ed.). *Meningococcal disease*. John Wiley & Sons Ltd. p. 177-205.
156. **Svensson M, MJ Wick. 1999.** Classical MHC class I peptide presentation of a bacterial fusion protein by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29:180-8.
157. **Svensson M, C Johansson, MJ Wick. 2001.** *Salmonella typhimurium*-induced cytokine production and surface molecule expression by murine macrophages. *Microb Pathog.* 31:91-102.
158. **Takeda K, T Tanaka, W Shi, M Matsumoto, M Minami, S Kashiwamura, K Nakanishi, N Yoshida, T Kishimoto, S Akira. 1996.** Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380(6575):627-30.
159. **Takeda K, T Kaisho, S Akira. 2003.** Toll-Like Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-376.
160. **Takeuchi O, T Kawai, U Sanjo, NG Copeland, DJ Gilbert, NA Jenkins, K Takeda, S Akira. 1999.** TLR6: a novel member of an expanding Toll-like receptor family. *Gene* 231(1-2):59-65.
161. **Tappero JW, R Lagos, AM Ballesteros, B Plikaytis, D Williams, J Dykes, LL Gheesling, GM Carlone, EA Hoiby, J Holst, H Nokleby, E Rosenqvist, G Sierra, C Campa, F Sotolongo, J Vega, J Garcia, P Herrera, JT**

- Poolman, BA Perkins.** 1999. Immunogenicity of two serogroup B outer membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *JAMA* 281(16):1520-27.
162. **Tsai Ch-M, CE Frasc, LF Mocca.** 1981. Five structural classes of membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 146:69-78.
163. **Unanue ER** 1993. Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation. In: Paul WE (Ed.). *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, 3rd edn. p. 111-144.
164. **Uronen H, AJ Williams, G Dixson, SR Andersen, P Van der Ley, M Van Deuren, RE Callard, N Klein.** 2000. Gram-negative bacteria induce proinflammatory cytokine production by monocytes in the absence of lipopolysaccharide (LPS). *Clin Exp Immunol.* 122:312-5.
165. **van der Ley P, J van der Biezen, J Poolman.** 1995. Construction of *Neisseria meningitidis* strains carrying multiple chromosomal copies of the PorA gene for use in the production of a multivalent vesicle vaccine. *Vaccine* 13:401-7.
166. **van der Voort RE, P van der Ley, J van der Biezen, S George, O Tunnela, H van Dijken, B Kuipers, J Poolman.** 1996. Specificity of human bactericidal antibodies against PorA P.17,16 induced with a hexavalent meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Infect. Immun.* 64:2745-51.
167. **van Deuren M, P Brandtzaeg, J van der Meer.** 2000. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:144-66.

168. **Visintin A, A Mazzone, J Spitzer, DM Segal. 2001a.** Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharides sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12156-61.
169. **Visintin A, A Mazzone, J Spitzer, DH Wylie, SK Dower, DM Segal. 2001b.** Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 166(1):249-55.
170. **Werts C, RI Tapping, JC Mathison, TH Chuang, V Kravchenko, I Saint Girons, DA Haake, PJ Godowski, F Hayashi, A Ozinsky, DM Underhill, CJ Kirschning, H Wagner, A Aderem, PS Tobias, RJ Ulevitch. 2001.** Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* 2(4):346-52.
171. **Whelan M, MM Harnett, KM Houston, V Patel, W Harnett, KP Rigley. 2000.** A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J. Immunol.* 164:6453-60.
172. **Winzler C, P Rovere, M Rescigno, F Granucci, G Penna, L Adorini, VS Zimmermann, J Davoust, P Ricciardi-Castagnoli. 1997.** Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185:317-28.
173. **Wojciechowski W, J DeSanctis, E Skamene, D Radzioch. 1999.** Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin involves class II transactivator and depends on the *Nramp1* gene. *J Immunol.* 163(5):2688-96.

174. **Wolf PR, HL Ploegh. 1995.** How MHC class II molecules acquire peptide cargo: Biosynthesis and tracking through the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:267-306.
175. **Yokota A, A Oikawa, Ch Matsuda, N Shinohara, K Eshima. 2003.** Cell-Mediated Fas-Based Lysis of Dendritic Cells Which Are Apparently resistant to Anti-Fas Antibody. *Microbiol. Immunol.*, 47(4):285–93.
176. **Yrlid U, MJ Wick. 2000.** Salmonella-induced apoptosis of infected macrophages results in presentation of a bacteria-encoded antigen after uptake by bystander dendritic cells. *J Exp Med* 191(4):613-24.
177. **Yrlid U, M Svensson, C Johansson, MJ Wick. 2000.** Salmonella infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 27(4):313-20.
178. **Zarembek KA, PJ Godowski. 2002.** Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.* 168:554-61.
179. **Zhang D, G Zhang, MS Hayden, MB Greenblatt, C Bussey, RA Flavell, S Ghosh. 2004.** A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303:1522-6.
180. **Zhang G, S Ghosh. 2002.** Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.* 277:7059-65.

181. **Zollinger WD, RE Mandrell. 1980.** Type specific antigen of group A *Neisseria meningitidis*: Lipopolisaccharide and head modifiable outer membrane protein. Infect Immun. 28:451-58.

AUTOBIBLIOGRAFIA

Publicaciones que forman parte de la tesis:

1. T. Rodríguez, M. Lastre, B. Cedré, J. del Campo, G. Bracho, C. Zayas, C. Taboada, M. Díaz, G. Sierra, and O. Pérez. 2002. Standardization of *Neisseria meningitidis* Serogroup B Colorimetric Serum Bactericidal Assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 9(1):109-114.
2. Oliver Pérez, Gustavo Bracho, Miriam Lastre, Gustavo Sierra, Concepción Campa, Néstor Mora, Ramón Barberá, Judith del Campo, Tamara Rodríguez, Caridad Zayas, Danay Gil y Carlos Taboada. Método de obtención de estructuras cocleares. Composiciones vacunales y adyuvantes basados en estructuras cocleares y sus intermediarios. (Patente) **Solicitud Cubana OCPI 2002-0292 del 27/11/02.**
3. T. Rodríguez, M. Lastre, B. Cedré, E. M. Fajardo, J. del Campo, I. Delgado, G. Sierra, and O. Pérez. 2003. Validation of Colorimetric Assay to detect Complement-Mediated Antibody-Dependent Bactericidal Activity against serogroups B and C *Neisseria meningitidis*. **Biologicals** 31(3):209-212.
4. Oliver Pérez, Miriam Lastre, Tamara Rodríguez, Pietro Mastroeni, Gustavo Bracho, Judith del Campo. Proteoliposomas y sus derivados como adyuvantes inductores de respuesta citotóxica y las formulaciones resultantes. (Patente) **Solicitud Cubana OCPI. 2003-0312 del 30/12/03.**
5. T. Rodríguez, O. Pérez, S. Ugrinovic, G. Bracho and P. Mastroeni. 2004. Interactions of proteoliposomes from serogroup B *Neisseria meningitidis* with bone marrow-derived dendritic cells and macrophages: adjuvant effects and antigen delivery. **Vaccine. Aceptada.**

Premios relacionados con la tesis:

1. **Capacidad Adyuvante del Proteoliposoma de *Neisseria meningitidis* B y sus implicaciones. 2004.** Miriam Lastre; **Tamara Rodríguez**; Oliver Pérez y Alexis Labrada, Igord Bidot, Jorge Pérez, Gustavo Bracho, Judith del Campo, Dainerys Pérez, Eliza Facenda, Caridad Zayas, Domingo González, Claudio Rodríguez, Gustavo Sierra, Ramón Barberá y Concepción Campa. **Resultado Relevante en el Forum de Ciencia y Técnica del Instituto Finlay y en el Forum de Ciencia y Técnica Municipal.**
2. **Mecanismos que explican la capacidad adyuvante del Proteoliposoma derivado de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* B. 2004.** Tamara Rodríguez, Oliver Pérez, Gustavo Bracho, Judith del Campo, Miriam Lastre y Carlos Taboada. **Opta por el Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba.**

Trabajos relacionados con la tesis, presentados en eventos científicos:

1. **12th International Congress of Immunology. Montreal, Canada, July 2004.**
Adjuvant Effect and Antigen Delivery Ability of a Proteoliposome Derived from Outer Membrane of *Neisseria meningitidis* B.
2. **2nd International Workshop on Vaccine Adjuvants and Glycoconjugates. Varadero, Cuba, April 2004.** Bacterial derived Proteoliposome as ideal delivery system and cellular adjuvant.
3. **Modern Vaccines Adjuvants & Delivery Systems. Ireland, June 2003.**
Cochleates and its intermediate outer membrane vesicles as novel adjuvant for mucosal and parenteral routes.

4. **6^{to} Congreso ALAI y 3^{er} Congreso Sociedad Cubana de Inmunología. Habana, Cuba, Diciembre 2002.** Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in groups B and C *Neisseria meningitidis* colorimetric serum bactericidal assay and its validation.
5. **11th International Congress of Immunology. Sweden, July, 2001.** Antibody and cytokine pattern induced in humans by the anti-meningococcal vaccine.
6. **1st International Workshop on Vaccine Adjuvants. Habana, Cuba, December 2001.** Bactericidal activity against *N. meningitidis* B in relation to the Th1 response elicited by VA-MENGOC-BCTM.
7. **12th International Pathogenic *Neisseria* Conference. Galveston, Texas, USA, November 2000.** New *Neisseria meningitidis* serogroup B Colorimetric Serum Bactericidal Assay.
8. **5^{to} Congreso ALAI. Uruguay, 1999.** Colorimetric assay for detects bactericidal antibodies against *Neisseria meningitidis* B in human sera.

