



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

Centro de Investigación en Dinámica Celular

“Evaluación de las señales a través de TLR5 en la activación de células T CD4⁺ de neonatos y adultos humanos *in vitro* y en un modelo de vacunación neonatal por rotavirus *in vivo*”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. ROSARIO GUADALUPE LABASTIDA CONDE

TUTOR DE TESIS

DRA. Ma. ANGELICA SANTANA CALDERON

CUERNAVACA, MORELOS

2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DR. VÍCTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “Evaluación de las señales a través de TLR5 en la activación de células T CD4⁺ de neonatos y adultos humanos *in vitro* y en un modelo de vacunación neonatal por rotavirus *in vivo*” que presenta la alumna **Rosario Guadalupe Labastida Conde (5620120201)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Gladis del Carmen Fragoso González Biomédicas-UNAM	APROBADO	
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama FM-UAEM	APROBADO	
Dr. Baltazar Becerril Luján IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. Claudine Liliane Irlés Machuca Instituto Nacional de Perinatología	Aprobado	
Dra. Gabriela Rosas Salgado FM-UAEM	Aprobado	
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz FM-UAEM	Aprobado	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	APROBADO	

Jurado de Examen

Dra. Gladis del Carmen Fragoso González (Biomédicas-UNAM)

Presidente

Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama (FM-UAEM)

Secretario

Dr. Baltazar Becerril Luján (IBT-UNAM)

Vocal

Dra. Claudine Liliane Irlés Machuca (Instituto Nacional de Perinatología)

Vocal

Dra. Gabriela Rosas Salgado (FM-UAEM)

Vocal

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz (FM-UAEM)

Suplente

Dra. María Angélica Santana Calderón (CIDC-UAEM)

Suplente

Agradecimientos

Primero Quiero agradecer a la vida por darme esta gran oportunidad de crecimiento profesional, a las personas más importante en mi vida, mi esposo Berto y mi hija Sofia, Berto me ha acompañado en esta proyecto, me ha brindado todo su apoyo y me ha motivado a terminar mis metas, a pesar de los momentos difíciles que llegué a pasar, incluso me acompañó en los desvelos de estudio, en las revisiones de mis trabajos, y mucho más. Y mi princesa fue quien me inspiro a seguir luchando para derle un buen ejemplo. Gracias a mi padre por que a pesar de las circunstancias siempre a estado a mi lado. Los amo.

Agradezco inmensamente a mi tutora la doctora Ma. Angélica Santana Calderón (Manie) por creer en mi, por la confianza que deposito en mi para realizar este trabajo. Por haberme brindado su amistad y cariño. Por guiarme, enseñarme a como ser cada día mejor. Por ser la parte mas importante para mi desarrollo profesional. Usted es un ejemplo a seguir tanto en lo profesional como persona. Gracias por su amistad.

Agradezco al Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama por haberme permitido trabajar en su laboratorio, y apoyar este proyecto con su modelo de investigación.

Dra. D. Vanessa López Guerreo gracias por el apoyo, tiempo dedicado y enseñanzas brindadas.

Gracias a la Dra. África González Fernández, por recibirme en su laboratorio y apoyarnos con las nanopartículas de oro.

Gracias a la Dra. Gabriela Rosas Salgado por las valiosas aportaciones que realizó para mejorar el trabajo, por el tiempo dedicado. Por todos los consejos.

A los miembros del Jurado:

Dra. Gladis del Carmen Fragozo González

Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama

Dr. Baltazar Becerril Luján

Dra. Claudine Liliane Irlés Machuca

Dra. Gabriela Rosas Salgado

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

Dra. María Angélica Santana Calderón

Gracias por el interés y entusiasmo con el que revisaron la tesis, por las valiosas aportaciones y comentarios.

Al Biol. Oscar Ramírez Pliego y Dr. Oscar Daniel Badillo por la disposición y ayuda incondicional.

Gracias a mi mejor amiga y hermana del alma Dare por todo su apoyo y compañía en el laboratorio.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio con quienes disfrute pasar esta travesía.

A CONACyT, por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo. El Hospital General “Dr. José G. Parres” de Cuernavaca por aportar los concentrados leucocitarios y la sangre de cordón umbilical. A la Facultad de Ciencias y a la UAEM por brindarme los medios necesarios para mi desarrollo profesional.

<i>RESUMEN</i>	6
<i>ABREVIATURAS</i>	8
<i>1.- INTRODUCCIÓN</i>	10
1.1 SISTEMA INMUNE	10
1.2 INMUNIDAD INNATA	10
1.3 INMUNIDAD INNATA Y SUS RECEPTORES	11
1.3.1 TLRs	12
1.4 SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO	14
1.4.1 LINFOCITOS T COOPERADORES	15
1.4.2 LINAJES DE LOS LINFOCITOS T CD4	15
1.5- SISTEMA INMUNE NEONATAL	18
1.5.1- LINFOCITOS NEONATALES	20
1.5.2.-ANTICUERPOS Y LINFOCITOS B.	20
1.5.6.-LINFOCITOS T NEONATALES.	21
1.5.7- ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T NEONATALES.	23
1.6.-VACUNAS EN NEONATOS E INFANTES.	24
1.7.-AGENTE INFECCIOSO ROTAVIRUS.	25
1.8 NANOPARTÍCULAS COMO ADYUVANTES EN VACUNAS.	26
2.-ANTECEDENTES:	27
3.-JUSTIFICACIÓN:	28
4.-HIPÓTESIS:	30
5.- OBJETIVO:	31
5.1.- OBJETIVOS PARTICULARES:	31
6.- METODOLOGÍA	32
6.1 COLECTA DE LAS MUESTRAS	32
6.2 PURIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS	32
6.3 ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS	33
6.4 EVALUACIÓN DE LA PUREZA DE LINFOCITOS T CD4 Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS Y SUS RECEPTORES	33
6.5 MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MENSAJEROS DE LAS DISTINTAS CITOCINAS	34
6.6 TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE VP6	35
6.7 INMUNIZACIÓN Y RETO DE LOS RATONES	37
6.8 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ROTAVIRUS (VP6) EN SUERO	37
6.9 DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN HECES	38
6.10 DETECCIÓN DE IGA CONTRA ROTAVIRUS EN HECES	39
7.- RESULTADOS	40

A) PURIFICACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4 ⁺ DE NEONATOS Y ADULTOS	40
B) EVALUACIONES <i>IN VITRO</i>	41
C) EVALUACIÓN DE CITOCINAS INTRACELULARES FIRMA TH1, TH2, TREG EN RESPUESTA A FLAGELINA	46
E) ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	51
F) PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA VP6 49 KDA	51
G) ACOPLAMIENTO DE VP6 Y FLAGELINA A NANOPARTÍCULAS DE ORO.	54
H) EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS AL ESTIMULAR PBMCS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO ACOPLADAS A VP6 (AuNP-VP6) Y NANOPARTÍCULAS DE ORO ACOPLADAS A FLAGELINA (AuNP-FLAG).	56
I) EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS AL ESTIMULAR PBMCS Y CBMCS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO ACOPLADAS A VP6 (AuNP-VP6) Y NANOPARTÍCULAS DE ORO ACOPLADAS A FLAGELINA (AuNP-FLAG).	61
J) INMUNOGENICIDAD DE LA FLAGELINA MÁS LA PROTEÍNA VIRAL VP6, LIBRES O UNIDAS A LAS NANOPARTÍCULAS	64
8.- DISCUSIÓN	72
9.- CONCLUSIONES	74
10.- BIBLIOGRAFÍA	76
11.- ARTÍCULO PUBLICADO	81

Resumen

Los neonatos son muy susceptibles a infecciones por patógenos intracelulares. Esto se debe a que presentan una escasa producción de citocinas Th1 (IL-12, IFN- γ), responsables de la eliminación de células infectadas por patógenos intracelulares. La respuesta prevalente de los neonatos está sesgada hacia Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) o inmunidad de barrera. Cabe recordar que las respuestas Th1 y Th2 son antagonistas entre sí. Se considera que la respuesta eficiente de los linfocitos T neonatales puede lograrse, pero con un umbral de activación mucho más alto que el de las células de adulto.

La respuesta inmune depende del reconocimiento de un antígeno extraño y de señales de alarma inmunológica. Los linfocitos T CD4⁺ coordinan la respuesta inmune adaptativa y se activan por el contacto con las células dendríticas activadas, que les presentan el antígeno y señales co-estimuladoras. Estas últimas se expresan durante la activación de las células dendríticas, por la detección de moléculas firma de patógenos o de daño celular (PAMPs y DAMPs por sus siglas en inglés). Los linfocitos T también expresan algunos receptores de PAMPs, como los TLRs. En este trabajo evaluamos el papel de la flagelina, monómero del flagelo de las bacterias, en la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos y adultos *in vitro* y en un modelo de vacunación neonatal de rotavirus *in vivo*.

Encontramos que la flagelina indujo la expresión de IFN- γ , IL-1 β e IL-12 en células mononucleares de neonatos y adultos humanos. Cuando las células T CD4⁺ vírgenes humanas se activaron en presencia de flagelina, hubo un alto nivel de expresión de IFN- γ y su receptor, tanto en neonatos como en adultos. Además, la flagelina indujo una activación Th1 en células de memoria en adultos.

Para probar la capacidad adyuvante de la flagelina *in vivo*, utilizamos un modelo de vacunación neonatal murino para la infección con rotavirus, un patógeno responsable de la diarrea severa en los bebés. Hicimos la evaluación usando al antígeno VP6, que está conservado entre distintas cepas de rotavirus, y a la flagelina como adyuvante. Para favorecer la presentación del antígeno y una baja dosis de antígeno, utilizamos como plataforma de vacunas a las nanopartículas de oro (AuNPs) acopladas a VP6 (Proteína de la capa intermedia de rotavirus) y/o flagelina, ya que se ha demostrado que las AuNPs potencian la respuesta inmunológica y favorecen el direccionamiento del antígeno. También hicimos la evaluación con VP6 y flagelina libres.

Encontramos que VP6 y flagelina libres indujeron una protección del 80% contra la infección por rotavirus, pero solo en aquellos ratones previamente sensibilizados en el período neonatal. Al acoplar a la VP6 y la flagelina a nanopartículas de oro, se obtuvo una protección del 30% sobre los niveles de protección de la VP6 o la flagelina por separado, pero no sobre ambos estímulos juntos. Nuestros datos sugieren que la flagelina podría ser un adyuvante atractivo para lograr una respuesta Th1 en los neonatos y también pudiera evaluarse su capacidad para disminuir patologías debidas a un exceso de respuesta Th2, como el asma y las alergias.

Abreviaturas

APC: Célula presentadora de antígenos

AP-1: Factor transcripcional de la proteína activadora 1

Ca: Calcio

Cadena ζ : Proteína que forma parte del TCR

CD3: Proteína heterodimérica que forma parte del TCR

CD4: Molécula co-receptora que distingue a los linfocitos T cooperadores (Th)

CD8: Molécula co-receptora que distingue a los linfocitos T citotóxicos (Tc)

DAG: Diacilglicerol

DAMPS: Patrones moleculares asociados a daño

ERM: Proteínas de la familia Ezrin-Radixina-Moesina

FADD: proteínas con dominio asociado a muerte por Fas

GATA3: Factor transcripción gata3

G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos

GDP: Difosfato guanosina

GTP: Trifosfato guanosina

HSA: Albumina de suero humano

IFN- γ : Interferón gamma

IFN- γ R: Receptor de Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

ITAM: Secuencias peptídicas conservadas que contienen tirosinas fosforilables

IRAK: Cinasa asociada al receptor de la interleucina 1

IRF3: Factor regulador del Interferón

KDa: Kilo-daltones

LBP: Proteína soluble de unión al LPS

LPS: Lipopolisacáridos

LRR: Repeticiones ricas en leucina

MDA5: Gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NALP: Proteínas que contienen dominios NATCH, LRR y de pirina

NFAT: Factor nuclear de activación de linfocito T

NF- κ B: Factor nuclear κ B

NK: Natural killer, células asesinas naturales
Nm: Nanómetros
Nod: Dominio de oligomerización para la unión a nucleótidos
PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
RIG-I: Gen inducible para ácido retinoico
STAT: Factor de transcripción STAT
T-bet: Factor de transcripción
TCR: Receptor de los linfocitos T
TGF β : Factor de crecimiento transformante beta
Th1: células T helper 1
Th2: células T helper 2
TIR: dominio de homología al receptor Toll/IL-1
TLRs: Receptores tipo toll
TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF: Factor asociado al receptor de TNF
TRADD: Proteína con dominio de muerte asociado el factor de necrosis tumoral tipo 1
TRAM: Molécula adaptadora relacionada con TRIF
TRIF: Adaptador que contiene el dominio TIR inductor de Interferón

1.- Introducción

1.1 Sistema inmune

El sistema inmune se encarga de controlar la homeóstasis, protección contra patógenos y las respuesta contra daño tisular y estrés [1]. A la respuesta colectiva y coordinada del sistema inmune ante la introducción de una sustancia extraña se le conoce como respuesta inmunológica y al estado de protección contra agentes extraños se le conoce como inmunidad. El sistema inmune se ha dividido en dos tipos de inmunidad: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La Inmunidad innata o natural se refiere a las reacciones inmediatas ante la presencia de un antígeno extraño. Está constituida por barreras epiteliales, células y moléculas que de manera constitutiva mantienen un ambiente aséptico en los tejidos y erradican o controlan infecciones hasta que se desarrolla la respuesta inmune adaptativa [2]. En este sistema no existe la generación de memoria. Interacciona con el sistema inmune adaptativo a través de la presentación de antígenos por las células presentadoras de antígenos (CPAs), dando como resultado la eliminación de los patógenos por el sistema inmune adaptativo en conjunto con el sistema inmune innato, potenciado por el adaptativo. La Inmunidad adaptativa se compone de respuestas tardías del sistema inmune, que aumentan en magnitud y especificidad con cada exposición a un antígeno en particular. En consecuencia, la inmunidad adaptativa es específica para reconocer cada patógeno particular y responder más rápidamente ante un segundo reto inmunológico con el mismo patógeno. Se monta una respuesta adaptativa a los 5 o 6 días de la primera exposición al antígeno [3]. A continuación, se describen las características de ambos tipos de inmunidad.

1.2 Inmunidad innata

El sistema inmune innato representa la primera línea de defensa que impide la infección, ya que controla o elimina a muchos patógenos. También puede reconocer células hospederas agredidas o lesionadas, que expresan moléculas de estrés celular [4]. La inmunidad innata tiene tres principales funciones: *i*) prevenir o controlar la infección del organismo, presentando la primera respuesta inicial contra patógenos, *ii*) descifrar el tipo de antígenos y estimular las respuestas inmunitarias adaptativas contra los diferentes

patógenos y *iii*) servir como arma del sistema adaptativo, para la eliminación de los microbios ó células tumorales.

Las células que llevan a cabo la inmunidad innata son las siguientes:

Neutrófilos; son los leucocitos más abundantes en la sangre, de muy corta vida, que actúan entrando a los tejidos en caso de infección. Controlan la expansión de patógenos a través de fagocitosis, netosis y estallido respiratorio [5]. Macrófagos; en estado basal tienen funciones homeostáticas como limpieza de los tejidos, eliminación de células muertas y apoptóticas. También pueden iniciar la inflamación, tener una fuerte acción microbicida y activar a las células NK y linfocitos T efectores [6]. Pueden diferenciarse en células reguladoras y también en células reparadoras de daño tisular. NK; natural killer o asesinas naturales, son células no fagocíticas que matan a las células que han sido transformadas e infectadas por mecanismos de citotoxicidad [7]. Granulocitos; Pueden contener gránulos neutros (neutrófilos, antes mencionados), básicos (eosinofilos), ó ácidos (basófilos). Son células que eliminan parásitos y se encuentran asociadas a las alergias. También en esta categoría están las células cebadas, residentes en los tejidos [8]. Células dendríticas; relacionan al sistema inmune innato con el adaptativo y activan al sistema inmune adaptativo. Reconocen a los antígenos por receptores que se describen más adelante e identifican el tipo de patógenos para iniciar e activar la rama de la inmunidad adaptativa que se requiere [2]. Además, existen linfocitos que tienen funciones dentro del sistema inmune innato, reconociendo moléculas firma de patógenos o de daño celular y células linfoides innatas, que participan en la inmunidad secretando citocinas y factores de crecimiento.

1.3 Inmunidad innata y sus receptores

El sistema inmune innato reconoce señales de estrés de los tejidos por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs del Inglés Damage-Associated Molecular Pattern molecules) y estructuras compartidas por familias de microorganismos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés Pathogen-Associated Molecular Patterns). Los receptores de patrones moleculares están codificados por el DNA de la línea germinal y un mismo receptor puede reconocer a varias estructuras. Este conjunto de receptores llega a reconocer aproximadamente 10^3 estructuras distintas. Entre los receptores de la inmunidad innata más estudiados se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs), de manosa, de péptidos con N-formilmetionina, scavenger, Proteínas que

contienen dominios NATCH, LRR y de pirina (NALPs) y receptores que señalizan a través del dominio de reclutamiento de caspasas (CARD).

1.3.1 TLRs

Forman una familia integrada de 13 receptores conservados en humanos para el reconocimiento de patrones a lo largo de la evolución. Son glicoproteínas integrales de membrana del tipo 1, que contienen repeticiones ricas de leucina (LRR) en sus regiones extra membranales, en las cuales se unen los PAMPs o DAMPs. En la región intracelular tienen un dominio de señalización denominado toll/interleukin-1 receptor (TIR). Los TLR se organizan en dímeros en la membrana plasmática ó en la membrana endosomal, como homodímeros ó heterodímeros, lo cual aumenta el repertorio de especificidades que abarcan los TLR [9][10].

La sensibilidad de los TLRs a su ligando puede requerir de otras moléculas accesorias diferentes a los TLRs. Esto se conoce más en el caso del TLR4 y su ligando lipopolisacárido (LPS). El LPS se fija primero a la proteína soluble de unión al LPS (LBP) en la sangre o en líquido extracelular, y este complejo sirve para facilitar su enlace a la glicoproteína CD14, que está presente como proteína plasmática soluble y como proteína de membrana ligada a glucofosfatidilinositol. Una vez que el LPS se une a CD14, la LBP se disocia, y el complejo LPS-CD14 establece una vinculación física con el TLR4. Otra proteína extracelular llamada MD2 también se une al complejo con el CD14 estabilizando esta unión. Tanto el LPS como el CD14 y la proteína MD2 son importantes y necesarios para que sea eficiente la transmisión de señales por el TLR4. La señal es inducida por el LPS, pero aún no está claro si hace falta una interacción física directa del LPS con el TLR4 [1][10].

Una vez unido, el ligando induce la dimerización del TLR, lo que inicia la señalización a través de la unión de proteínas citoplasmáticas adaptadoras a la cola citoplasmática del TLR, vía interacciones homotípicas del dominio TIR presente en los TLRs y proteínas adaptadoras. Hay cuatro proteínas adaptadoras que sirven de enlace entre el dominio TIR y una cascada de señalización basada en fosforilación río abajo. Estas proteínas acopladoras son: MyD88, Mal/TIRAP, adaptador que contiene el dominio TIR inductor de Interferón (TRIF) y a la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM). En todos los casos, las proteínas adaptadoras son muy importantes para el ensamblaje de complejos señalizadores, los cuales inducen proteínas cinasas como la familia IRAK (cinasa asociada al receptor de IL-1) y TRAF (factor asociado al receptor de TNF). La

transducción de señales da como resultado la activación de los factores de transcripción NF- κ B, IRF3, IRF7 y AP1 [11][12].

La proteína acopladora MyD88 es esencial para la señalización de la mayoría de los TLRs, excepto el TLR3. En la figura 1 se muestra la ubicación de los TLRs ya que hay TLRs ubicados en el endosoma y en la membrana plasmática. Y en la figura 2 presento un diagrama de la activación a través de MyD88 de los TLRs.

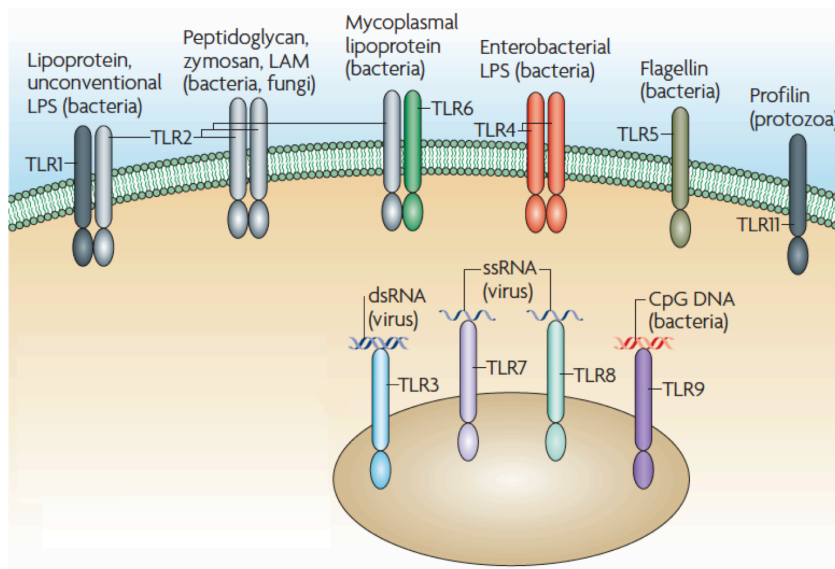


Figura 1: Localización de los TLRs. En esta figura se muestra la ubicación y el ligando de los TLRs. Los TLRs ubicados en la membrana celular son: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11, Los TLRs endosomales son TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9. [72].

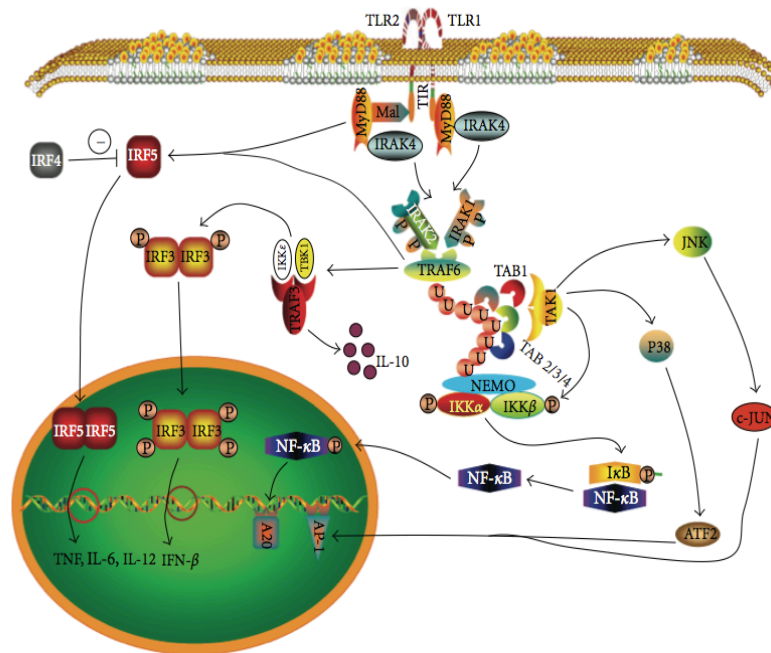


Figura 2: Señalización vía TLR. Los TLRs pueden estar localizados en la membrana plasmática o internamente en el endosoma. En esta figura se muestra la vía de señalización mediante TLR2/1 que están localizados en la membrana plasmática ejemplificando la vía de señalización de MyD88. La activación de los TLRs trae como consecuencia la producción de citocinas proinflamatorias [12].

1.4 Sistema inmune adaptativo

Está constituido por células y moléculas que se encuentran presentes en la sangre, en la linfa y en los órganos linfoides. El sistema inmune adaptativo está constituido principalmente por los linfocitos T y los linfocitos B. Los linfocitos reconocen de manera específica los antígenos extraños y responden contra ellos. Hay varios tipos de linfocitos, que difieren en sus funciones y sus productos proteicos. Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Los linfocitos T se subdividen en dos subpoblaciones fundamentales: los linfocitos T cooperadores (Th), que expresan una proteína de superficie llamada CD4 y coordinan la respuesta inmune mediante la secreción de citocinas y los linfocitos T citotóxicos (Tc), que expresan la proteína de superficie CD8 y tienen una actividad citotóxica sobre células infectadas [13]. También

existen otras poblaciones menores de linfocitos, como las células NKT y las células $\gamma\delta$ [14].

1.4.1 Linfocitos T cooperadores

La coordinación de la respuesta inmune se lleva a cabo por los linfocitos Th en respuesta a las señales proporcionadas por las células presentadoras de antígenos. Las células T se diferencian a partir de células vírgenes en distintos linajes de linfocitos Th. Los fenotipos efectores más reconocidos son las subpoblaciones Th1, Th2 y Th17. En los últimos años se habla de que los linfocitos Th pueden ser células muy plásticas capaces de adoptar fenotipos mixtos [15]. Además, aunque todavía está en discusión si se trata de linajes verdaderos o subtipos de las células efectoras Th2, también se describieron las células Th9 y Th21 [16]. Además, se describieron las células Thf, o foliculares, que participan en las reacciones del centro germinal de los nódulos linfáticos para la diferenciación adecuada de los linfocitos B [17]. Finalmente, existen diversos tipos de linfocitos T reguladores (T reg), cuya función es controlar la respuesta inmune. Los más estudiados son las células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. Las células Th1 y Th2 son antagónicas entre sí, es decir, que las citocinas que secretan las células Th1 inhiben el desarrollo de las Th2 y viceversa [15][18].

1.4.2 Linajes de los Linfocitos T CD4

El desarrollo de los diferentes linajes de linfocitos T efectores inicia con los mismos precursores, que son los linfocitos T $CD4^+$ vírgenes y el patrón de diferenciación está dado por los estímulos presentes durante la presentación de antígenos. Los principales estímulos inductores de la especialización y la diferenciación son las citocinas, de modo que el interferón gamma ($IFN-\gamma$) y la interleucina 12 (IL-12) son los principales inductores de los linfocitos Th1. La interleucina 4 (IL-4) de los linfocitos Th2 [19] y la interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1) y el factor de crecimiento tumoral ($TGF-\beta$) inducen la diferenciación de los linfocitos Th17 [20].

La respuesta Th1 es efectiva contra patógenos intracelulares. Consiste en la producción de citocinas proinflamatorias como la producción de $IFN-\gamma$ y culmina en la activación del estallido respiratorio y la capacidad microbicida de los macrófagos. También se potencia la activación de linfocitos citotóxicos y la secreción de anticuerpos tipo IgG3 que ayuda a la fijación del complemento y la opsonización para fagocitosis por macrófagos. Las

células que la coordinan son los linfocitos Th1 a través de la secreción de IFN- γ y LT [21][22]. La diferenciación a nivel molecular de los linfocitos Th1 se da por la interacción de señales procedentes del receptor de los linfocitos T, las citocinas IFN- γ e IL-12 así como también los factores de transcripción T-bet, STAT1 y STAT4. La expresión de T-bet en los linfocitos T CD4 vírgenes se induce cuando reconocen el antígeno y son expuestos a IL-12 e IFN- γ . Esta señal activa los factores de transcripción STAT1 y STAT4, que a su vez estimulan la expresión de T-bet. Posteriormente T-bet favorece la síntesis de IFN- γ y de este modo se establece una retroalimentación positiva [21].

Para algunos parásitos y microorganismos extracelulares se estimula una respuesta Th2, que induce la secreción de inmunoglobulina G1 (IgG1) e inmunoglobulina E (IgE). Esta última puede activar la secreción tanto en células cebadas como eosinófilos de gránulos que contienen sustancias tóxicas para estos organismos. Las células que coordinan esta respuesta, son principalmente los linfocitos Th2 a través de la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13 [1]. La diferenciación de estas células es inducida por la IL-4 y los factores de transcripción GATA-3 y STAT6. La IL-4 activa al factor transcripcional STAT6, y junto con las otras señales procedentes del TCR, inducen la expresión de GATA3. Este último, potencia la expresión de los genes de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. El factor transcripcional GATA-3 aumenta su propia expresión mediante un bucle de retroalimentación positiva [23].

Algunos hongos y bacterias extracelulares son eliminados a través de la respuesta Th17, que permite el reclutamiento de neutrófilos y su activación en el sitio de infección. En humanos, estos procesos pueden dar lugar posteriormente a una respuesta Th1. Las células que la coordinan son principalmente los linfocitos Th a través de la secreción de IL17A e IL-17F y G-CSF [24]. El factor de transcripción de los linfocitos Th17 es ROR γ T [25].

Por otra parte, existe una población de células T denominadas Treg las cuales pueden provenir del timo, en cuyo caso se llaman células reguladoras naturales. Cuando las Treg son inducidas durante la respuesta inmune para evitar una respuesta excesiva, se denominan células reguladoras inducidas. En ambos casos su factor transcripcional es FoxP3. Las células reguladoras controlan la respuesta inmune a través de la secreción de citocinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β) y/o de contacto celular.

Los linfocitos Th se dividen en distintos linajes como se mencionó anteriormente. Sin

embargo, no constituyen patrones terminales de diferenciación y pueden re-direccionar sus programas genéticos para adoptar fenotipos alternativos. Se sabe que pueden expresar citocinas o factores transcripcionales exclusivos de otros linajes [15]. Un ejemplo de la plasticidad en las células T efectoras está dado por el tipo de citocinas que producen ya que anteriormente se había propuesto que éstas son producidas preferencialmente por un subconjunto de células T efectoras. Anteriormente la IL-10 se le asociaba con el fenotipo Th2, sin embargo, en la actualidad se sabe que la IL-10 puede ser producida por las células tipo Th1, células Treg y otras células del sistema inmune innato. La IL-21 es la citocina firma de los linfocitos T foliculares, pero también puede ser secretada por las células Th1 y Th17 [26][27]. La secreción de la IL-17 por las células T efectoras se le atribuía al linaje Th17, dado que no era producida por ningún otro linaje. Ahora, se sabe que las células Th17 a menudo producen IFN- γ [20]. Otro ejemplo es la flexibilidad presentada en las células Treg las cuales pierden su factor transcripcional FoxP3 y adquieren la capacidad de producir citocinas proinflamatorias [20][28]. Un ejemplo más dramático de la flexibilidad de las células T efectoras es la forma en que las células Th2 se reprograman para expresar Tbet y producir IFN- γ [29]. En la Figura 3 se resumen los ejemplos anteriormente mencionados [15].

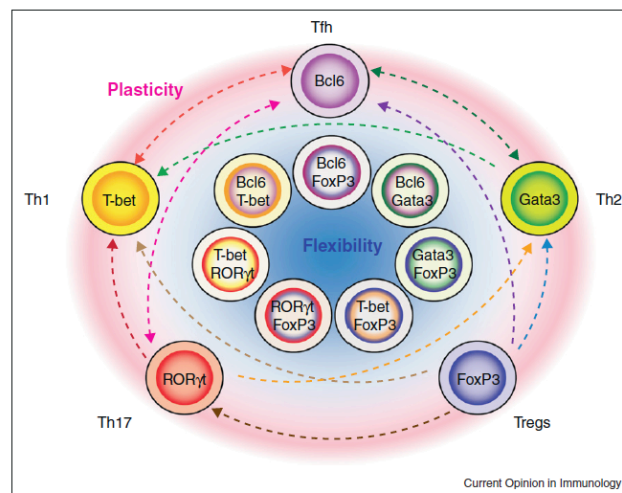


Figura 3: Plasticidad y flexibilidad de los linfocitos T CD4. Se muestra de manera resumida como los linfocitos efectoras, pueden ser reprogramados en los diferentes linajes [15].

1.5- Sistema inmune neonatal

Datos de la Organización Mundial de salud (OMS) en el 2015, señalan que hay alrededor de 2.7 millones de muertes al año en la etapa neonatal, que corresponden aproximadamente a un 45% de muertes en niños menores de 5 años. De éstos, aproximadamente entre el 25% y el 45% (aproximadamente 1 millón de muertes neonatales), ocurren en el día de su nacimiento, y cerca de 2 millones (75%), mueren en la primera semana de vida. Las principales causas de muertes de recién nacidos prematuros con un bajo peso al nacer son: asfixia e infecciones. Las enfermedades respiratorias o intestinales se ubican entre las más importantes, siendo atribuidas a la inmadurez del sistema inmune neonatal. Sin embargo, más que debido a la inmadurez, se sugiere que el sistema inmune neonatal funciona de manera diferente al sistema inmune de un adulto. Parte de estas diferencias se pueden explicar porque el sistema inmune neonatal debe adaptarse a la transición del nacimiento, que representa el paso de un ambiente estéril a un ambiente con una alta exposición a todo tipo de antígenos. El sistema inmune neonatal debe ser tolerante a esa transición para no entrar en un estado de “shock”. Además, el neonato porta la memoria inmunológica de su etapa fetal, en la que, para evitar el rechazo entre madre y feto, se establece un estado de tolerancia. En esta condición, los efectos de la respuesta Th2, abaten la respuesta Th1 la cual se encarga de la eliminación de patógenos intracelulares[30] [2]. Sin embargo, los neonatos son capaces de llevar a cabo respuestas inmunológicas eficientes bajo condiciones de una estimulación persistente [32].

La etapa neonatal se considera desde el nacimiento hasta los 28 días posteriores al mismo [33]. El sistema inmune neonatal aún no se tiene muy bien entendido. Se sabe que tanto las células de la inmunidad innata como los linfocitos tienen diferencias con respecto al adulto. Las células neonatales son capaces de una respuesta adecuada bajo condiciones altas de co-estimulación, pero en general tienen una fuerte tendencia a la tolerancia inmunológica. Los neonatos dependen en gran medida de péptidos antimicrobianos naturales y de los anticuerpos maternos para su protección.

Para proteger a los neonatos, se han generado una gran cantidad de vacunas que se administran en los primeros meses de vida. Es cierto que las vacunas han sido de enorme beneficio para la salud y supervivencia para los neonatos, sin embargo, también se ha reportado que la respuesta inmune de los neonatos a muchas de estas vacunas no es la

más adecuada [30]. Se desconoce en gran medida cual es el efecto a largo plazo de estas células de memoria no adecuada al patógeno. Se ha observado que la respuesta a vacunas e infecciones está sesgada en neonatos y bebés menores de 6 meses hacia una respuesta tipo Th2[34], que puede predisponer a alergias y asma. En este sentido, es claro que los eventos inmunológicos durante la infancia son determinantes en la respuesta del individuo para toda su vida.

A continuación se enlistan algunas particularidades de la respuesta inmune de las células neonatales:

1. Los linfocitos T de neonatos presentan una alta proliferación homeostática, en respuesta a las citocinas IL-7 e IL-15 y por las condiciones linfopénicas de la sangre del neonato[35].
2. Las citocinas pro-inflamatorias de los linfocitos pueden expresarse pero con un umbral de activación mucho más alto en comparación con el adulto.
3. Los genes de IL-12 e IFN- γ se encuentran silenciados por modificaciones epigenéticas. En lugar de producirse IL-12 (p40, p35), los neonatos producen preferentemente IL-23 (p40 y p19). Es posible activar la producción de IL-12, pero se requiere de un fuerte estímulo para lograrlo. Esta barrera se ha observado que se puede romper por infecciones con micobacterias[36].
4. La respuesta de las células presentadoras de antígenos a los TLR's (receptores tipo TOLL), es principalmente dada por la secreción de péptidos antimicrobianos y quimiocinas, en lugar de activar a los factores transcripcionales NF κ B, e IRF1 que llevan a la secreción de TNF- α y otras citocinas pro-inflamatorias[37]

Todo esto conlleva a que la respuesta de neonatos y lactantes ante las vacunas e infecciones sea diferente a la de los adultos. En particular, la respuesta Th1 es deficiente y como consecuencia la memoria Th1 es muy baja. Estudios recientes, se han enfocado en aumentar esta respuesta para generar una adecuada memoria Th1, dando como resultado una buena protección ante la presencia de algún patógeno intracelular.

Se han implementado dos principales modelos para estudiar la inmunidad de los neonatos. Uno es el modelo murino, que permite hacer evaluaciones *in vivo*. El otro, se refiere a la sangre de cordón umbilical de neonatos humanos, que permite evaluar la funcionalidad del sistema inmunológico *in vitro*.

En los neonatos existen alteraciones tanto en número como en la función de las células presentadoras de antígeno. Se han observado bajos porcentajes de células dendríticas mieloides en infantes menores de 12 meses, alcanzando niveles más parecidos a los de adulto hasta los 5 años de edad [38]. Se observa una disminución en infantes menores de 12 meses en la producción de citocinas en respuesta a antígenos presentes en las vacunas. Los neonatos tienen una predisposición a producir principalmente citocinas tipo Th2 posterior a la exposición de antígenos ambientales. Se ha observado una baja producción de IL-12, que no alcanza los niveles del adulto hasta los 12 años de edad [39]. Esta producción de IL-12 es aún menor en infantes que padecen alergias en comparación con infantes sanos. También hay una baja proporción de células dendríticas plasmocitoides en infantes con asma alérgico en comparación con infantes sanos [40]. Además de las características únicas de las células neonatales, la respuesta inmune del recién nacido está influenciada por el ambiente fisiológico durante el embarazo. Entre los elementos del ambiente fisiológico, están los factores placentarios tróficos que dirigen una respuesta tipo Th2, o los supresores Th1 (IL-4, IL-10 producidas por el trofoblasto), TGF- β , y prostaglandina E2, y progesterona) [30] y otros factores como ligandos solubles de TLR, así como la adenosina y la arginasa, producidas por las células eritroides las cuales inducen tolerancia [41]

1.5.1- Linfocitos Neonatales

1.5.2.-Anticuerpos y linfocitos B.

Los anticuerpos en suero provienen de diferentes tipos de células secretoras de anticuerpos. Un tipo de estas células son independientes de antígeno y producen anticuerpos poli-reactivos los cuales se unen con baja afinidad a diferentes antígenos que pueden provenir de bacterias como de otros patógenos y forman los “anticuerpos naturales”. Estos anticuerpos contribuyen a la inmunidad innata del neonato y pueden ser de isotipos IgM e IgG3. Las células productoras de los “anticuerpos naturales” son llamadas B1, y provienen normalmente de peritoneo y cavidades pleurales. Otro tipo de células (B2), secretoras de anticuerpos son dependientes de antígeno y se activan más

eficientemente por señales de los linfocitos T cooperadores. Se unen con una alta afinidad y son antígeno específico. Los isotipos producidos por las células B2 son principalmente IgG1 e IgG2, aunque pueden ser de todos los isotipos. Las células B2 provienen de la zona folicular del ganglio linfático y se desarrollan en la médula ósea. Durante la etapa fetal, la sangre materna hace contacto con el trofoblasto y transfiere aproximadamente un 5% de IgGs maternas al feto, aportándole una inmunidad adaptativa en la etapa gestacional. Posteriormente, cuando se administra una vacuna o posterior a una infección, las células secretoras de anticuerpos provenientes de los linfocitos B2 secretan anticuerpos con un máximo de secreción entre las semanas 1 y 2 posterior a la exposición, generándose un estado de memoria ante este antígeno. Cuando el sistema inmune se reencuentra con este antígeno, reacciona de manera más rápida y los anticuerpos neutralizantes pueden encontrarse en plasma durante mucho tiempo, incluso después de varias décadas. Estos anticuerpos del tipo específico que se encuentran en la sangre de la madre pueden pasar por el calostro y la leche materna y conferirle inmunidad adaptativa al neonato mientras éste es amamantado. Estos anticuerpos son del tipo IgA y la leche materna también contiene antitripsina que inhibe la degradación de estos anticuerpos por parte del aparato digestivo del neonato. Cuando bajan los niveles de los anticuerpos proporcionados por la madre en el destete, los anticuerpos producidos por las células secretoras de anticuerpos del bebé se elevan lentamente durante la infancia, alcanzando niveles equiparables a los del adulto a los 10 años de edad, y se mantienen estables durante toda la edad adulta [39].

1.5.6.-Linfocitos T neonatales.

A diferencia de la respuesta inmune mediada por anticuerpos, la madre no puede transferir linfocitos T al neonato y éste debe de protegerse de los patógenos intracelulares por sus propios medios. Existen muchas diferencias entre las células T de neonato y las del adulto. Las primeras tienen características de emigrantes recientes de timo, una población que se ha identificado como distinta a la de las células vírgenes [42]. Estos emigrantes recientes del timo se caracterizan por tener altas cantidades de círculos de escisión del receptor de células T ya que no han proliferado y esos remanentes de DNA se mantienen estables. También contienen algunos marcadores de superficie que comparten con los timocitos y presentan una alta susceptibilidad a apoptosis[43]. Los linfocitos con estas características se mantienen desde la etapa fetal hasta los 5 años de edad que empiezan a disminuir. Estas células presentan proliferación homeostática, que es independiente de estímulo del TCR

y se ha reportado como dependiente de IL-7 e IL-15 y, por lo tanto, expresan altos niveles del receptor para estas citocinas (CD127). Los linfocitos T CD4⁺ expresan bajos niveles del factor nuclear de células T activadas (NFAT) que está implicado en la activación de genes que codifican para CD154 (CD40L) e IFN- γ [44]. En el laboratorio encontramos que los linfocitos T CD8⁺ neonatales tienen un perfil transcripcional específico, sesgado hacia la inmunidad innata y con bajas funciones efectoras [45]. Los linfocitos T CD4⁺ neonatales también presentan un perfil transcripcional y epigenético distintivo, en el que hay una mayor expresión de moléculas de señalización negativas, como Cbl[46], que explicaría el alto umbral de activación de estas células.

Marcadores de superficie:

CD38: Los linfocitos T neonatales expresan altos niveles de esta molécula. Es una ectoenzima con funciones de NAD glucohidrolasa, ADO ribosil ciclase y ADP ciclo ribosa hidrolasa (ABBAS). Se desconoce la importancia funcional de estas actividades enzimáticas. Sin embargo, al ser expresada en la mayoría de los timocitos, nos muestra que esta población es una transición entre timocitos y células circulantes T “maduras” de adulto [47].

CD45: Se han encontrado varias isoformas de los linfocitos en los cuales se pueden detectar cambios en los patrones de glicosilación de esta molécula. La glicosilación varía en los diferentes estados del linfocito T dependiendo de si son vírgenes, activadas o de memoria. La mayoría de los timocitos expresan CD45RO (igual que los linfocitos de memoria), mientras que casi un 90% de los linfocitos T circulantes en el neonato expresan CD45RA al salir del timo. *In vitro*, los linfocitos T del neonato cambian de manera más rápida de isoforma de CD45RA a CD45RO, al ser activadas. En comparación con los linfocitos de adulto en los que los cambios son más graduales lo cual indica que sus mecanismos de glicosilación de proteínas en el retículo endoplasmático son diferentes [47]. La cantidad de receptor CD45 también se encuentra afectado; los linfocitos T neonatales expresan poblaciones con un bajo porcentaje de expresión de esta molécula en comparación con el adulto. Una posible consecuencia de estas diferencias en la cantidad y tipo de isoforma CD45 en las células sanguíneas neonatales, es la entrada y salida de la circulación de los linfocitos a través del intersticio de las células endoteliales. Entre otras, las señales de CD45 intervienen en la modificación del citoesqueleto de los linfocitos lo cual ayuda en su tránsito transepitelial.

Ligando de CD40 (CD154): es otra molécula que presenta diferencias entre las células del neonato y las del adulto. Esta molécula es una glicoproteína que está restringida sólo a linfocitos T CD4⁺ activados, aunque hay una baja expresión de este marcador en los linfocitos T CD8⁺, NK, monocitos, granulocitos, basófilos y linfocitos B. En los linfocitos T neonatales existe una baja expresión de esta molécula. Reen y colaboradores encontraron que en linfocitos T CD4⁺ neonatales, al aumentar la cantidad de PMA en la estimulación de estas células con anti-CD3, la expresión de CD154 era similar a sus niveles de expresión en el adulto. Estos resultados sugieren que la deficiencia en la activación de estos linfocitos T de recién nacidos es debida a bajos niveles en la vía de señalización dependiente de PKC [47][48].

CD31: Molécula de adhesión que es un marcador de diferenciación expresado en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes en adulto, y se va perdiendo conforme el linfocito T se reactiva. En las células de neonatos, existe una pequeña proporción de linfocitos T vírgenes que son CD31⁻. Esto se puede explicar porque estas células aun no adquieren el marcador, y que en la infancia temprana lo adquieren transformándose en linfocitos T vírgenes preparados para ser activados siendo la IL-4 un potente inductor de esta molécula en células de cordón umbilical [47].

Se ha demostrado que otros marcadores como CD2, CD3, CD4 y CD28, se expresan en niveles similares en las células T de neonatos y adultos [48][49].

1.5.7- Activación de Linfocitos T neonatales.

Los linfocitos T neonatales tienen algunas diferencias con los linfocitos T de adultos al ser activados *in vitro*. Producen poca IL-2, CD25, y tienen una pobre expansión clonal [49]. La respuesta inmune neonatal ante patógenos intracelulares es mediada por los linfocitos T. Esta respuesta es muy variable, por una parte, existe una gran susceptibilidad a infecciones neumocócicas fulminantes e infecciones meningocócicas. Sin embargo, se acepta que la respuesta inmune del neonato bajo condiciones apropiadas puede generar respuestas potentes ante los patógenos [50]. Las respuestas inmune más estudiadas en los neonatos e infantes, por su relación con la producción de nuevas vacunas son las siguientes: Virus de herpes en la que se observa una baja producción de IFN- γ , citomegalovirus generando una baja respuesta inmune, toxoplasma con una baja respuesta proliferativa, así como *Plasmodium falciparum* con una respuesta inmune

aparentemente normal [48]. Ante el Citomegalovirus humano se monta una respuesta citotóxica similar a la del adulto, con una expansión oligoclonal contra un restringido número de antígenos inmunodominantes así como una adecuada producción de IFN- γ y una actividad citolítica dependiente de perforina. En infecciones por VIH, la respuesta citotóxica es pobre y podría estar asociada a la falta de cooperatividad de los linfocitos T CD4⁺. Por otro lado, la concordancia del HLA de la madre infectada con el HLA del hijo incrementa el riesgo de la transmisión [51].

1.6.-Vacunas en neonatos e infantes.

Cuando las enfermedades no son endémicas del país, las vacunas son administradas a los dos meses de edad, en cambio cuando las enfermedades son endémicas las vacunas son administradas en los recién nacidos. La respuesta ante diversas vacunas es variable y en diversos estudios se han encontrado algunas diferencias con respecto al adulto[30].

- Vacuna de Hepatitis B. Una respuesta Th1 defectuosa con un incremento en la memoria Th2 y una elevada producción de anticuerpos. Adicionalmente, se detectan pocas células efectoras y de memoria.
- Vacuna oral de poliomielitis. Se observan respuestas deficientes tanto de Th1 como de anticuerpos.
- BCG. Una respuesta Th1 similar a la del adulto, un buen nivel anticuerpos y respuestas adecuadas tanto Th1 como Th2.
- Vacuna de células completas de pertussis. Buena respuesta Th1 en infantes de 2 meses.
- Vacuna Sarampión. Una respuesta baja Th1 en infantes de 6 a 12 meses.
- Vacuna de Citomegalovirus. Respuesta madura de células T CD8⁺ y deficiente en CD4⁺, en infantes.
- VIH. Respuesta deficiente de CD4⁺ y CD8⁺.
- *Tripanosoma cruzi*. Da una respuesta citotóxica similar al adulto.
- Virus de herpes simple. Respuesta retardada de IFN- γ

- *Bordetella pertussis*. Adecuada respuesta Th1

1.7.-Agente infeccioso rotavirus.

El Rotavirus es el principal agente etiológico de gastroenteritis virales severas, afectando más principalmente a niños menores de 5 años. El Rotavirus infecta y destruye a los enterocitos de las puntas de las vellosidades del intestino delgado, provocando una diarrea aguda que puede conducir a la muerte. Esta enfermedad es causante de aproximadamente 453 000 muertes y más de 2 millones de hospitalizaciones a nivel mundial en niños menores de 5 años [52].

Los Rotavirus pertenecen a la familia Reoviridae, presentan 3 capas concéntricas de proteínas, sin envoltura lipídica, con un genoma compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena (RNAdc). La capa externa del virión está formada por trímeros de la glicoproteína VP7. Sobre esta capa emergen 60 espículas de dímeros de la proteína VP4[53]. La capa intermedia está formada por trímeros de VP6. La capa interna la conforma la proteína VP2, que engloba al genoma viral. Asociados al genoma se encuentran VP1 que es la polimerasa viral y VP3 que es una guaninil-transferasa [54].

Los rotavirus tienen un tropismo celular muy particular, infectando solamente a las células de las puntas de las vellosidades intestinales (enterocitos)[55]. Es muy probable que la respuesta inmune intestinal contra rotavirus se inicie con la entrada de partículas virales (PV) a las placas de Peyer (PP) a través de las células M. En las PP las PV serían degradadas y presentadas a las células Th y Tc, por células presentadoras profesionales APC's; (principalmente células dendríticas). Una vez activadas, las células B y T migran de las PP hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, para posteriormente entrar a la circulación, a través del ducto torácico, vía por la cual se distribuyen a nivel sistémico. Estas células regresan al sitio efector de la respuesta inmune intestinal, la lámina propia intestinal. La presencia de receptores de direccionalidad ó "homing receptors", constituidos por heterodímeros de las integrinas $\alpha 4\beta 7$ y el receptor de quimiocinas CCR9 en la superficie de los linfocitos, les confiere especificidad hacia los tejidos linfoides asociados a la mucosa intestinal[56]. En la Lamina propia intestinal, las células B secretan IgAs que se vierten al lumen intestinal con la ayuda de las citocinas secretadas por las células Th, mientras que las células Tc migran a los intersticios entre las células epiteliales intestinales donde llevan a cabo su función efectora[54]. Las células B, a través de la

secreción de IgA, previenen y contribuyen a la contención de la infección. Las células Tc contribuyen a la limpieza de la infección y las células Th actúan como auxiliares a través de la producción de citocinas para lograr una óptima inducción de células B y Tc. Eventualmente, también contribuyen directamente como células efectoras a la limpieza de la infección[54]. Existen dos vacunas atenuadas Rotarix y RotaTeq. Sin embargo, su alto costo y su limitada protección contra diferentes serotipos virales hacen necesario continuar con la evaluación de nuevas alternativas de vacunas de tercera generación.

En la actualidad se está proponiendo como candidato de antígeno para vacuna a la proteína de VP6. VP6 es una de las proteínas estructurales de la capa intermedia de los rotavirus y está altamente conservada en los diferentes serotipos. Además, es una de las proteínas importantes involucradas en la replicación del virus. Al entrar el virus a la célula, las proteínas VP7 y VP4 son desensambladas[57].

1.8 Nanopartículas como adyuvantes en vacunas.

La nanotecnología es un área que ha crecido exponencialmente en los últimos años. Algunas herramientas de suma importancia para el desarrollo de este campo son la síntesis, la purificación y la caracterización funcional de las nanopartículas. Las nanopartículas son materiales que miden menos de 100 nm de diámetro[58]. En los últimos años se han realizado estudios sobre la biocompatibilidad de las nanopartículas de oro, plata y platino puestas en contacto con eritrocitos humanos. En estos trabajos concluyen que los materiales que presentan una mayor biocompatibilidad son las nanopartículas de oro, mientras que las más citotóxicas son las nanopartículas de plata, causando lisis, hemaglutinación, daño de la membrana celular, distorsión del citoesqueleto afectando por ello la forma de las células[59]. Las nanopartículas de oro, también llamadas oro coloidal, presentan características muy particulares que las hacen de gran interés para las aplicaciones biomédicas. Entre otras están su alta estabilidad química, la habilidad de conjugarse con una variedad de macromoléculas biológicas como péptidos, proteínas o DNA sin afectar la actividad biológica. [60]. Entre las aplicaciones de las nanopartículas, está su uso como una plataforma para presentación de vacunas, ya que se sabe que los antígenos presentados sobre una plataforma inerte son más inmunogénicos. Esto es particularmente relevante para las vacunas moleculares, ya sean péptidos o proteínas. Existen pocos reportes acerca de cómo las nanopartículas por sí solas pueden inducir una respuesta inmunológica mediante la producción de

anticuerpos y secreción de algunas citocinas [61]. Un reporte mostró que la forma y tamaño de las nanopartículas de oro influenciaba la respuesta inmune, ya sea por inflamosoma o por citotoxicidad [61].

2.-Antecedentes:

En el laboratorio encontramos que el TLR que más se transcribe en los linfocitos T, tanto de adulto como de neonato es el TLR5, siendo dicha transcripción alrededor de 10 veces más fuerte que la de otros TLRs. Estudios recientes en el laboratorio mostraron que la flagelina activa el módulo de NFκB [46]. Mi trabajo de maestría consintió en caracterizar la respuesta de los linfocitos T CD4+ vírgenes de neonatos y adultos humanos ante los estímulos del TCR, flagelina y las señales conjuntas. Demostramos que el TLR5 promueve la expresión de citocinas efectoras en los linfocitos T CD4+. De particular relevancia es que, en las células de neonatos, el TLR5 favorece el fenotipo Th1, que es muy difícil de lograr en los linfocitos neonatales (que tienen un sesgo hacia respuestas Th2).

La flagelina ya se ha utilizado como adyuvante en ratones adultos utilizando como modelos los virus de la influenza y de la vaccinia. En ratones, cuando éstos son inmunizados con flagelina y posteriormente son retados con el virus de influenza, se ha tenido una buena producción de anticuerpos contra el virus, logrando neutralizarlo. Asimismo, cuando los ratones son inmunizados con el antígeno más flagelina, y después retados con el virus vaccinia, se incrementa la producción de anticuerpos contra el virus de vaccinia [62]. A finales del 2014, Andrew T. Gewirtz et al reportaron que el tratamiento con flagelina previo y durante una infección crónica causada por rotavirus, evitó la infección. Se concluyó que la flagelina pudiera servir como tratamiento preventivo ante esta infección, observándose una dependencia de la producción de IL-22 por las células dendríticas[63]. Cabe resaltar, sin embargo, que las dosis de flagelina usadas en este estudio fueron altísimas. En neonatos utilizaron 10 µg de flagelina cada 2 días durante toda la infección y dos horas antes de ser infectados los ratones y en adulto se utilizaron 20 µg de la misma forma que el neonato.

Se considera que un buen adyuvante debe tener ciertas características como: mejorar la respuesta inmune ante los patógenos, bajar las dosis del antígeno, ser estable preferencialmente a temperatura ambiente así como ser fácilmente biodegradable[64].

En la actualidad se están proponiendo a las nanopartículas de oro como plataforma de vacunas, con el propósito de disminuir las dosis del antígeno y el adyuvante. Se han recubierto nanopartículas con péptidos, como por ejemplo la proteína del virus del Nilo occidental, demostrándose que la forma y tamaño de la nanopartícula determina el tipo de respuesta inmune. Las nanopartículas esféricas de 40 nm de diámetro fueron las que indujeron la mejor respuesta inmunológica. En esta condición se indujo una menor activación del inflamósoma, generando una alta producción de anticuerpos contra el virus y la producción de citocinas como TNF-a, IL-6, IL-12 y GM-CSF[61].

3.-Justificación:

La inmunidad de neonatos e infantes está muy pobremente estudiada [37]. La respuesta inmune neonatal tiene características únicas que reflejan la transición del nacimiento y la adaptación del infante a su medio ambiente. En la vida intrauterina, tanto la madre como el feto deben evitar el rechazo aloinmune, mientras que después del nacimiento, el neonato debe enfrentar inmediatamente dos posibles tipos de antígenos: los que constituyen parte de un medio ambiente no nocivo y patógenos potenciales [65]. La mortalidad por infección en niños menores de 6 meses alcanza 4 millones al año, por lo que es prioridad de la OMS bajar en al menos 50% esa cifra para el 2015.

Datos de la Organización Mundial de salud (OMS) en el 2015, señalan que hay alrededor de 2.7 millones de muertes al año en la etapa neonatal, que corresponden aproximadamente a un 45% de muertes en niños menores de 5 años. De éstos, aproximadamente entre el 25% y el 45% casi 1 millón de muertes neonatales ocurren en el día de su nacimiento, y cerca de 2 millones (75%), mueren en la primera semana de vida. Las principales causas de muertes de recién nacidos prematuros con bajo peso al nacer son asfixia e infecciones. Las enfermedades respiratorias e intestinales están entre las más importantes. Esto se le ha atribuido a la inmadurez del sistema inmune neonatal. Sin embargo, más que una inmadurez, el sistema inmune neonatal funciona de manera diferente al sistema inmune de adulto. Parte de estas diferencias se pueden explicar porque el sistema inmune neonatal debe adaptarse a la transición del nacimiento, que representa el paso de un ambiente estéril a un ambiente con una alta exposición a los antígenos. El sistema inmune neonatal debe ser tolerante a esa transición para no entrar en shock. Además, el neonato trae la memoria de su etapa fetal, en la que para evitar el rechazo entre madre y feto, se establece un estado de tolerancia inmunológica. Una alta actividad de la respuesta Th2, resulta en un

detrimento de la respuesta Th1, la cual se encarga de la eliminación de patógenos intracelulares[30] [2]. Sin embargo, los neonatos son capaces de llevar a cabo respuestas inmunes eficientes bajo condiciones persistentes de estimulación [32].

Las células neonatales son capaces de adoptar una respuesta robusta. Esto ha cambiado la visión de la inmunidad neonatal. De una respuesta inmadura a una respuesta muy particular. Son determinantes de esta respuesta el tipo de antígeno, la co-estimulación y la dosis antigénica [66]. Las vacunas son empleadas para generar una respuesta de memoria que ayude a reducir las infecciones peligrosas en neonatos e infantes. Representan el tratamiento más efectivo contra patógenos que antes causaban estragos en la humanidad. Sin embargo, el hecho de que los neonatos respondan con respuestas de memoria inadecuada ha generado la necesidad de encontrar adyuvantes moleculares que puedan ayudar a mejorar dicha respuesta. Entre los adyuvantes en prueba para vacunas, se encuentran los ligandos de los receptores tipo Toll [32]. Los TLRs son receptores típicos de la inmunidad innata; sin embargo, se ha reportado la expresión de TLRs en linfocitos B y T [67][68][69]. La función de los TLRs puede depender del estado de activación de la célula [70]. Los TLRs se han propuesto como una señal co-estimuladora eficiente en linfocitos T, ya que promueven la proliferación y diferenciación [67].

4.-Hipótesis:

La flagelina induce una respuesta inmune Th1 en células T CD4+ de neonatos y adultos humanos, que es protectora en un modelo *in vivo* de vacunación neonatal contra rotavirus.

5.- Objetivo:

Evaluar el efecto de la flagelina sobre la respuesta inmune *in vitro* (en células de neonatos y adultos) e *in vivo* (en modelos de vacunación neonatal en ratones).

5.1.- Objetivos Particulares:

1. Evaluar los niveles de IFN- γ , IL-4, IL-17, TGF- β e IL-10 en células T CD4+ vírgenes de neonatos y adultos humanos en respuesta al estímulo por el TCR, CD28 y/o flagelina.
2. Evaluar la expresión del receptor de IL-4 y de IFN- γ en células T CD4+ vírgenes de neonatos y adultos humanos en respuesta al estímulo por el TCR, CD28 y/o flagelina.
3. Evaluar por citometría de flujo multiparamétrica la respuesta de los distintos tipos de células de memoria a la estimulación por flagelina +/- el TCR. Usando marcadores de cada tipo celular (Th1, Th2, y de memoria), además de la tinción intracelular de IFN- γ IL-4, IL-17, TGF- β e IL-10.
4. Generar un nuevo prototipo de vacuna consistente en nanopartículas esféricas de oro de 40 nm acopladas VP6 ó a flagelina (AuNp-VP6) ó (AuNp-Flag).
5. Evaluar por citometría de flujo la respuesta de PBMCs y en CBMCs a la estimulación con AuNp-Flag +/- AuNp-VP6, mediante la tinción intracelular de IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-4 e IL-1 β .
6. Evaluar la protección a un reto con rotavirus EDIM por la inmunización con AuNp-VP6 + AuNp-Flag aplicada en ratones neonatos o adultos.

6.- Metodología

6.1 Colecta de las muestras

Se obtuvo sangre de cordón umbilical de neonatos durante los partos atendidos en el Hospital General de Cuernavaca (Dr. José G. Parres), con el consentimiento informado de las madres. Se cuenta con un permiso del comité de ética del Hospital General. Sólo se obtuvo la sangre de infantes sanos de partos naturales, de más de 38 semanas de gestación. También se obtuvo sangre de adulto a partir de concentrados leucocitarios donados por el banco de sangre del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea de Cuernavaca.

6.2 Purificación de las células

Las muestras de sangre neonatal se obtuvieron del cordón umbilical, después del nacimiento del neonato y antes de la expulsión de la placenta, para evitar la contaminación con sangre de la madre. La sangre se colectó en tubos estériles heparinizados y se procesó el mismo día. Las células T se obtuvieron mediante gradiente de ficoll Hypaque (Sigma Aldrich) que nos permite eliminar por gradiente de densidad a los eritrocitos, plaquetas y granulocitos. Se realiza una dilución 1:1 en relación Sangre y PBS 1X en tubo falcón de 50 ml estéril, en otro tubo falcón estéril agregar el ficoll, se utilizaron 10 ml de ficoll hypaque para un volumen mayor de 20 ml de sangre diluida. En seguida cuidadosamente sin romper las fases entre la sangre y el ficoll, se vertió la sangre diluida en el tubo falcón con el ficoll. Se centrifugó durante 30 minutos a 1600 rpm y 16 °C con desaceleración cero. Posteriormente de la centrifugación se tomó la interfase, guardando parte de los eritrocitos (2ml de eritrocitos se le agregan 3 ml de medio) en la incubadora, ya que en seguida se utilizan para la purificación de los linfocitos T CD4⁺, mediante una selección negativa con el kit RosseteSep (StemCell Technologies). Se lavaron las células obtenidas en la interface con PBS 1X, centrifugando a 1600 rpm por 10 minutos a 16 °C con desaceleración nueve y se decantó el sobrenadante. Mediante un procedimiento de adherencia a plástico se eliminaron los monocitos. Los linfocitos T CD4⁺ fueron purificados mediante esferas magnéticas unidas a un anticuerpo anti-CD4 o con el Kit Rosette Step. Linfocitos T CD4⁺ vírgenes se obtuvieron mediante una selección negativa, eliminando las células de memoria, con anticuerpos monoclonales de origen ratón acoplados a perlas magnéticas con proteína A/G, las proteínas se lavaron con un buffer cell isolation (PBS+2% SFB, 3mM EDTA) y se acoplaron a los anticuerpos

durante toda la noche con anti-CD45RO humano 3µg/ml, anti-CD44 humano 3µg/ml y anti-CD16 humano 2µg/ml. una vez obtenidas las células T CD4⁺ vírgenes, se realizó rutinariamente la tinción para evaluar la pureza de las preparaciones en todos los experimentos.

6.3 Estimulación de las células

Se realizaron los estímulos con anticuerpos monoclonales a una concentración de 1µg/ml, para activar a través del TCR se utilizó un anticuerpo de origen ratón anti-CD3 humano (Biolegend clona: UCHT1), entrecruzado con un segundo anticuerpo anti-mouse IgG (Biolegend clona: Poly4053), para realizar el estímulo CD3/CD28 se utilizaron las Dynabeads Human activator CD3/CD28 (Life Technologies) a una concentración de 12 células por perla. La estimulación de TLR5 se realizó con flagelina (FLA-ST ultrapure, InvivoGen) a una concentración de 50 ng/ml, por un periodo de 6 hrs para la evaluación de la transcripción, y por un periodo de 18hrs, 6 hrs antes de concluir el periodo de 18 hrs se le agrego brefeldina 1µg/ml (Biolegend). Para la medición de la expresión de las citocinas intracelulares firmas de Th1, Th2, Th17 y Treg y sus receptores. La proliferación se evaluo en periodo de 5 días. Para el cultivo celular se utilizó el medio RPMI, suplementado con suero fetal bovino 5%, L-glutamina y penicilina-estreptomicina.

6.4 Evaluación de la pureza de linfocitos T CD4 y análisis de la producción de citocinas y sus receptores

Se realizaron tinciones con anticuerpos directamente acoplados a fluoróforos o empleando un segundo anticuerpo acoplado a fluoróforo. Para las mediciones de fluorescencia se utilizó el citómetro FACScalibur (BD Bioscience), mientras que el análisis de los resultados se realizó con el programa FlowJo 8.7. La pureza de las preparaciones celulares, se evaluó utilizando los anticuerpos de PE anti-human CD3 (clona: HIT3a Biolegend) y el anticuerpo APC anti-human CD4 (clona: OKT4 Biolegend). La evaluación de citocinas se realizó con los siguientes anticuerpos: PE anti-human IL-4 (cat. 554551 BD Pharmingen), FITC anti-human IFN-γ (cat. 554551 BD Pharmingen), PE anti-human IL-10 (cat. 559330 BD Pharmingen), FITC anti-human IL17A (clona: eBio64DEC17 eBioscience), PE anti-human IL-13 (cat. 559328 BD Pharmingen), Biotinylated anti-human TGF-β1 (cat 555053 BD Pharmingen) y Streptavidin FITC (cat. 554060 BD Pharmingen). La evaluación de los receptores se

realizó con los siguientes anticuerpos: FITC anti-human IL-4 receptor α (cat. FAB200F R&D Systems), PE anti-human IFN- γ receptor α chain (CD119) (cat. 558934 BD Pharmingen). La concentración de células que se utilizó para la tinción fue de 1×10^6 células. Antes de la tinción las células se lavaron con FACS-JUICE 2% (PBS 1X 1% suero fetal de ternera) se centrifugó a 3500 rpm (1000 rcf) por 5 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante dejando 50 μ l de solución. La concentración del anticuerpo varió dependiendo a las indicaciones del fabricante. Se incubaron las células con el anticuerpo durante 30 minutos en hielo y en oscuridad, se lavaron las células con 1 ml de FACS JUICE, se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos, se quitó sobrenadante y se agregaron 150 μ l de paraformaldehído al 2% en PBS, y 100 μ l de FACS JUICE cubriendo de la luz. Sin embargo, la tinción de las citocinas intracelulares se necesitó permeabilizar la membrana, la permeabilización se realizó con Saponina a una concentración de 0.05% disuelta en FACS Juice (solo se preparó el volumen exacto ya que no se guarda la saponina restante). Para este tipo de tinciones las células deben ser fijadas previamente con paraformaldehído al 2% durante 10 minutos. Se agregaron 500 μ l de Saponina y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente (No se recomiendan periodos largos de perforación ya que la saponina da una fluorescencia basal en los filtros FL1 y FL2 y puede traslaparse con la señal del anticuerpo) una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron las células, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en seco, se agregó el anticuerpo primario acoplado a fluoróforo a la concentración adecuada (diluido en saponina) e incubó durante 25 minutos en hielo. Se lavó con 1 ml de saponina, se pipeteó 3 veces y se centrifugaron las células (3500rpm/5min). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en seco, esto se realizó dos 2 veces. Se dieron dos últimos lavados con 1 ml FACS Juice y por último se fijó con paraformaldehído 1%.

6.5 Medición de la expresión de mensajeros de las distintas citocinas

El RNA se extrajo mediante Trizol (Invitogen), utilizando aproximadamente 10 millones de linfocitos T CD4+ de adultos y 2.5 millones de linfocitos T CD4+ neonatales. Para la extracción de RNA se utilizó 1 ml de trizol agitando en vortex durante 5 minutos, posteriormente se agregaron 200 μ l de cloroformo agitando en vortex durante 1 minuto, en seguida se centrifugó a 12 000 Gs (11 500 rpm) por 15 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo de 1.5 ml, al cual se le agregaron 500 μ l de

isopropanol, mezclando por inversión. Una vez mezclado, se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente (T.A.) se centrifugó a 12 000 Gs por 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se dejó secar. A continuación, se les agregó 1 ml de etanol al 75 %, se centrifugó con las condiciones anteriormente mencionadas se retiró el sobrenadante y se dejaron secar las muestras de RNA antes de agregar 30 µl de agua DPC. Se evaluaron las concentraciones y que el RNA no estuviera degradado. Posteriormente, a la obtención de mRNA se realizó una reacción de transcriptasa reversa (RT) con una con el kit de fermentas RevertAid™ H Minus First Strand cDNA synthesis KIT (Thermoscientific), para poder obtener cDNA y poder realizar el PCR cuantitativo. Se evaluó la expresión del mRNA de las citocinas firma Th1 (IFN- γ , Th2 (IL-4), Th17 (IL-17A), Treg (IL-10 y TGF- β) y G3PDH, como control. Utilizando la técnica de PCR en tiempo real, con el sistema PDAR de sondas TaqMan. Se utilizó el equipo StepOne™ Real-Time PCR de 48 pozos. Para el calculo de las cantidades discretas mediante la ecuación de las curvas estándar se utilizó cDNA diluido 1:5. El sistema TaqMan Gene Expression Assays se utilizó para la evaluación de los genes: human IFNgamma (Applied Biosystems), Human IL4 (Applied Biosystems), Human TGFbeta (Applied Biosystems), Human IL10 (Applied Biosystems). Las sondas fueron utilizadas bajo las condiciones del proveedor. La transcripción de la IL17A fue evaluada mediante un primer donde se utilizó la base de datos de NCBI y con primer designing tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) se obtuvieron los siguientes primers, FWD AACCGATCCACCTCACCTTg y RVS TCTCTTgCTggATggggACA con una Tm de 60 °, los primers no dimerizan entre si y no tienen estructuras secundarias (SIGMA). Como control interno se utilizó el gen de la enzima gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de humano (Applied Biosystems).

6.6 Traducción *in vitro* de VP6

Para producir cantidades suficientes de VP6 utilizamos el sistema *Rapid Translation System* de Roche (RTS). Este sistema libre de células usa la RNA polimerasa del bacteriófago T7 para la transcripción y una maquinaria enriquecida de extracto de *E. coli* S30 para la traducción. Así, la producción de proteínas en RTS requiere un paso de clonación previo del gen de interés dentro de un vector con el promotor T7. Por esta razón la familia de plásmidos de expresión pIVEX ha sido optimizado para el uso *in vitro*. Estos vectores son muy convenientes ya que cuentan con múltiples sitios de clonación y

codifican para colas de 6 histidinas en N o C terminal, lo que le permite tener un sistema de purificación por afinidad de las proteínas traducidas. Se utilizó este sistema para producir VP6, siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, se mezcló un lisado *E. coli* diluido en 0.525 ml de buffer de reconstitución, al cual se le adicionó la mezcla de reacción 0.225 ml, la mezcla de aminoácidos 0.27 ml, 30 µl de metionina y 15 µg de plásmido (pIVEX2.4/VP6ew). Por otro lado, se preparó una solución de alimentación colocando 2.65 ml de aminoácidos, 0.3 ml de metionina, en 8.1 ml de buffer de reconstitución. Se llenaron los dos compartimentos correspondientes del kit: el grande con la solución de alimentación y el pequeño con la solución de reacción sin dejar burbujas, se mezcló cuidadosamente y se incubó por 24 horas a 26°C con agitación a 900 rpm y en un Proteo Master RTS de Roche. Al final de la reacción se generaron alícuotas de 250 µl con 10 mM de etilenglicol tetra acético (EGTA) y se almacenaron a -80 °C.

Para la purificación de la proteína VP6ew. Se tomó una alícuota de 250 µl de la traducción *in vitro* de VP6ew y se diluyó en 10 ml del buffer de dilución (fosfato de sodio 20 mM, Urea 8 M, 10 mM 2- ME pH 7.8, SDS 0.2% y azida de sodio 0.02%). Se colocó la resina 50% Ni-NTA de QIAgen hasta llegar a un volumen de 2.0 ml. La resina se equilibró 3 veces incubándola con 30 ml del buffer de lavado (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 50 mM, Urea 8 M, 10 mM 2-ME, SDS 0.2%, pH 7.8) por 10 minutos en un tubo Falcon de 50 ml. Se centrifugó 1 minuto a 2000 rpm para bajar la resina y decantar el sobrenadante. La proteína resuspendida se puso en contacto con la resina y se incubó toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente, se cargó la resina con la proteína en una columna y se dejó asentar por 10 minutos. Se obtuvo el sobrenadante y se mantuvo en hielo. La resina se lavó 2 veces con 20 ml de buffer de lavado, se colectó cada lavado en fracciones de 0.5 ml y se colocaron en hielo. La proteína se eluyó con 10 ml del buffer de elución (NaCl 500 mM, fosfato de sodio 20 mM, SDS 0.2% pH 3.0) colectando 40 fracciones de 0.25 ml adicionándole 2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Por último, se colectó 1 ml de buffer para almacenar (fosfato de sodio 20 mM, azida de sodio 0.02%, pH 7.8) que se dejó pasar por la columna. Se colocó 1 ml de buffer para almacenar en la columna y se dejó a 4°C hasta su uso. Para comprobar si la traducción *in vitro* de la Proteína VP6ew fue correctamente producida por el método RTS se realizó un western blot. La concentración de la proteína se evaluó por múltiples métodos.

6.7 Inmunización y reto de los ratones

La inmunización de los ratones se realizó en el Laboratorio de Inmunología Viral en colaboración con los doctores: Dr. R. Fernando Esquivel Guadarrama y la Dra D. Vanessa López Guerrero. Se trabajó con ratones hembras BALB/cJ que se mantuvieron en un ambiente estéril en cajas con filtro y en un aislador NUAIRE que se encuentra en un cuarto para trabajo de patógenos acondicionado en la Facultad de Medicina de la UAEM. Todo el trabajo se llevó a cabo bajo las normas estipuladas por el comité de ética. Los ratones se sacrificaron por exposición a CO₂.

Los ratones fueron inmunizados con dosis de VP6 en presencia o ausencia de flagelina. Utilizamos las proteínas libres o unidas a nanopartículas, que se mandaron hacer en la empresa nanoimmunotech.

Los ratones neonatos se utilizaron al día 7 de nacidos. Se realizaron 7 grupos: grupo 1: PBS, grupo 2: AuNP-flag, grupo 3: AuNp-VP6 grupo 4: AuNp-Flag + AuNp-VP6, grupo 5: Flagelina, grupo 6: VP6 y grupo 7: Flagelina + VP6. Tanto en ratones adultos como ratones neonatos se realizaron dos inmunizaciones con las siguientes concentraciones: Ratones neonatos (7 días de edad) se les administró la primera inmunización con AuNP-VP6 a una concentración de 0.5 µg/ml y la AuNp-Flag a una concentración de .250 µg/ml. La concentración de Flagelina fue de .250 µg/ml y de VP6 .5 µg/ml. Posterior a 21 días de la primera inmunización (28 días de edad) se les administró la segunda inmunización utilizando las mismas concentraciones de proteína. A los ratones Adultos (28 días de edad) se les administró la primera inmunización con AuNP-VP6 a una concentración de 1 µg/ml y la AuNp-Flag a una concentración de .500 µg/ml. La concentración de Flagelina fue de .500 µg/ml y de VP6 1.0 µg/ml. 21 días después de la primera inmunización. Tanto las dos inmunizaciones como el reto fueron espaciados por un periodo de 21 días. Los ratones fueron retados oralmente con 1×10^4 unidades formadoras de focos (UFF) del rotavirus murino EDIM_{wt}. Para determinar la replicación viral se colectarán muestras de heces del día 0 (previo al reto) y cada 24 hrs hasta el día 8.

6.8 Detección de Anticuerpos contra rotavirus (VP6) en suero

Para la detección de anticuerpos contra rotavirus. Se colectarán muestras de sangre de los ratones. En el caso de los ratones neonatos solo se obtuvieron muestras de sangre en dos tiempos; previo a la segunda inmunización y previo al reto por el virus. En cambio, en

ratones adultos se obtuvieron las muestras de ratones en tres tiempos diferentes; previo a la primera inmunización, antes de la segunda inmunización y antes del reto. Las muestras de sangre de cada ratón se dejaron coagular en hielo por 2 hrs, se centrifugaron a 2000 rpm por 4 min a 4 °C en una microcentrifuga, se colectó el suero y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Placas de 96 pozos de fondo redondo (Costar Alta Adherencia) fueron cargadas con 50 µl de PBS con un anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra a una dilución de 1:2500, anticuerpo de captura que reconoce varias cepas de rotavirus. Se dejó en incubación toda la noche a 4 °C. Posterior a la incubación se lavaron las placas dos veces con la solución de lavado (PBS/Tween 0.05%) y se utilizó la solución de bloqueo (PBS/Tween 0.05 más 5 % de leche descremada en polvo) para bloquear las placas durante 2 hrs. a temperatura ambiente (TA). Se lavó dos veces con la solución de lavado (PBS/Tween 0.05%), y se agregaron 50 µl de un lisado de células (MA-104) infectadas con rotavirus RRV. Se incubó por 2 hrs a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces y se adicionaron 50 µl por duplicado de los sueros de ratón diluidos 1:50 en solución de bloqueo y se incubó 1 hr a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces con la solución de lavado y se adicionaron 50 µl de solución de bloqueo con un anticuerpo policlonal de cabra anti-Ig's de ratón acoplado a peroxidasa (Dako) a una dilución 1:1000 y se incubó 1 hr a 37 °C. La placa se lavó 4 veces y se adicionó de 50 µl de sustrato (orto-Fenilendiamina: Sigma) a una concentración de 2 mg en 5 ml de buffer amortiguador (Ácido cítrico 51.4 mM y fosfato de sodio 24.3 mM, 10 µl de H₂O₂). La reacción se llevó a cabo por 10-20 min a temperatura ambiente y se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico 2M. Como control positivo se usó suero de ratón inmunizado contra rotavirus YM y como control negativo se utilizó el PBS. La absorbancia se leyó a 492 nm en lector de placas (Bio-Tek instruments inc.).

6.9 Detección de rotavirus en heces

Las heces fueron descongeladas y resuspendidas en un buffer disolvente (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 5% de suero fetal bovino, 0.05% tween-20 y 10 mM de azida de sodio) al 5% (peso volumen). Se almacenaron toda la noche a 4 °C y posteriormente las muestras fueron agitadas en vórtex y centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos. En el sobrenadante se evaluó la carga viral mediante la técnica de ELISA. Placas de 96 pozos de fondo redondo fueron cargadas con 50 µl de un anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra a una dilución de 1:2500 en buffer TNC (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂).

Se dejó incubar toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron 2 veces con un buffer de lavado (TNC/tween 0.05%) y se bloquearon con 150 µl de solución de bloqueo (TNC/5% de leche descremada (Carnation)/tween 0.05%) por dos horas a temperatura ambiente. Posterior al bloqueo las placas se lavaron dos veces. Se agregaron por duplicado 50 µl del sobrenadante de las heces y se incubó 2 hrs a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces con 300 µl de solución de lavado. se le agregaron 50 µl de la solución de lavado con una dilución de 1:2000 de un anticuerpo policlonal hiperinmune de conejo anti-rotavirus RRV. Se dejó incubar por 1 hr a 37 °C. En seguida se lavó 4 veces con 300 µl, y se agregaron 50 µl de anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (zymed) y se incubó por 1 hr a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces con 300 µl de solución de lavado, y se agregaron 50 µl de sustrato (p-nitrofenil fosfato disodio. Sigma) diluido 1:100 en DAE (0.1% Dietanolamina, 1 mM MgCl, 0.029% Azida de sodio). Durante 30 minutos a 1 hr a 37 °C se llevó a cabo la reacción y la absorbancia se midió a 405 nm en lector de placas (Bio-Tek instruments inc.).

6.10 Detección de IgA contra rotavirus en heces

Placas de 96 pozos de fondo redondo fueron cargadas con 50 µl de un anticuerpo policlonal hiperinmune de cabra a una dilución de 1:2500 en buffer TNC (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂). Se dejó incubar toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron 2 veces con un buffer de lavado (TNC/tween 0.05%) y se bloquearon con 150 µl de solución de bloqueo (TNC/5% de leche descremada (Carnation)/tween 0.05%) por dos horas a temperatura ambiente). Se lavó dos veces con la solución de lavado, y se agregaron 50 µl de un lisado de células (MA-104) infectadas con rotavirus RRV. Se incubó por 2 hrs a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces y se adicionaron 50 µl por duplicado de los sueros de ratón, diluidos 1:50 en solución de bloqueo y se incubó 1 hr a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces con la solución de lavado y se agregó por duplicado 50 µl del sobrenadante de las heces y se incubó 2 hrs a 37 °C. A continuación, las placas se lavaron 4 veces con 300 µl de solución de lavado. se agregaron 50 µl de una dilución de 1:1500 de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgA de ratón acoplado a la peroxidasa. Se lavaron las placas 4 veces con 300 µl de solución de lavado. y se reveló como anteriormente esta descrito.

7.- Resultados

a) Purificación de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos y adultos

Los linfocitos T CD4⁺ se purificaron a partir de sangre periférica de donadores sanos mientras que los de neonato se purificaron a partir de la sangre de cordón umbilical. Para verificar la pureza se realizaron tinciones para CD3 y CD4, usando anticuerpos monoclonales anti-CD3-PE y anti-CD4-APC.

Se obtuvo un rango de pureza de 93% a 96%, para los experimentos subsecuentes solo se utilizaron las muestras que tienen una pureza arriba del 90%. En la figura 1 se muestran dos graficas representativas.

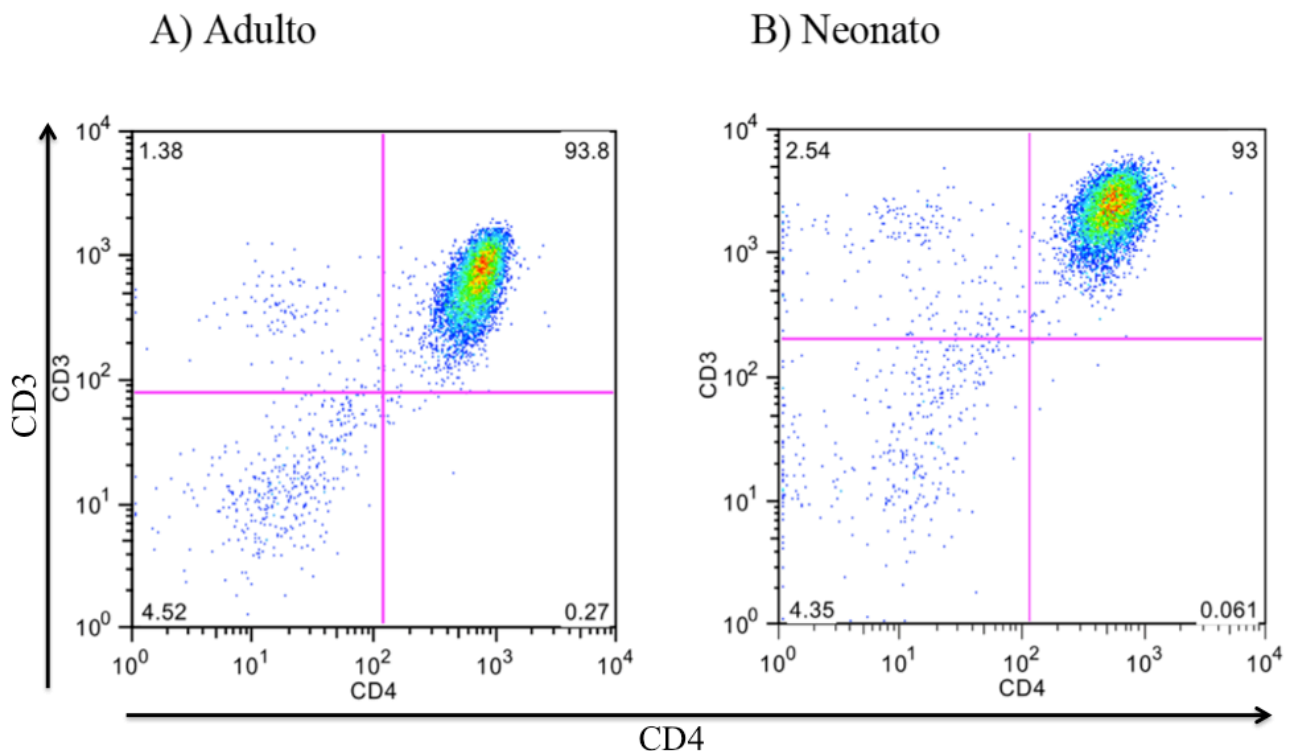


Figura 1 Perfiles citofluorométricos de linfocitos T CD4⁺ purificados. Mediante la técnica de citometría de flujo se evaluó la pureza de cada una de las muestras obtenidas logrando obtener una pureza de un 93 a un 96%. En el panel A se muestra la pureza representativa de los linfocitos T CD4⁺ de adultos, en el panel B se presenta la pureza representativa de los linfocitos T CD4⁺ de neonatos. En el eje X se muestra el porcentaje de células que muestra la molécula de CD4 en el eje Y se muestra el porcentaje de células que expresan la molécula de CD3. El índice de pureza se obtiene de las células que expresan ambas moléculas tanto CD3 como CD4

b) Evaluaciones *in vitro*

Evaluación de la expresión de citocinas en linfocitos T CD4⁺ vírgenes.

Durante mi trabajo de Maestría, evaluamos el efecto de la flagelina sobre la estimulación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos a través de las señales del TCR y CD28. Sin embargo, la n que logré evaluar fue de sólo 3 repeticiones. Para hacer una mejor evaluación, llevamos la n a 5 repeticiones, evaluando tanto el mRNA como las citocinas intracelulares. Se extrajo RNA de linfocitos T CD4⁺ de adultos y de neonatos, que se trataron de la siguiente manera: Sin estímulo, entrecruzados con anticuerpos anti-CD3, flagelina, anti-CD3 + flagelina, perlas anti- CD3/CD28, y por último el tratamiento de anti-CD3/CD28 más flagelina. En la Figura 2 se observan muestras de RNA mensajero tanto de adultos como de neonatos. Sólo se utilizaron RNAs íntegros (que no estuvieran degradados), evaluando la banda del RNA ribosomal 18S con un peso molecular correspondiente a 1869 b y la banda del ribosomal 28S con un peso molecular correspondiente 5070 b. como se muestra en la Figura 2.

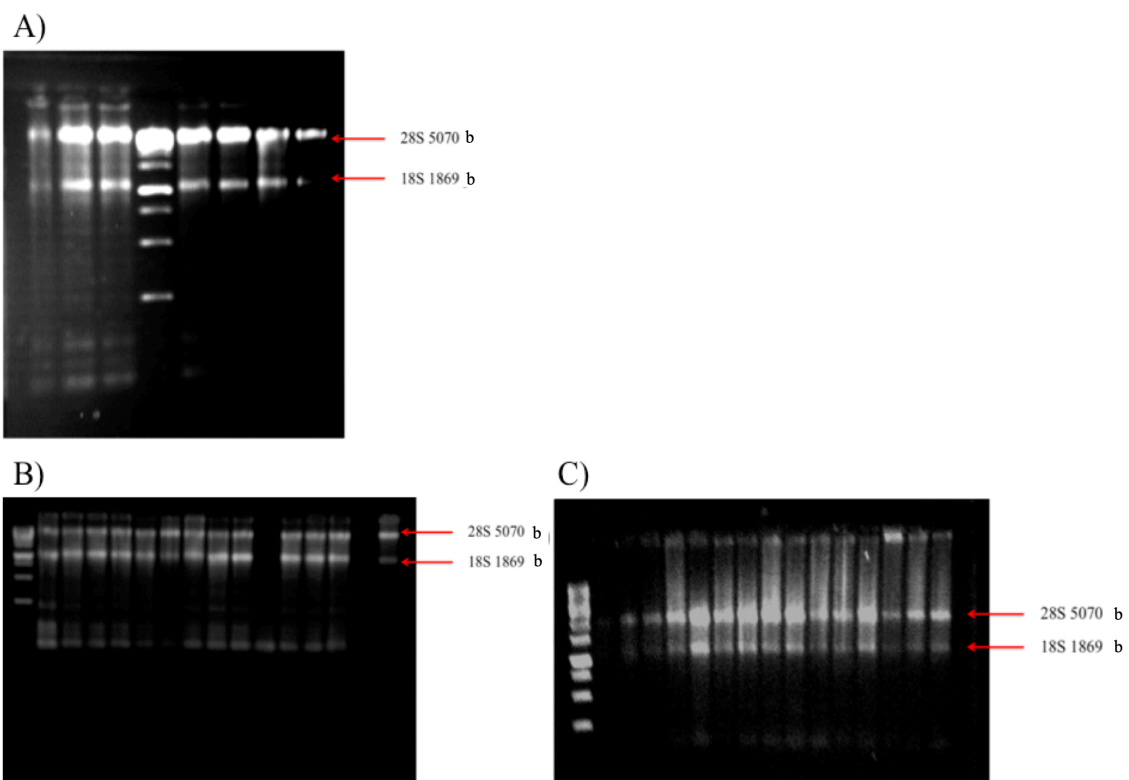
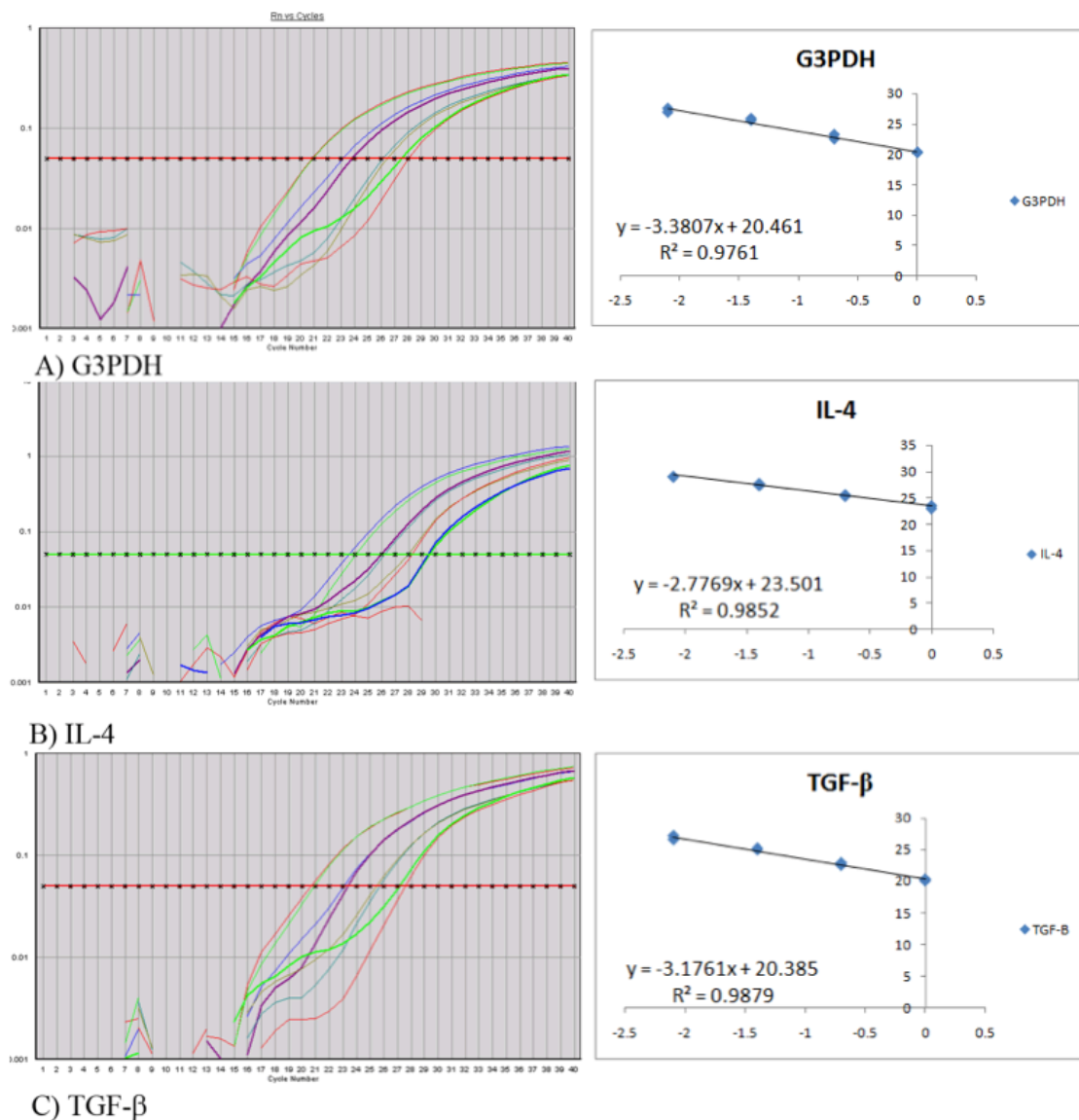


Figura 2. Validación del RNA. En los incisos A y B se muestra RNA de linfocitos T CD4 de Adultos humanos. En el inciso C se muestra RNA de linfocitos T de neonatos. La flecha roja indica la banda del 28s y el 18s con sus pesos moleculares. Las muestras de RNA se corrieron en geles de agarosa 1% con bromuro de etidio al 0.05%.

Para poder comparar entre las distintas reacciones de amplificación y convertir los datos de curvas de PCR en cantidades discretas de DNA, se realizaron curvas de amplificación de diluciones seriadas de cDNA: 1/125, 1/25, 1/5 y concentrado. Las diluciones fueron sometidas a una reacción de q-PCR obteniendo las curvas mostradas en la figura 3. Se obtuvo un coeficiente de co-relación entre .95 y .99, indicando así que los datos son confiables y que las ecuaciones de las curvas se pueden emplear para calcular las cantidades de cDNA de las muestras problema.



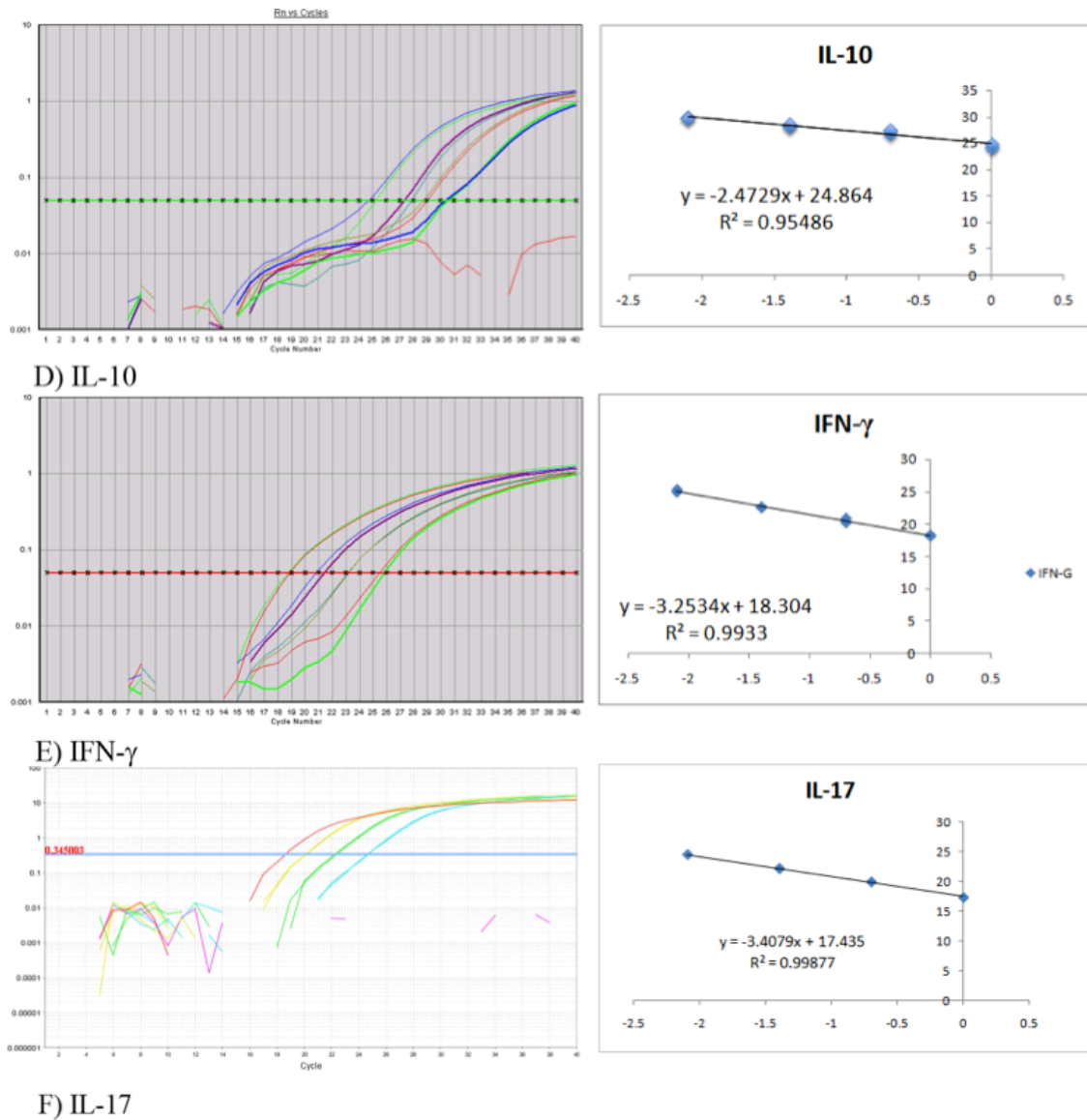


Figura 3 Curvas de estándar de los primers. Se muestran las curvas de eficiencia de amplificación para los distintos amplicones de los genes. Se realizaron diluciones seriales del cDNA 1/125, 1/25, 1/5 y concentrado obteniendo una ecuación para cada uno de los primers. Esta ecuación es funcional para poder comparar entre las distintas reacciones de amplificación y convertir los datos de curvas de PCR en cantidades discretas de DNA. Mientras más ciclos se necesiten para amplificar indica menor cantidad de cDNA.

A partir de RNA descrito anteriormente se sintetizó cDNA para analizar la expresión de las citocinas firma de la respuesta Th1, Th2, Th17 y Treg.

Se utilizaron los primers específicos y los mensajeros de estas citocinas fueron analizados

mediante q-PCR, utilizando el sistema TaqMan, Las cantidades discretas de cada muestra se obtuvieron de las ecuaciones obtenidas a partir de las curvas anteriormente descritas. Se utilizó como control interno al mensajero de GAPDH.

En la figura 4 observamos los cambios en el mensajero de las citocinas en respuesta al estímulo del TCR (CD3) o del TCR y CD28 en presencia ó ausencia de flagelina. Para la mayoría de las muestras de adulto hubo una mayor expresión del mensajero de las citocinas en respuesta a la estimulación, excepto el mensajero de IFN- γ que se expresó más en las células neonatales en respuesta a la flagelina. Se puede observar en la figura que la única citocina que mostró cambios significativos tanto en células neonatales como de adulto en respuesta a la flagelina fue IFN- γ . Tanto en células neonatales como de adulto se observó que la flagelina incrementó el mensajero de IFN- γ sobre los niveles ya inducidos por las señales del TCR y de CD28. En las células neonatales, también se observó un cambio ligero, pero estadísticamente significativo en TGF- β , que aumentó en presencia de flagelina sobre el estímulo de CD3+ CD28. El resto de las citocinas evaluadas mostraron cambios en respuesta a CD3 o CD3+ CD28, en particular en las células de adultos, pero no hubo un efecto de la flagelina.

Linfocitos T CD4⁺ Virgenes
a) Neonato b) Adulto

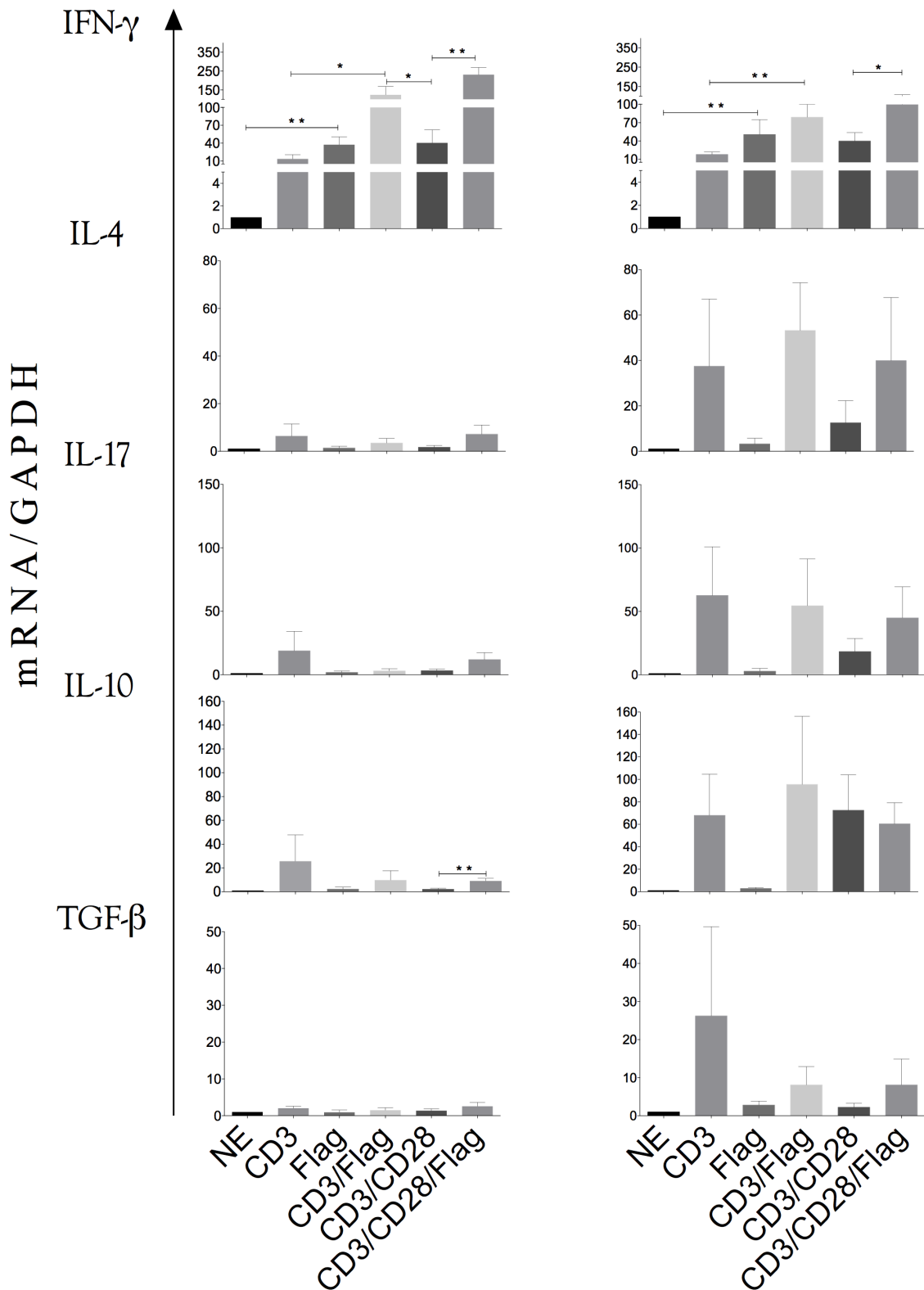


Figura 4. **Transcripción de las citocinas firma Th1, Th2 y Tregs.** Mediante la técnica de PCR en tiempo real se evaluó la expresión relativa de los genes utilizando la ecuación obtenida de las curvas estándar antes mencionada. En el eje X se muestran las condiciones dadas a los linfocitos T CD4, en el eje Y se muestra la expresión relativa del mensajero a

evaluar. Se realizaron 5 experimentos independientes para neonatos y 5 experimentos independientes para adultos. Mediante el test de Mann-Whitney se realizaron los cálculos estadísticos para el efecto producido por la flagelina, se comparó la el estímulo de la flagelina con cada uno de sus controles obteniendo una $p < 0.05$ para el mRNA de IFN- γ . En el panel a) se observa la expresión de los mensajeros de las citocinas de neonatos, en el panel b) se observa la transcripción de las citocinas de adultos.

c) Evaluación de citocinas intracelulares firma Th1, Th2, Treg en respuesta a Flagelina

La transcripción de los mensajeros nos habla del efecto directo de los estímulos sobre los genes de las citocinas, sin embargo, hay otros puntos de control antes de llegar a la expresión de las proteínas, por lo que decidimos evaluar la expresión de las proteínas. Para evaluar la producción de citocinas se utilizaron anticuerpos acoplados a fluoróforos. Se normalizaron los datos de los distintos estímulos con respecto a la condición sin estímulo y se analizaron mediante la técnica de citometría después de permeabilizar a las células. En la figura 5 podemos observar que igual que para el caso de los datos de mensajero, tanto en las células de neonatos como de adulto, la flagelina favoreció un incremento estadísticamente significativo en los niveles de proteína de IFN- γ . sobre los niveles alcanzados por el estímulo sólo del TCR o los estímulos de CD3 + CD28.

Para las citocinas IL-4 e IL-17, sólo se observaron cambios en las células de adulto, pero fueron debidos a la señalización por el TCR o el TCR y CD28, pero la flagelina no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo, aunque se nota una tendencia en las células de adulto a un incremento en la producción de IL-17 con el estímulo de CD3/CD28/Flagelina, sobre el estímulo con CD3/CD28.

En conjunto, nuestros resultados muestran que las señales de flagelina dirigen la diferenciación hacia el perfil Th1 en células estimuladas a través del TCR en presencia o ausencia de las señales de CD28.

Linfocitos T CD4⁺ Virgenes

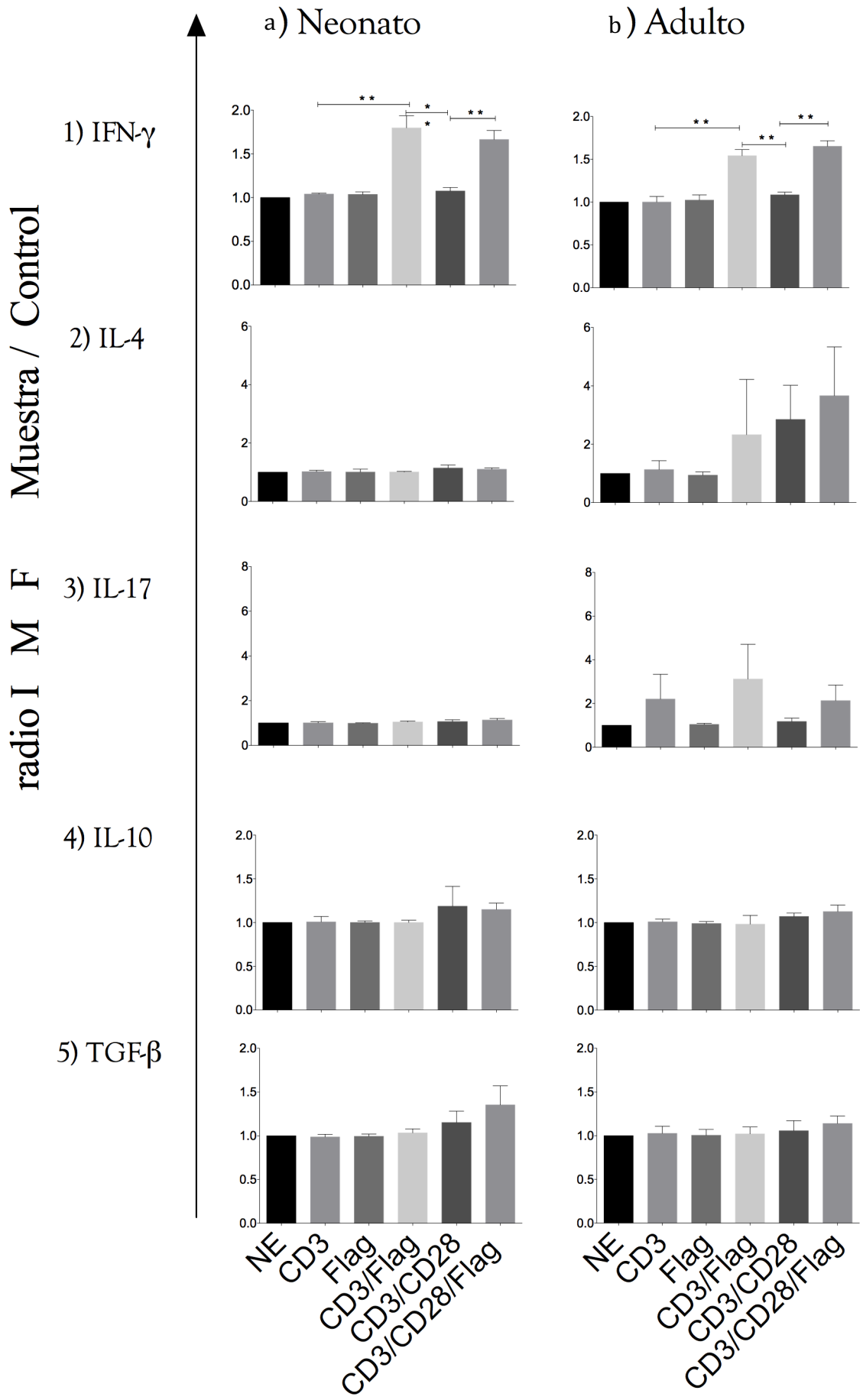


Figura 5. Producción de Citocinas en respuesta a flagelina. Mediante citometría de flujo se evaluó la producción de las citocinas firma de los diferentes linajes de los linfocitos T CD4 IFN- γ (Th1), IL-4 e IL-13 (Th2), TGF-b e IL-10 (Treg) e IL-17 (Th17). Linfocitos T CD4 vírgenes de sangre periférica de adultos y linfocitos T CD4 de neonatos fueron estimulados con Flagelina 50 ng, 1 μ g de anti-CD3, perlas anti-CD3/CD28 durante un periodo de 18 hrs. 6 hrs. antes de cumplir este periodo, se adicionó a las muestras brefeldina. En el eje X se muestran las condiciones, en el eje Y se muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI).

d) Evaluación de la expresión de citocinas en linfocitos T CD4⁺ efectores y de memoria.

Para evaluar el efecto de la flagelina por sí sola o en presencia de las señales del TCR o del TCR + CD28 en células de memoria naturalmente diferenciadas en circulación, se purificaron linfocitos T CD4⁺ totales de adultos, obteniendo una pureza por encima del 95 % como se muestra en la figura 6. Estas células se marcaron con el marcador de memoria CD45RO, o con los marcadores CXCR3, para poblaciones Th1 y CCR4, para las células Th2. La respuesta se evaluó mediante citometría de flujo, analizando las citocinas firma de los perfiles Th1, Th2 y de memoria. Los estímulos se compararon con sus respectivos controles de la siguiente manera; SE vs Flagelina, CD3 vs CD3/Flagelina, CD3/CD28 vs CD3/CD28/Flagelina.

IFN- γ : Se pudo observar que en el carril del perfil Th1 (Figura 7 panel a), el estímulo CD3/CD28/Flagelina indujo un incremento significativo en IFN- γ y no hubo cambios significativos en ninguna citocina. En el carril de las células Th2 (Figura 7 carril b) El único cambio significativo que se observó fue una disminución significativa en la expresión de la citocina firma IL-4. En las células totales de memoria (Figura 7 carril c) se observó aumento en la expresión de IFN- γ en el estímulo de CD3/CD28/flagelina comparado con su respectivo control CD3/CD28 y un aumento ligero en la expresión de IL-4 por las señales del TCR.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la flagelina, más la estimulación con CD3/CD28 favorecen la diferenciación Th1, tanto por el aumento en la expresión de IFN-

γ en las poblaciones vírgenes, Th1 y totales de memoria, como por la disminución de la expresión de la citocina firma IL-4 en poblaciones naturales Th2.

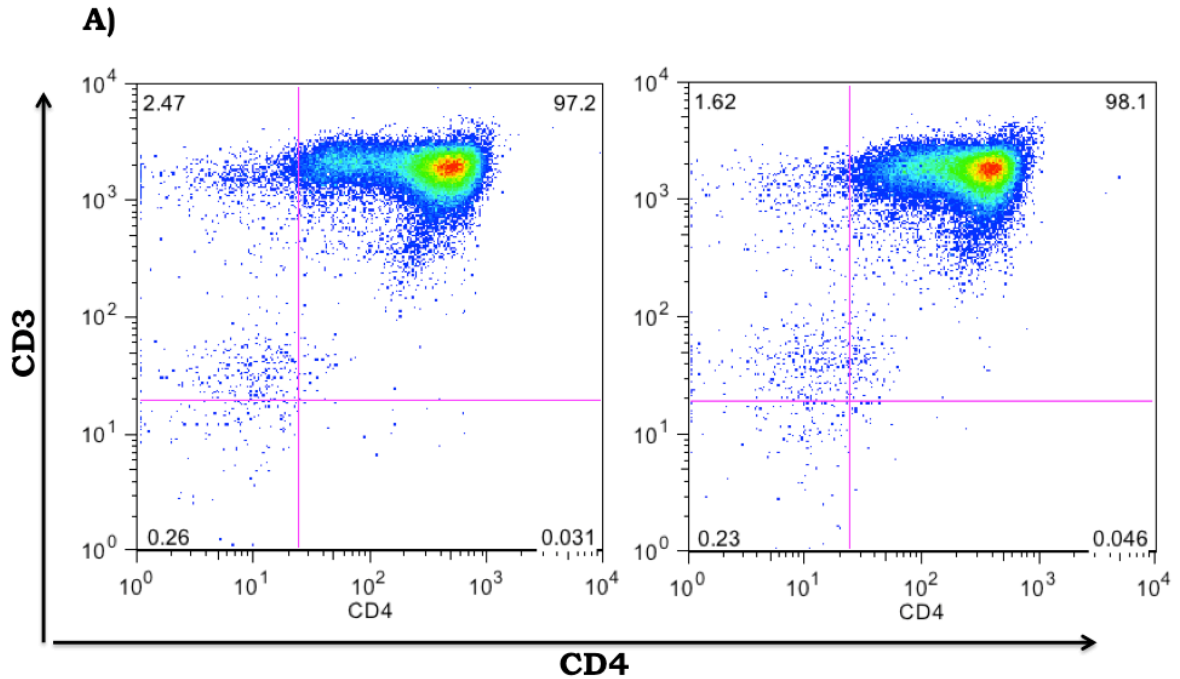


Figura 6. Perfiles citofluorométricos de linfocitos T CD4⁺ de humanos adultos purificados. Se evaluó la pureza de cada una de las muestras obtenidas logrando obtener una pureza de un 95 a un 98%. Se muestra la pureza representativa de los linfocitos T CD4⁺ de adultos. En el eje X se muestra el porcentaje de células que expresan la molécula de CD4 en el eje Y se muestra el porcentaje de células que expresan la molécula de CD3. El índice de pureza se obtiene de las células que expresan ambas moléculas, tanto CD3 como CD4.

Linfocitos T CD4⁺ de memoria

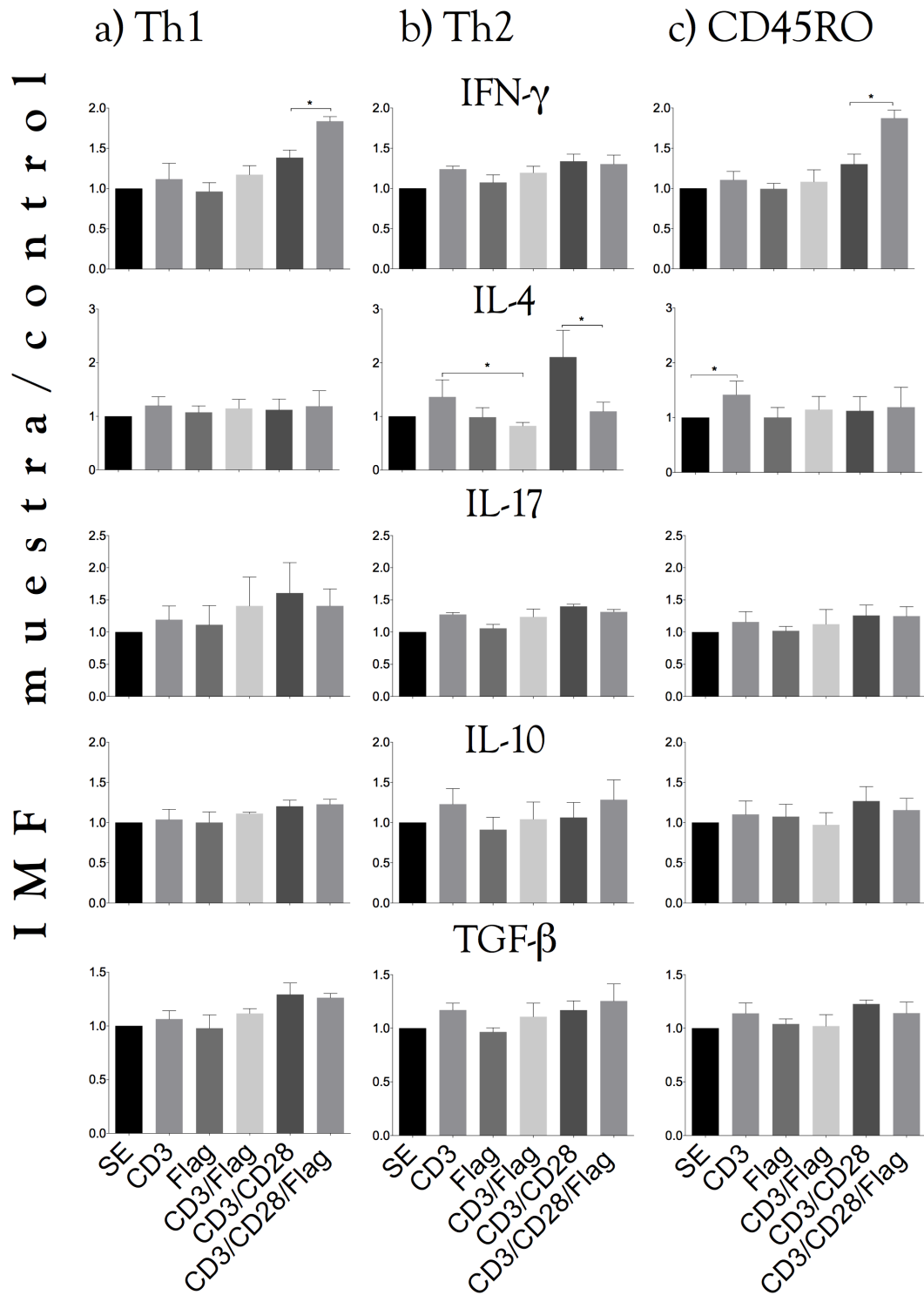


Figura 7. Evaluación mediante citometría de flujo de la respuesta de células de memoria totales y de los perfiles Th1, Th2 a la estimulación por flagelina +/- las señales de TCR y/ó CD28. Las células totales de memoria se marcaron con anticuerpos anti-CD45RO, las células Th1 con anti-CXCR3 y las células Th2 con anti-CCR4. Se evaluó la expresión de las citocinas IFN- γ IL-17, IL-10, IL-4 y TGF- β en linfocitos T CD4⁺ de adultos humanos. El tiempo de estimulación fue de 18 hrs.

e) Ensayos *in vivo*

Para evaluar el efecto de la flagelina *in vivo*, decidimos adaptar un modelo murino de vacunación contra rotavirus a ratones neonatos, empleando como antígeno la proteína conservada VP6. También decidimos evaluar los niveles de protección usando nanopartículas de oro de 40 nm acopladas tanto a la proteína VP6 como a la flagelina. A continuación, se listan los resultados de cada una de las etapas de preparación para poder realizar esta evaluación y finalmente los resultados de protección contra la infección por el rotavirus.

f) Purificación de la Proteína VP6 49 KDa

Decidimos emplear a la proteína VP6 como antígeno en el modelo de vacunación dada la antigenicidad de la proteína y su alta conservación entre distintas especies de rotavirus. Para obtener la proteína, realizamos la traducción *in vitro*, empleando el sistema Rapid Translation System (RTS, Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido de la VP6 que empleamos fue (pIVEX2.4/VP6ew) en el cual la proteína queda marcada con residuos de 6 histidinas. Obtuvimos un sobrenadante lechoso, a partir del cual purificamos a la VP6 por medio de columnas de níquel. En la figura 8 se muestran los distintos pasos de la purificación de la proteína. Este procedimiento se realizó para las 4 fracciones. Se unieron las eluciones de la columna que mostraban un alto contenido de la proteína y se cuantificó mediante Densidad óptica (figura 9). Se reevaluaron las fracciones unificadas mediante western blot y se hizo la cuantificación total de cada fracción por medio de densidad óptica y tinción por azul de coomasie, como se muestra en la figura 10. Para verificar la presencia de la proteína VP6 y el grado de pureza se realizaron tinciones con azul de Coomassie, y con nitrato de plata (figura 11).

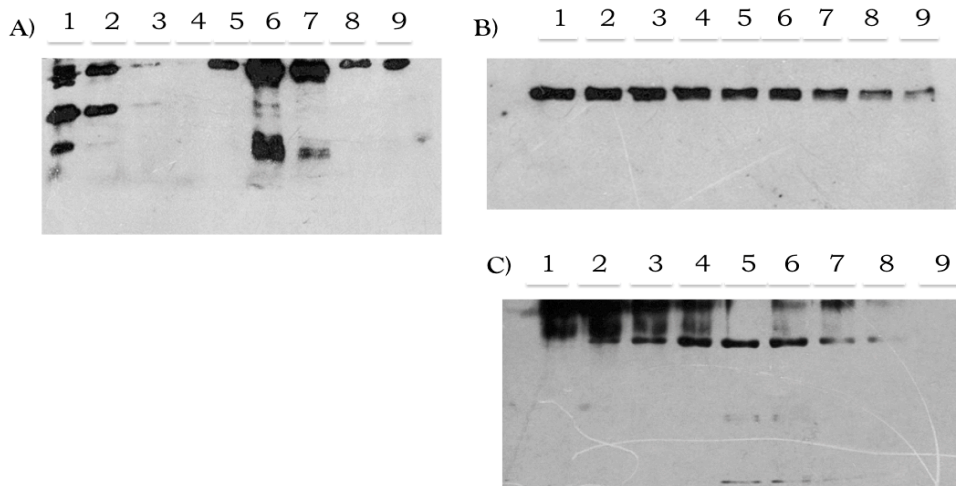


Figura 8. Purificación de VP6. Se realizaron ensayos de western blot para verificar la presencia de la VP6 y su pureza. A) se observan los lavados y eluciones indicando lo siguiente cada número: Carril 1 fracción no unida a columna de níquel. Carril 2 lavado 1. Carril 3 lavado 2. Carril 4 elución 1. Carril 5 elución 5. Carril 6 elución 10. Carril 7 elución 15. Carril 8 elución 20 y carril 9 elución 25. B) Carril 1.- elución 3, Carril 2.- elución 4. Carril 3.- elución 6, Carril 4.- elución 7, Carril 5.- elución 8. Carril 6.- elución 9. Carril 7.- elución 11. Carril 8.- elución 12 y carril 9.- elución 13. C) Carriles 1- 9 corresponde a las eluciones 14-24.

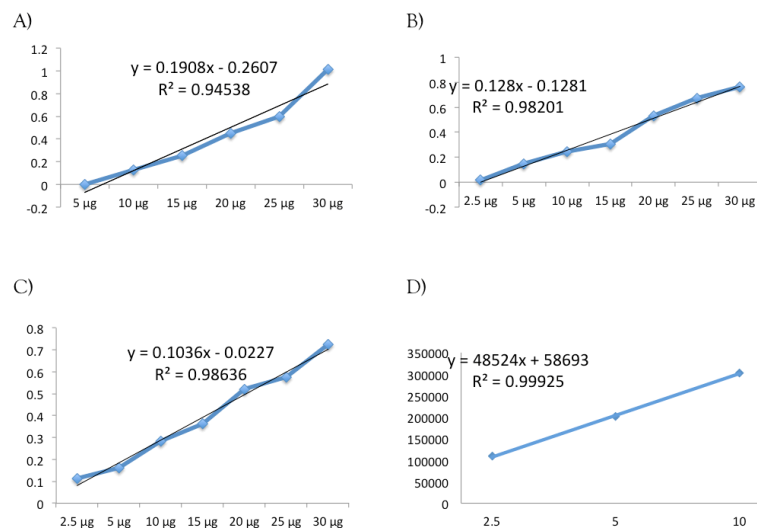


Figura 9. Determinación de la concentración de la proteína VP6. El panel A muestra la curva de BSA, utilizada para la obtención de la concentración de VP6 de la fracción 1, B) curva de BSA con la cual se calculó la concentración de VP6 en las fracciones 2 y 3. C) curva de BSA utilizada para calcular la concentración de VP6 en la fracción 4. D) curva obtenida mediante 3 concentraciones de BSA en un gel teñido con Coomassie. Se realizó un análisis semicuantitativo empleando el software ImageJ. Esta curva se utilizó para calcular la concentración de las 4 fracciones.

Tabla1. Concentración de VP6 en las 4 fracciones. Se utilizaron tres diferentes métodos para el cálculo de la concentración de VP6.

Técnica	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4
C. BSA	1.5 mg	1.5 mg	1.7 mg	1.9 mg
D.O Abs 280	1.2 mg	1.5 mg	1.3 mg	1.57 mg
Coomassie	254 mg	255 mg	227 mg	212 mg

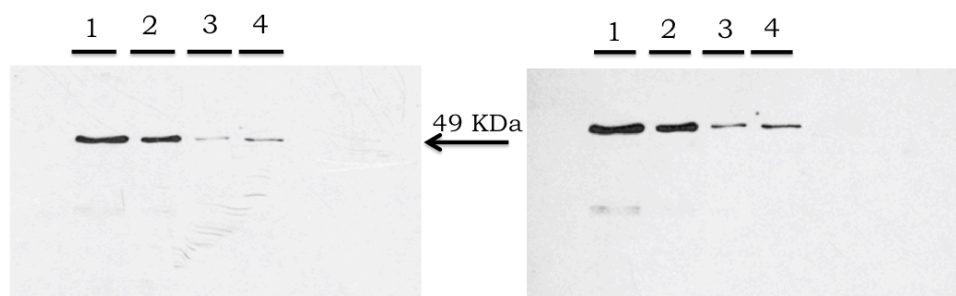


Figura 10. Verificación mediante western blot de la presencia de la proteína VP6. En cada una de las fracciones. 1- fracción 1, 2- fracción 2, 3-fracción 3, 4- fracción 4.

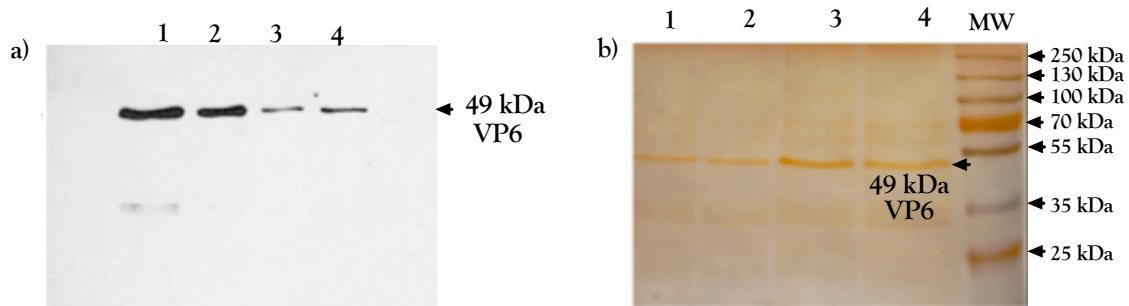


Figura 11. Rectificación de la pureza de la proteína VP6. Mediante tinción con Coomassie y tinción con plata. Se corrieron en un gel 10 μ g de VP6 y se tiñó con azul de Coomassie (a) Carril 1- fracción 4, 2- fracción 3, 3- fracción 2, 4- fracción 1. En el panel B se muestran tinciones con nitrato de plata (b).

g) Acoplamiento de VP6 y flagelina a nanopartículas de oro.

Se realizó el acoplamiento a las partículas de oro con el Kit Gold-in-a-Box TM de BioAssayWorks, sin embargo, debido a la alta concentración de SDS de la proteína (VP6). Fue imposible llegar con éxito al acoplamiento de la nanopartículas de 40nm. Finalmente, se decidió mandar a preparar en una casa comercial (Nanoinmunotech S. L.). Donde primero recubrieron a la nanopartícula de oro con polietilenglicol.

- **Evaluación del efecto de las nanopartículas de oro acopladas a VP6 o Flagelina sobre la viabilidad celular de células Raw 264.7**

Como una primera medida del efecto de las nanopartículas de oro (AuNp) sobre la viabilidad celular, evaluamos la proliferación de las células Raw 264.7 en respuesta a las nanopartículas acopladas al antígeno (VP6) ó al adyuvante (flagelina), usando como control los antígenos no acoplados (tabla 2). Usando el Analizador en Tiempo Real de las Células (RTCA Real-Time Cell Analyzer) se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 12. Las condiciones se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Estímulos dados para la evaluación de la inmunogenicidad de las nanopartículas acopladas con las proteínas VP6 y Flagelina. Cada evaluación se hizo por duplicad

Placa 1 AuNp-VP6	Placa 2 AuNp-Flag	Placa 3 AuNp-VP6 + AuNp-Flag
Células Solas	Células Solas	Células Solas
AuNp-VP6 sola 2 µg/ml	AuNp-Flag sola 1 µg/ml	Solo AuNp-VP6 2 µg/ml + AuNp-Flag 1 µg/ml
AuNp-VP6 2 µg/ml	AuNp-Flag 1 µg/ml	AuNp-VP6 2 µg/ml + AuNp-Flag 1 µg/ml
AuNp-VP6 1 µg/ml	AuNp-Flag 0.5 µg/ml	AuNp-VP6 1 µg/ml + AuNp-Flag 0.5 µg/ml
AuNp-VP6 0.5 µg/ml	AuNp-Flag 0.25 µg/ml	AuNp-VP6 0.5 µ g/ml + AuNp-Flag 0.25 µg/ml
VP6 2 µg/ml	Flag 1 µg/ml	VP6 2 µg/ml + Flag 1 µg/ml
VP6 1 µg/ml	Flag 0.5 µg/ml	VP6 1 µg/ml + Flag 0.5 µg/ml
VP6 0.5 µg/ml	Flag 0.25 µg/ml	VP6 0.5 µg/ml + Flag 0.25µ g/ml

Se observó incremento en la proliferación de las células Raw 264.7 cuando son estimuladas con las AuNP-VP6, comparado con las células solas y con las células estimuladas con la proteína VP6 sin la AuNP. Este efecto se observó en las tres concentraciones evaluadas, aunque a la concentración más baja, no alcanzó significancia estadística (figura 12). El efecto de la flagelina sobre la proliferación no se observó más que a las menores concentraciones de antígeno (0.5µg) y sólo cuando la flagelina estuvo acoplada con las nanopartículas (AuNp-VP6 + AuNp-Flag). Esto indica que el acoplamiento de las proteínas a las nanopartículas de oro potenció la proliferación celular. La flagelina no acoplada, en lugar de potenciar la proliferación celular, inhibió la proliferación inducida por la AuNp-VP6.

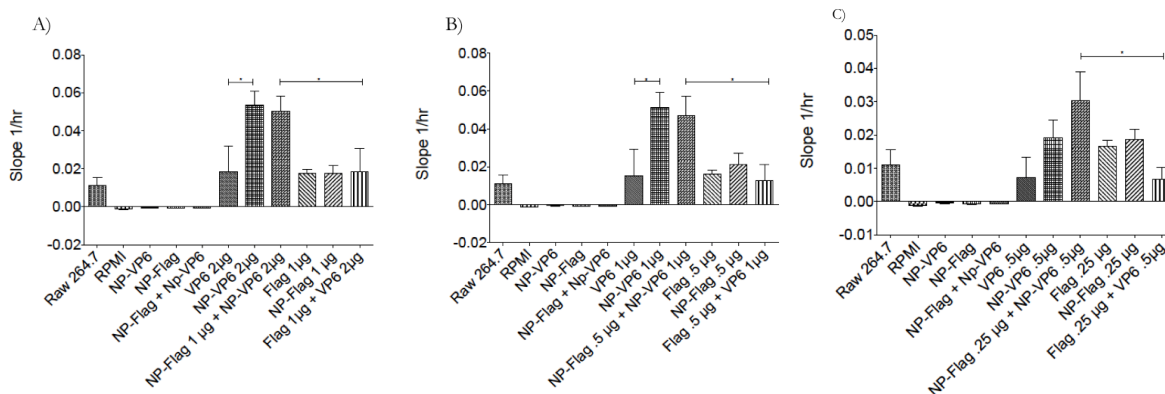


Figura 12. Las AuNp-VP6 en combinación con las AuNp-Flag incrementaron la proliferación de las células Raw 264.7. En el inciso A tres experimentos independientes con las concentraciones de AuNp-VP6 2 µg/ml y AuNp-Flag 1 µg/ml. Inciso B tres experimentos independientes con las concentraciones de AuNp-VP6 1 µg/ml y AuNp-Flag 0.5 µg/ml. Inciso C tres experimentos independientes con las concentraciones de AuNp-VP6 0.5 µg/ml y AuNp-Flag 0.25 µg/ml.

h) Evaluación de la producción de citocinas al estimular PBMCs con nanopartículas de oro acopladas a Vp6 (AuNp-VP6) y nanopartículas de oro acopladas a Flagelina (AuNp-Flag).

Enseguida, quisimos evaluar el perfil de citocinas inducido por los distintos tratamientos sobre células mononucleares de adultos (PBMC por sus siglas en inglés). Se utilizó el Kit FlowCytomix Human Th1/Th2 11plex Kit BMS810FF de eBioscience. Para poder evaluar simultáneamente la expresión de las siguientes citocinas: IFN- γ IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, TNF- α , TGF- β . El análisis de los datos se realizó con el software FlowCytomixTM Pro 3. Las células PBMCs obtenidas a partir de 3 adultos sanos se trataron de la siguiente manera.

1. Sin Estímulo (SE)
2. Fitohemaglutinina+Lipopolisacarido (PHA 1 µg +LPS 10 µg)
3. VP6 0.5 µg
4. Flagelina (Flag) 0.250 µg
5. Nanopartícula de oro acoplada a VP6(AuNP-VP6) 0.5 µg
6. Nanopartícula de oro acoplada a Flagelina (AuNP-Flag)
7. AuNp-VP6 0.5 µg + AuNp-Flag 0.250 µg

La estimulación fue dada por un periodo de 24 horas y otro periodo por 48 horas. Se

tomaron los sobrenadantes y se analizaron mediante la técnica de citometría de flujo en el citómetro FC 500. En la tabla 3 se resumen los distintos tratamientos. Una vez analizados los datos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 13.

IL-12p70: A las 24 horas se observó un incremento en la producción de esta citocina con el estímulo AuNP-VP6, al compararlo con el estímulo de VP6. Con respecto a los demás estímulos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. A las 48 horas sólo se observaron cambios en el control positivo.

IFN- γ : A las 24 horas se observó un incremento en la producción de esta citocina con el estímulo AuNP-VP6, al comparado con el estímulo de VP6. Con respecto a los demás estímulos no se observaron diferencias estadísticamente significativas. A las 48 horas hubo un incremento del IFN- γ en el estímulo de AuNP-VP6 comparado con respecto a el estímulo solo de la VP6, así mismo se observó incremento en la expresión de la citocina IFN- γ cuando la flagelina se encuentra acoplada a las nanopartículas de oro comparada con respecto a la flagelina sin acoplar. Sin embargo, en el estímulo combinado entre las AuNP-VP6 + AuNP-Flag no se observó incremento en la producción del IFN- γ .

IL-2: A las 24 horas se observó incremento en la producción de IL-2 con el estímulo dado AuNP-VP6, al comparado con el estímulo de VP6. Con los demás estímulos no se observaron diferencias estadísticamente significativas. A las 48 horas no hubo cambios en la producción de la IL-2.

IL-4, IL5: Sólo se observó un incremento en la expresión de las citocinas al control positivo, los cambios debidos a las estímulos o nanopartículas no fueron significativos.

IL-1 β : Esta citocina se incrementó significativamente a las 24 horas con los estímulos de AuNP-VP6 y AuNP-Flag al compararlo con sus respectivos controles VP6 y Flagelina. Inclusive al poner los estímulos combinados AuNP-VP6 + AuNP-Flag el incremento es muy similar al control positivo del estímulo con la PHA + LPS.

IL-10: A las 24 horas se observó un incremento en la producción de la IL-10 con el estímulo AuNP-VP6, al comparado con el estímulo de VP6. En los demás estímulos no se observaron diferencias estadísticamente significativas. A las 48 horas hubo un incremento de la IL-10 con el estímulo de AuNP-VP6 comparado con el estímulo solo de la VP6, así mismo se observó incremento en la expresión de la citocina IL-10 cuando la flagelina se encuentra acoplada a las nanopartículas de oro comparada con respecto a la flagelina por si sola. Sin embargo, en el estímulo combinado entre las AuNP-VP6 + AuNP-Flag no se observó incremento en la producción del IL-10.

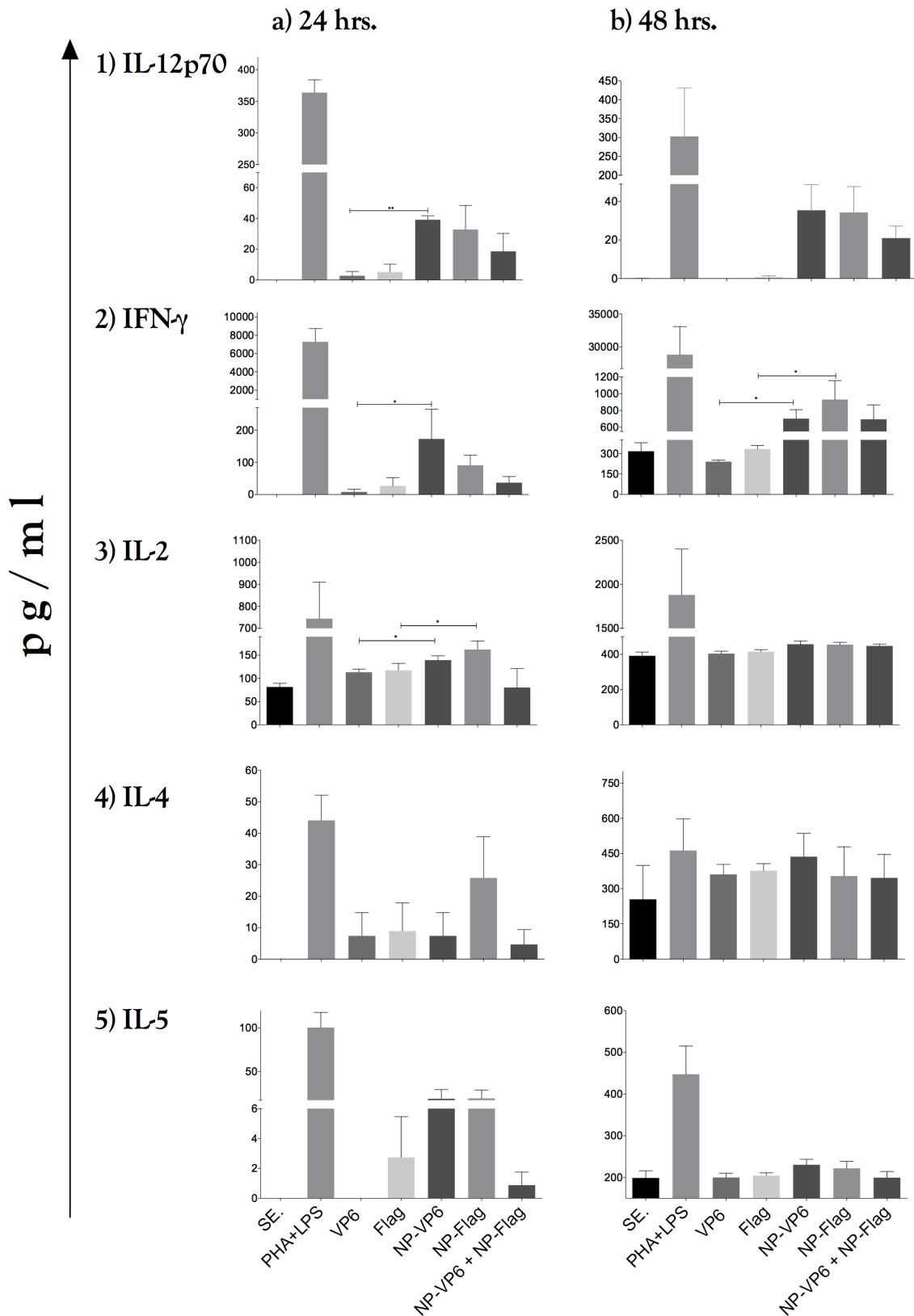
IL-8. No se observaron cambios significativos

IL-6: Esta citocina tuvo un incremento significativo a las 24 horas con los estímulos de AuNP-VP6 y AuNP-Flag al compararlo con sus respectivos controles VP6 y Flagelina. Inclusive al poner los estímulos combinados AuNP-VP6 + AuNP-Flag el incremento fue muy similar al control positivo estímulo con la PHA + LPS.

TNF- α y TNF- β : A las 24 horas no hubo cambios en la producción de estas citocinas. A las 48 horas en las dos citocinas hubo un incremento cuando se estimulan a las células con las AuNp-VP6 en comparación con el estímulo de VP6. Estos resultados nos sugieren que al acoplar las proteínas a nanoparticulas de oro de 40nm, favorece la producción de citosinas proinflamatorias.

Citocina	24 horas			48 horas		
	IL-12p70	AuNp-VP6				
IFN- γ	AuNp-VP6			AuNp-VP6	AuNP-Flag	
IL-2	AuNp-VP6					
IL-4						
IL-5						
IL-1 β	AuNp-VP6	AuNP-Flag	AuNp-VP6 AuNP-Flag	AuNp-VP6	AuNP-Flag	AuNp-VP6 AuNP-Flag
IL-10	AuNp-VP6			AuNp-VP6	AuNP-Flag	
IL-8						
IL-6	AuNp-VP6	AuNP-Flag	AuNp-VP6 AuNP-Flag	AuNp-VP6	AuNP-Flag	AuNp-VP6 AuNP-Flag
TNF- α				AuNp-VP6		
TNF- β				AuNp-VP6		

Tabla 3: Resumen de los estímulos que incrementan la producción de las citocinas indicadas.



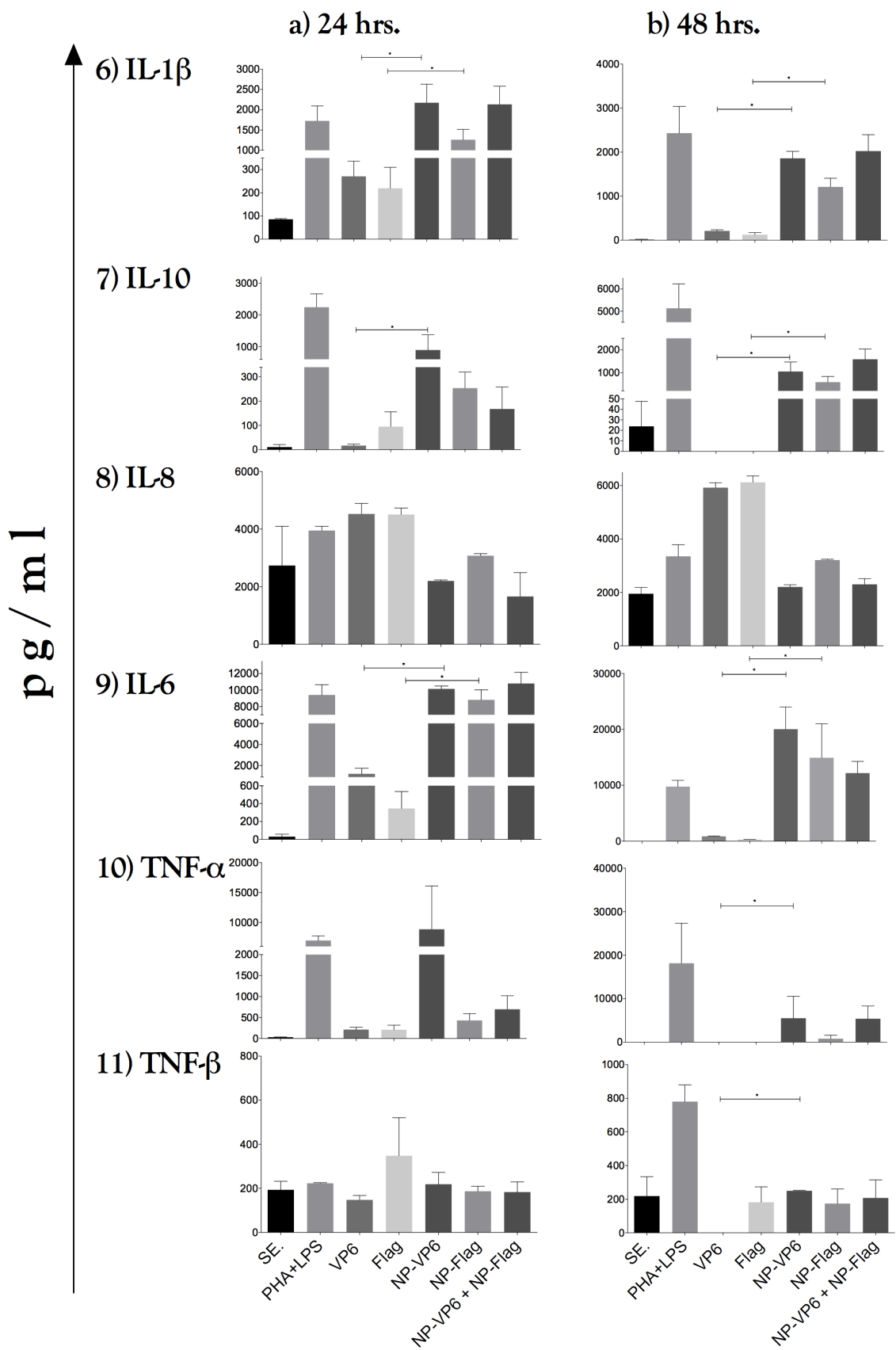


Figura 13: Las AuNP-VP6 favorecen la síntesis de citocinas pro-inflamatorias. Se realizó la evaluación de la producción de las citocinas IFN- γ , IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, TNF-a, TNF-b en PBMCs

i) Evaluación de la producción de citocinas al estimular PBMCs y CBMCs con nanopartículas de oro acopladas a Vp6 (AuNp-VP6) y nanopartículas de oro acopladas a Flagelina (AuNp-Flag).

Durante la estancia en España, en los resultados previamente mostrados, evaluamos la producción de las citocinas IFN- γ , IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, TNF- α , TGF- β : en PBMCs mediante el kit FlowCytomix Human Th1/Th2 11plex Kit BMS810FF de eBioscience. A la falta de muestras de células mononucleares de cordón umbilical (CBMCs, Cord Umbilical Mononuclear Cells), se decidió reevaluar en el laboratorio la respuesta de PBMCs y CBMCs por tinción intracelular y citometría de flujo. Se decidió evaluar las siguientes citocinas IL-12, IL-6, IFN- γ , IL-4 e IL-1- β mediante una tinción intracelular. Para la evaluación en la expresión de las citocinas se utilizaron los siguientes estímulos:

1. Sin estímulo (SE)
2. Flagelina 0.250 μ g
3. VP6 0.5 μ g
4. Flagelina 0.250 μ g más VP6 0.5 μ g
5. Nanopartículas de oro acopladas con flagelina (AuNp-Flag 0.250 μ g)
6. Nanopartículas de oro acopladas con VP6 (AuNp-Flag 0.5 μ g)
7. Nanopartículas de oro acopladas con flagelina más Nanopartículas de oro acopladas con VP6 (AuNp-Flag 0.250 μ g + AuNp-VP6 0.5 μ g).

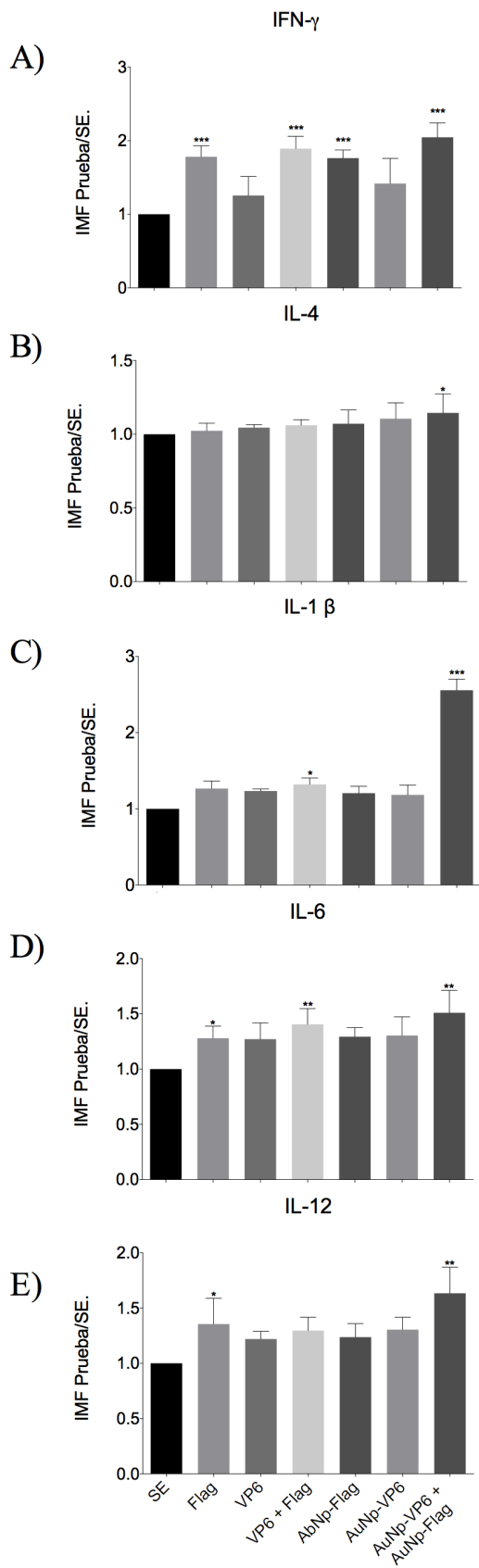
Los resultados de estas evaluaciones se muestran en la figura 14. Los resultados fueron los siguientes.

En las células mononucleares del cordón umbilical (CBMCs) se observó un incremento en la expresión de IFN- γ en los estímulos de flagelina, flagelina más VP6, AuNp-flag y de AuNp-Flag más AuNp-VP6. Sin embargo, el incremento del IFN- γ fue en respuesta a la flagelina, ya que solo con el estímulo de la flagelina aumenta la expresión de esta citocina. En cambio, en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se encontró que tanto flagelina como VP6 ya sea acopladas las proteínas a nanopartículas

de oro o por si solas, aumentaron la expresión del IFN- γ comparado con el control sin estímulo. El aumento en la expresión del IFN- γ con el estímulo de VP6 sugiere que, en el adulto, existen células de memoria por una infección previa con rotavirus, que respondieron al estímulo con VP6 (figura 14 A).

No se observaron cambios en la expresión de IL-4 ni en PBMCs ni en CBMCs (figura 14 B). La producción de la IL-1 β se vio favorecida en CBMCs con los estímulos de flagelina más VP6 y AuNp-flag más AuNp-VP6, a diferencia de las CBMCs, en las PBMCs no se observaron cambios en respuesta a los diferentes estímulos (figura 14 C). Para la IL-6 se observó aumento en la expresión en presencia de flagelina aunque estos cambios son muy sutiles alcanzaron diferencia estadística. Se encontró que la producción de la IL-12 en CBMCs se favoreció con los estímulos de flagelina y AuNP-flagelina más AuNp-VP6. El comportamiento fue similar al de la producción de IFN- γ , donde el aumento en la producción de estas citocinas fue generado por la flagelina más que por la proteína VP6. Esto va de acuerdo con que las células de cordón umbilical son células vírgenes, sin previo reconocimiento al antígeno. En PBMCs se encontró que la IL-12 incrementa tanto con VP6 como con flagelina. De la misma forma que la respuesta en la producción de IFN- γ , se observó que el estímulo con AuNp-VP6 más AuNp-flag no generaron una respuesta en la producción de estas citocinas (figura 14 A y E). Nuestros resultados *in vitro*, indican que en células CBMCs la producción de citocinas pro-inflamatorias se ve favorecida cuando están los estímulos en conjunto AuNp-Flag más AuNp_VP6.

Neonato



Adulto

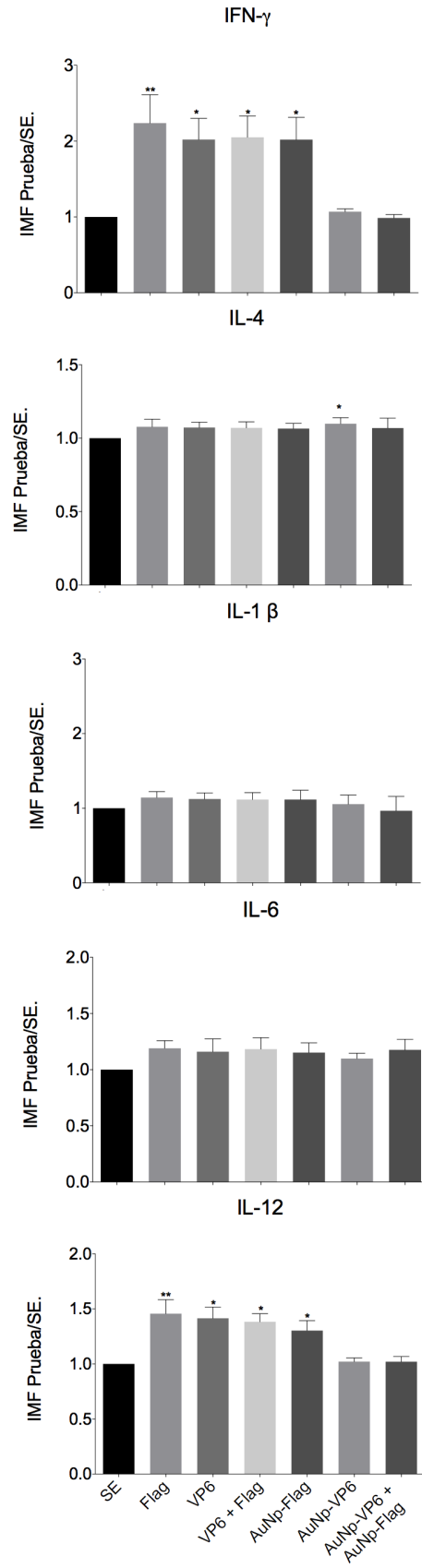


Figura 14: En CBMCs de neonatos las AuNp-Flag y AuNp-VP6 inducen la expresión de IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e IL12 comparado con las PBMCs de adultos. PBMCs y CBMCs fueron estimulas con 0.250 μ g de AuNp-Flag y 0.5 μ g de AuNp-VP6 en conjunto y por separado por un periodo de 18 horas, fueron 5 muestras independientes.

j) Inmunogenicidad de la Flagelina más la proteína viral VP6, libres o unidas a las nanopartículas

Para evaluar el papel adyuvante de la flagelina en el modelo de vacunación neonatal se vacunaron ratones de 7 días de nacidos comparados con ratones adultos de 28 días Los tratamientos fueron:

1. Nanopartículas esféricas de oro de 40 nm acopladas a la proteína VP6 (Neonatos: AuNp-VP6 0.5 μ g, Adultos: AuNp-VP6 1 μ g)
2. Nanopartículas esféricas de oro de 40 nm acopladas a la proteína Flagelina (Neonatos AuNp-Flag 0.250 μ g, Adultos AuNp-Flag 0.5 μ g)
3. Nanopartículas esféricas de oro de 40 nm acopladas a la proteína VP6 y Nano partículas esféricas de oro de 40 nm a copladas a la proteína flagelina (Neonatos AuNp-VP6 0.5 μ g + AuNp-Flag 0.250 μ g, Adultos AuNp-VP6 1 μ g + AuNp-Flag 0.5 μ g)
4. Proteína VP6 (Neonatos 0.5 μ g, Adultos 1 μ g)
5. Flagelina (Neonatos 0.250 μ g, Adultos 0.5 μ g)
6. Proteína VP6 +Flagelina (Neonatos: VP6 0.5 μ g + Flagelina 0.250 μ g, Adultos VP6 1 μ g + Flagelina 0.5 μ g)
7. PBS.

Se realizaron 4 experimentos con inmunización en la etapa neonatal y 2 experimentos con la inmunización en la etapa adulta. En cada experimento, se inmunizaron 3 ratones por tratamiento. En los ratones vacunados en la etapa de adultos, antes de la primera inmunización se tomaron muestras de sangre para poder extraer el suero, que se guardó a -70°C, para su futuro uso. Sin embargo, en ratones neonatos no se pudo realizar esta extracción del suero debido al tamaño tan pequeño de los neonatos. La segunda dosis se administró después de 21 días con los mismos tratamientos y las mismas cantidades de proteína. Tanto en ratones adultos como en ratones neonatos se extrajo sangre para la

obtención del suero antes de la segunda inmunización. Previo al reto se volvió a extraer sangre para la obtención del suero. El reto con el virus fue 21 días después de la segunda inmunización con los diferentes tratamientos antes mencionados. El reto se realizó con la cepa de rotavirus EDIM a 50 veces la dosis infectiva (50 DI). La infección y colectas de muestra de heces fue monitoreada por un periodo de 8 días después del reto con el virus. En las heces se evaluó la carga viral y la producción de IgA contra rotavirus.

El suero se utilizó para evaluar la producción del anticuerpo sérico anti-RV.

Mediante ELISA se realizó la evaluación de la carga viral en heces.

En la figura 15 se muestran los resultados en los que se utilizaron tanto el antígeno (VP6) como el adyuvante (flagelina) en solución. Más adelante se presentará la figura del efecto de las nanopartículas. Como puede verse en la parte superior de la figura 15, las cargas virales todos los tratamientos van a ser comparados con respecto a el tratamiento de PBS, y el tratamiento de VP6/flagelina se va a comparar con sus respectivos controles ya sea VP6 ó Flagelina.

En los ratones inmunizados en la etapa neonatal (a) podemos observar lo siguiente:

Con el tratamiento de PBS se presentó una curva clásica de excreción viral en las heces, donde se observó que a partir del segundo día se incrementa la excreción del virus en las heces, manteniéndose hasta el día 6, a partir del cual se observó una disminución del virus excretado, para desaparecer por completo al día 8. En los ratones tratados con VP6 ó flagelina separados se observó también una disminución del virus excretado a partir del día 2 y desapareciendo el día 7. En los ratones tratados con VP6 + flagelina se observó una mayor disminución en la excreción de virus en las heces a partir del día 2 post infección, desapareciendo por completo al día 6 post infección con respecto al control.

En los ratones en los que la inmunización se realizó en la etapa adulta (15 b), no hubo ningún efecto de los tratamientos en la carga viral en heces. Estos resultados sugieren que la flagelina y el antígeno VP6 tienen un efecto específico cuando se inmuniza en la etapa neonatal que no aplica a la etapa adulta de los ratones. Esto pudiera deberse a una mayor capacidad de los linfocitos neonatales estimulados de llegar a la mucosa intestinal, ver discusión.

En la parte inferior de la figura 15, se muestra el efecto de las nanopartículas en los ratones inmunizados en la etapa neonatal (15 a) ó en la etapa adulta (15 b). Para los primeros, podemos ver que en los ratones tratados con AuNp-VP6 ó AuNp-flag se observó que durante los 8 días de infección hubo una disminución en la excreción del virus en heces,

siendo significativa con una $p < 0.05$ a partir del día 2 comparado con respecto a los ratones tratados con PBS, sin embargo, no fue significativa la diferencia con respecto a los ratones tratados con las proteínas solubles (parte superior de la figura). En el tratamiento con AuNp-VP6+AuNp-Flag se observó disminución en la carga viral a partir del día 6 post infección y desapareciendo por completo al día 7 post infección con respecto al control, pero sorprendentemente, la carga viral fue superior que los ratones en los que se trataron con las proteínas acopladas a nanopartículas por separado.

En los ratones tratados en la etapa adulta parte superior de la figura 15 (b) no se observó disminución de la excreción del virus en heces, con ningún tratamiento.

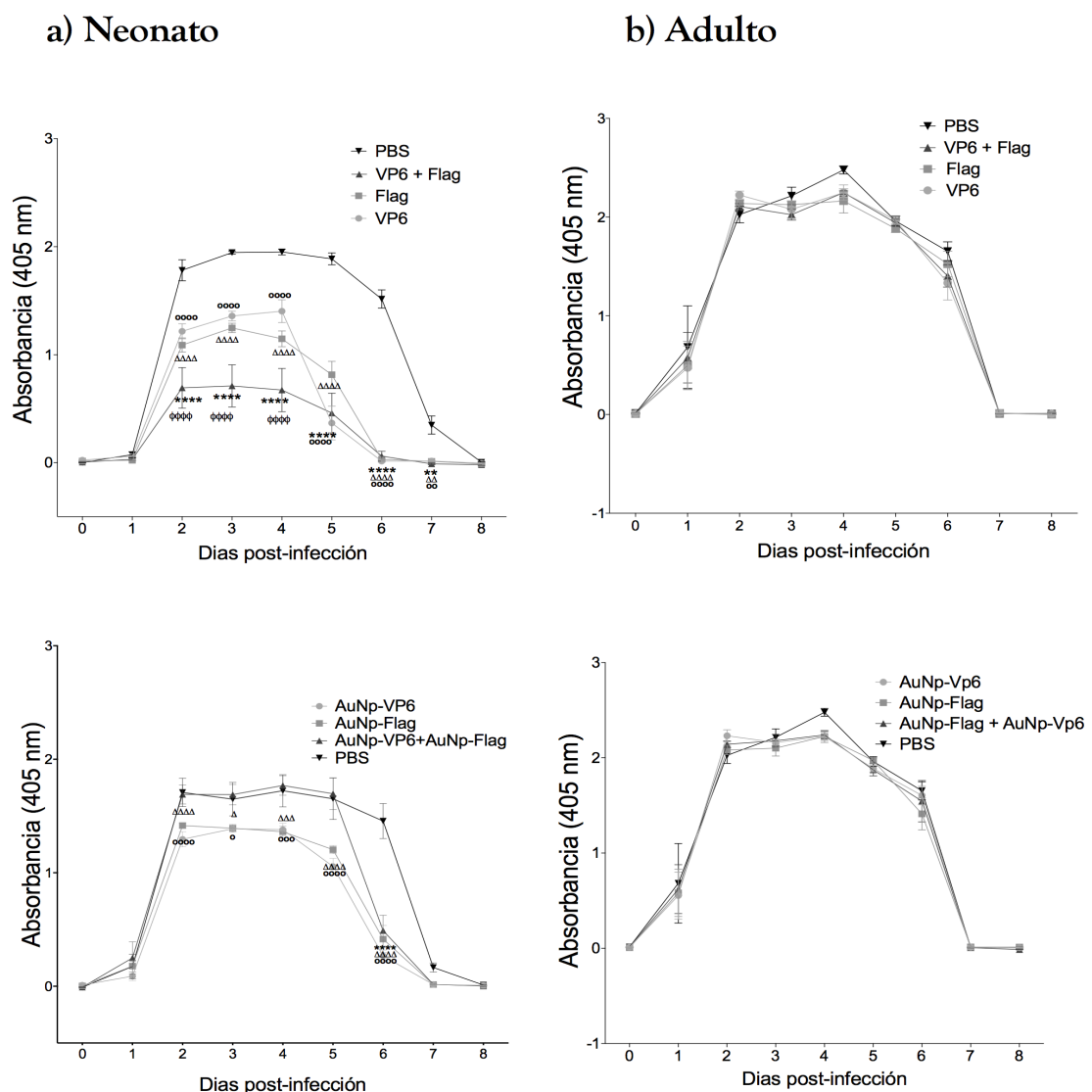


Figura 15: Flagelina + VP6 disminuyen la carga viral en ratones vacunados en la etapa neonatal. Inoculación i.p. de dos dosis de flagelina y/o AuNp-Flag como adyuvante más el antígeno de VP6 y/o AuNp-VP6 confiere protección a nivel intestinal. Los ratones fueron retados al día 49 de edad con rotavirus EDIM y la carga viral fue evaluada en heces desde el día 0 hasta el día 8 mediante Elisa. En el panel a) 4

experimentos independientes, *, Δ y ϕ indican los que son estadísticamente significativos con respecto al tratamiento de PBS, ϕ indica la estadística del grupo tratado con VP6/flagelina con respecto al grupo solo tratado con PV6.

Para realizar el análisis de los niveles de protección, se calculó el promedio del área bajo la curva de excreción del virus. En la figura 16 se muestran los resultados. Podemos observar, que en los cebados en la etapa neonatal (a), las proteínas VP6 ó Flagelina llegaron a un 34.4% y 25.76% de protección, respectivamente y cuando se administraron juntas, a un 22.47% cuando estuvieron asociadas a nanopartículas, es decir que el efecto de las nanopartículas no fue estimulatorio, sino parecería más bien inhibitorio ya que las proteínas solubles generaron una mayor protección observamos que los ratones tratados con las proteínas solubles VP6 o flagelina, por separado, generaron una protección de alrededor del 50%, y en conjunto, Flagelina más VP6 generaron en promedio una reducción de la curva de excreción viral de 81.92% comparado con el grupo de ratones vacunados solo con PBS.

A diferencia de los ratones neonatos, en los ratones inmunizados en la etapa adulta no se observaron grandes diferencias en el promedio del área bajo la curva. Los grupos presentan promedios de 2.65-9% de protección en comparación con el tratamiento con PBS.

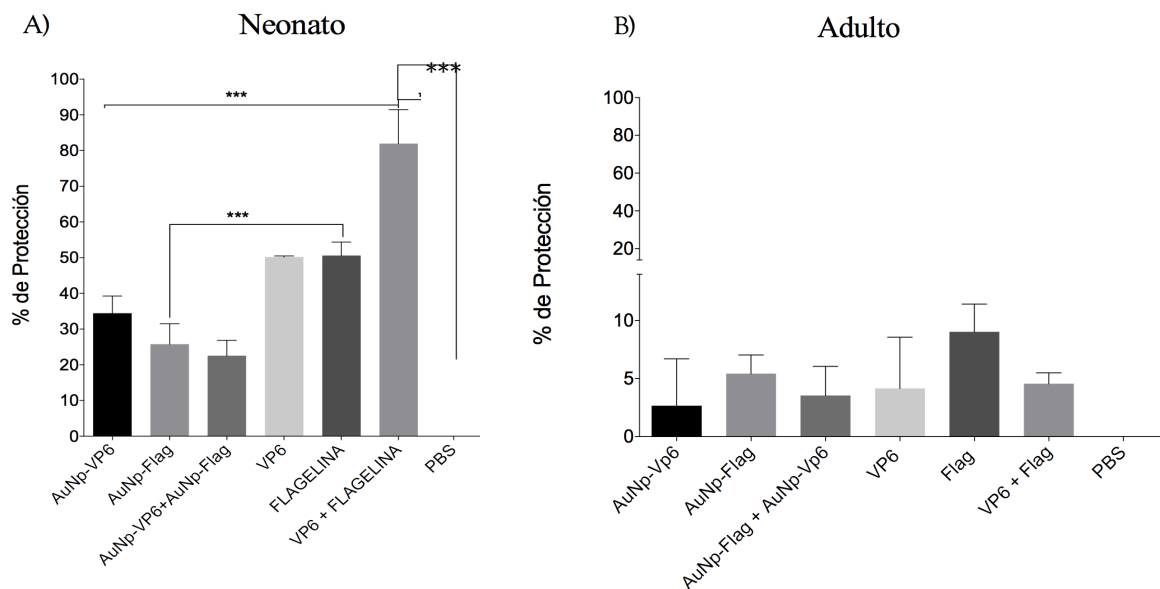


Figura 16. Flagelina + VP6 protegen en un 81.92% a los ratones vacunados al día 7 de edad. Para obtener el porcentaje de protección se tomo en cuenta el promedio debajo

la curva de infección. La estadística fue evaluada con respecto al PBS y entre tratamientos.

Enseguida, determinamos los niveles de IgA anti-RV intestinales para cada uno de los tratamientos, usando el sobrenadante de las heces. En la figura 17 se puede observar la evaluación de la IgA. Los ratones que fueron inmunizados en la etapa neonatal (17 a) podemos observar, que en los ratones tratados con PBS la curva clásica de producción de IgA ante la infección por rotavirus. Este mismo patrón de curva se observa para los ratones tratados con flag/VP6 y VP6, y no hay cambios estadísticamente significativos con respecto a los ratones tratados con PBS. Sin embargo, se observó que la flagelina indujo la producción sutil que alcanza ser significativa de IgA anti-RV a partir del día 5 post infección, llegando a su máximo al día 8 comparado con respecto al PBS. En la parte inferior de la figura 17 se muestran los resultados de las evaluaciones con las proteínas asociadas a nanopartículas. En los ratones inmunizados en la etapa neonatal (17 a), se observa que los ratones tratados con AuNp-VP6 tienen una curva de producción de la IgA muy similar a la curva de los ratones tratados con PBS. En ratones vacunados con AuNp-flagelina en la etapa neonatal, se observó un aumento significativo en la secreción de la IgA anti-RV a partir del día 7 post infección con un máximo al día 8 post infección. Con el tratamiento de AuNp-flag/AuNp-VP6 no se observó un aumento significativo en la producción de la IgA, salvo la que es dada por la infección. En ratones adultos (17 b), con los diferentes tratamientos se observó la misma curva de producción de IgAs anti-RV. No se observan diferencias con respecto al control PBS. Lo mismo aplicó a las proteínas administradas acopladas a las nanopartículas.

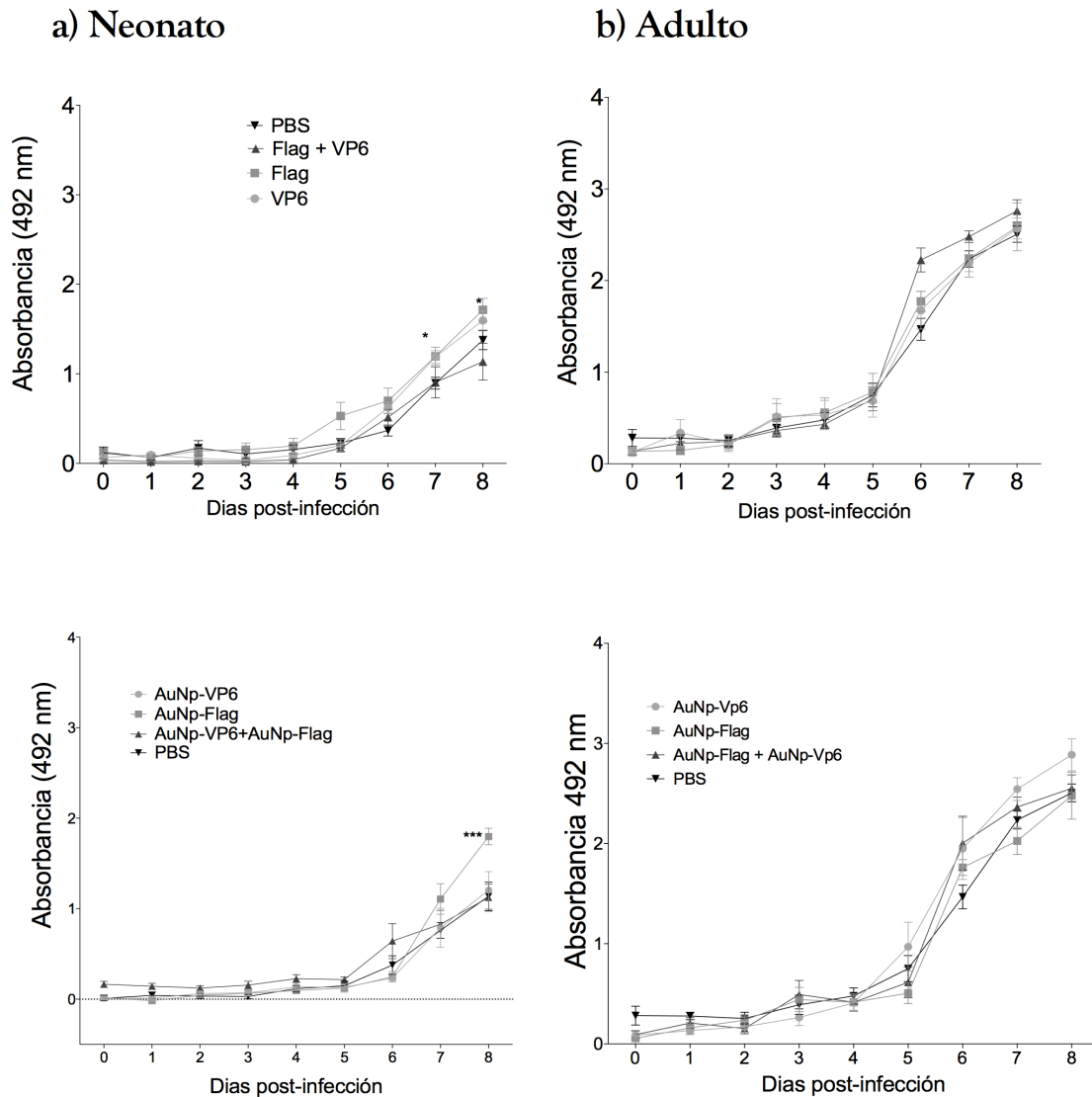


Figura 17. Detección de anticuerpos IgA anti-rotavirus en el sobrenadante de heces de ratones infectados. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al tratamiento con PBS.

Para evaluar los anticuerpos séricos contra RV, se realizó un ensayo de Elisa de captura utilizando lisados de células MA-104 infectadas con rotavirus RRV como antígeno. En la figura 18 se muestran estas evaluaciones. En los ratones inmunizados en la etapa neonatal (18 a) no se obtuvo el suero antes de la primera inmunización debido a que el tamaño del ratón neonato es muy pequeño, se convierte muy complicado sangrar. Sólo se pudo obtener suero antes de la segunda inmunización al día 27 de edad del ratón (tiempo cero) y antes de la infección al día 47 edad del ratón (tiempo uno). En la gráfica superior se observan los ratones tratados solo con las proteínas solubles, y se encontró que los ratones tratados solo con VP6 aumentaron la producción de IgG anti-RV al tiempo uno,

comprado con su control el tiempo cero. Así mismo en los ratones tratados con flagelina, se observó que al tiempo uno aumentó la producción de IgG anti-RV comparado con respecto al tiempo cero. Tanto el tratamiento con VP6 ó flagelina son estadísticamente significativos. Ratones tratados con VP6 más flagelina, se observó un aumento en la producción de la IgG anti-RV al tiempo uno, comparado con el tiempo cero, este aumento no alcanzó a ser estadísticamente significativo. En el panel inferior se muestran a los ratones tratados con las proteínas acopladas a nanopartículas. Tanto en los tratamientos con AuNp-VP6 ó AuNp-Flagelina, no se observaron cambios entre los dos tiempos. En cambio, con el tratamiento AuNp-VP6 más AuNp-flagelina se observó un aumento en la producción de IgG anti-RV al tiempo uno comparado con el tiempo cero.

En la figura 18 panel b se observan a los ratones inmunizados en la etapa adulta. con tres tiempos diferentes 28 días de edad (tiempo cero), 49 días de edad (tiempo uno) y 70 días de edad (tiempo dos). En la parte superior se muestran los ratones tratados con proteínas solubles. Se observó que con el tratamiento de VP6 hay incremento en la producción del IgG anti-RV al tiempo uno y al tiempo dos comparados con el tiempo cero, y este aumento es estadísticamente significativo. En los ratones tratados con flagelina, se observó un aumento en la producción de IgG anti-RV al tiempo uno y al tiempo dos, comparado con respecto al tiempo cero, alcanzando significancia estadística. También se observó que en el tiempo dos hay más IgG anti-RV comparado con respecto al tiempo uno, siendo este aumento estadísticamente significativo. En los ratones tratados con VP6 más flagelina se encontró más producción de IgG al tiempo uno y al tiempo dos, comparados con respecto al tiempo cero, siendo estos cambios estadísticamente significativos. Y en los ratones tratados con PBS no se observaron cambios. En la parte inferior de la figura 18 b, se muestran los ratones tratados con las proteínas acopladas a nanopartículas. En los ratones tratados con AuNp-VP6 se observó un aumento en la producción de IgG anti-RV a los tiempos uno y dos, comparados con respecto al tiempo cero. También se observó un aumento en la producción de IgG anti-RV en el tiempo dos comparado con el tiempo uno. Todos estos datos tienen significancia estadística. En los ratones tratados con AuNp-flag se observó un aumento en la producción de IgG anti-RV a los tiempos uno y dos, comparados con respecto al tiempo cero. También se observó aumento en la producción de IgG anti-RV en el tiempo dos comparado con el tiempo uno alcanzando a tener significancia estadística. En los ratones tratados con AuNp-VP6 más AuNp-flag se observó en ratones adultos un comportamiento similar a los tratamientos por separado, nuevamente alcanzando diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados nos

indican que en ratones neonatos y adultos las nanoparticulas favorecen la producción de anticuerpo sérico,

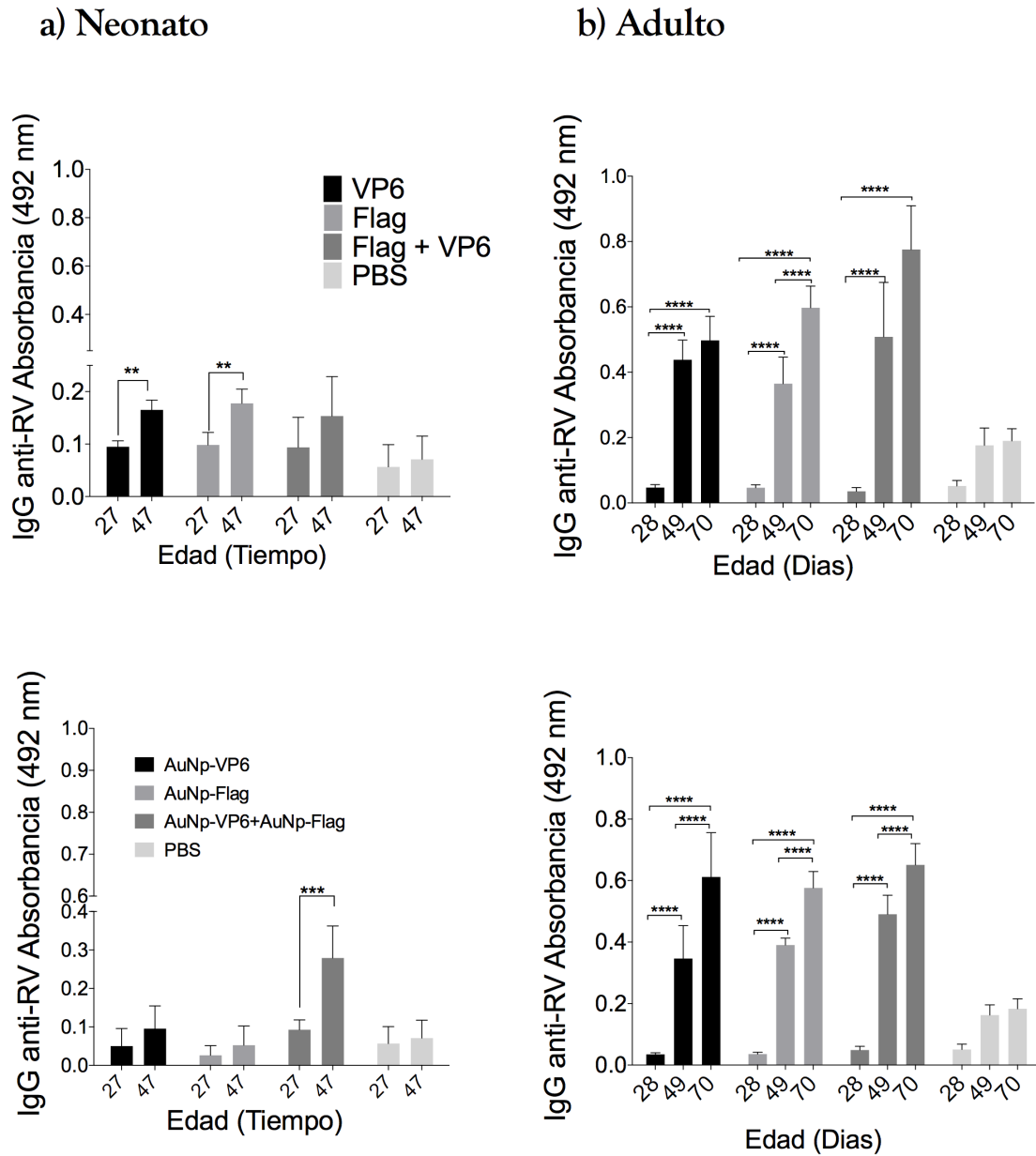


Figura 18 Los niveles de anticuerpos séricos anti-RV incrementa conforme se aplicaron las inmunizaciones. En los ratones neonatos la primera barra indica obtención del suero al día 27 edad en días del ratón (tiempo 0), día 47 de edad del ratón (tiempo 1) antes de la primera inmunización. En el caso de los ratones inmunizados en la etapa adulta la primera barra indica obtención del suero antes de la primera inmunización día 28 de edad del ratón (tiempo cero), segunda barra (tiempo 1) 49 días edad del ratón antes de la

segunda inmunización, y la tercera barra (tiempo 2) 70 días edad del ratón, antes de la infección por rotavirus EDIM.

8.- Discusión

Las vacunas rutinariamente son probadas en adultos jóvenes sanos, aunque se usan principalmente para proteger a bebés y personas mayores. Los linfocitos T neonatales necesitan un fuerte estímulo co-estimulador para responder, por lo que la correcta elección del adyuvante se vuelve muy importante para mejorar la respuesta y la memoria inmune de las células neonatales durante la vacunación. Esto es particularmente relevante para los patógenos intracelulares, en los que se requiere una memoria Th1. Varias vacunas aplicadas a bebés no inducen una respuesta Th1 adecuada y se necesitan múltiples potenciadores para mantener una respuesta neutralizante de anticuerpos [36]. Anteriormente se ha demostrado que la flagelina puede ser un adyuvante para la activación de las células T [14, 28]. Aquí mostramos que la flagelina en dosis bajas fue suficiente para inducir un perfil Th1 directamente en linfocitos T CD4⁺ vírgenes de recién nacidos y adultos. Estudios previos han demostrado que las células neonatales tienen una producción muy baja de IL-12 e IFN- γ debido a mecanismos epigenéticos. La producción de IL-12 alcanza niveles parecidos a los del adulto hasta que los niños tienen 12 años de edad [30, 36]. Por lo tanto, es notable que las señales de flagelina son capaces de cruzar el umbral alto para la expresión de los genes de la IL-12 e IFN- γ en las células neonatales [37], lo que lleva a la producción de IL-12 e IFN- γ en una proporción similar a los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de adultos. Esto justifica el interés en la flagelina como potencial adyuvante en nuevos prototipos de vacunas, en las que las células protectoras son poblaciones Th1. Además, se demostró que el tratamiento con flagelina modificaba el perfil Th1 / Th2, al disminuir la expresión de IL-4 de las células Th2 y aumentar la producción de IFN- γ de la población Th1. Esto sugiere que el uso de flagelina podría desempeñar un papel en nuevos tratamientos para modificar este perfil Th1 en casos de alergia, o patógenos que median su patogenicidad induciendo una respuesta Th2.

Recientemente se generó en el laboratorio un modelo computacional dinámico para la señalización de TLR5 y su comunicación cruzada con un modelo de señalización de TCR en linfocitos T CD4⁺ (Rodríguez-Jorge, en proceso). Es claro que a partir del modelo en

conjunto, la flagelina es capaz de activar AP-1, NF κ B y CREB, utilizando una vía independiente a la del TCR, que se encuentra bloqueada en las células neonatales, lo que conduce a una baja respuesta AP-1 en respuesta al TCR [38]. Esto podría ser responsable de la baja respuesta de estas células. La participación de la vía a través del TLR5 en la activación de AP-1 podría ser responsable de la alta respuesta de los linfocitos T CD4⁺ a la flagelina.

Para favorecer una mejor respuesta a una menor dosis, se acopló tanto la flagelina como la VP6 a nanopartículas de oro esféricas de 40 nm (AuNp-flag ó AuNp-VP6). *In vitro* los resultados con las nanopartículas acopladas a las proteínas se obtuvieron resultados donde se mostró que AuNp-Flag más AuNp-VP6 favorece la respuesta proinflamatoria a menores dosis. Sin embargo, no fue así en el modelo *in vivo*, donde las proteínas asociadas a nanopartículas fueron menos inmunogénicas que las proteínas solubles. Es posible que la vía de administración intraperitoneal generó un procesamiento diferente en las proteínas acopladas a nanopartículas que bajó su antigenicidad. Sería interesante probar el efecto de las proteínas asociadas a nanopartículas por otras vías de inmunización, como la intranasal o intradérmica. Lamentablemente, en nuestras manos, la inmunización intradérmica causó que las madres mataran a los ratones neonatos vacunados y no se pudo evaluar esta vía. Algo que llamó nuestra atención fue que el tratamiento con las nanopartículas de VP6 y con flagelina, generaran una respuesta aún menor, cuando se esperaba una sinergia. Esto se podría deber a que ambos tipos de nanopartículas pudieran estar compitiendo por ser presentados como antígeno, ya que se sabe que el TLR5 que su ligando es flagelina tiene la capacidad de endocitar y procesar a la flagelina para que sea presentada como antígeno. Entonces, una probabilidad sería que la proteína VP6 y la flagelina estén compitiendo para ser presentadas[71]. Encontramos que a dosis bajas de VP6 y flagelina en un protocolo de vacunación neonatal proporcionaron un 80% de protección contra la infección por rotavirus.

No encontramos una correlación en la producción de anticuerpos con la protección. Aunque los ratones adultos mostraron una inducción de niveles más altos de anticuerpos séricos, lo que indica una respuesta inmune sistémica [33], no hubo protección. Se ha visto que dosis incluso más altas de VP6 no confieren protección en ratones adultos, a menos que se dirijan con DEC205 o directamente a los tejidos de la mucosa [28, 33, 39]. Se probaron varios adyuvantes para tratar de conferir protección en una vacuna oral sin resultados [40]. En trabajos previos, se ha reportado que la protección en modelos de vacunación contra rotavirus usando VP6 como inmunógeno no está dada por anticuerpos,

sino por inmunidad celular, con un rol particularmente importante de los linfocitos T CD4⁺.

Encontramos una protección específica de nuestros ensayos *in vivo* en ratones vacunados en la etapa neonatal que fue de arriba del 80% cuando se administraron el antígeno VP6 y la flagelina, por administración parenteral. Una posible explicación podría ser que la células neonatales expresan más moléculas de direccionamiento a la mucosa intestinal, como CCR9 [41] o la inducción de $\alpha 4 \beta 7$ en respuesta IL-7 [42, 43]. Esto permitiría que los linfocitos T neonatales activados migren hacia el intestino, confirmando protección como cuando los antígenos son direccionados con moléculas como DEC205.

Las células linfoides innatas (ILC) están involucradas en la protección de la infección por rotavirus, a través de la inducción de IFN- λ [44, 45]. Un perfil particular de las ILCs se encuentra mayormente expresados en los recién nacidos, en el cual estas células están involucradas en la generación de un repertorio diverso de linfocitos T [46]. Es posible que las ILC neonatales sean importantes para el priming de los linfocitos T a través de la activación de células dendríticas y la secreción de IFN- λ . También es posible una alta respuesta de los linfocitos T CD8⁺ neonatales a la flagelina, porque tienen una expresión de TLR5 más alta que las células adultas [4]. Se necesita más investigación para aclarar estos puntos. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la respuesta a flagelina *in vivo* es diferente en neonatos y adultos y apuntan a la necesidad de una mejor comprensión de la respuesta inmune en neonatos, de modo que sea posible diseñar prototipos de vacunas eficaces dirigidas a los lactantes. En conjunto, nuestros resultados muestran que la flagelina podría ser un buen candidato para vacunas de patógenos intracelulares dirigidas a neonatos y niños pequeños.

9.- Conclusiones

- En linfocitos T neonatales de neonatos la flagelina, ligando del TLR5, induce tanto la transcripción como la expresión de IFN-g. Favoreciendo un perfil Th1.
- La flagelina disminuye la producción de la IL-4 en el perfil efector Th2, probablemente este efecto favorezca hacia un perfil proinflamatorio.
- Se logró purificar la proteína VP6 de rotavirus con un gran rendimiento.
- La VP6 asociada a nanopartículas incrementó la proliferación de las células raw 264.7, indicando que esta combinación no afecta la viabilidad celular.

- La flagelina sola tuvo un efecto inhibitorio sobre la proliferación inducida por AuNP-VP6, pero no al estar asociada a nanopartículas.
- Se observó un efecto adyuvante de AuNp-Flag sobre AuNpVP6 a la menor concentración de antígeno utilizada
- La combinación de los estímulos dados por AuNP-VP6 y AuNp-Flag incrementa la producción de algunas citocinas como IL-1 β , IL-6. Favoreciendo la activación del inflamosoma. Esto sugiere que esta combinación de antígenos pudiera favorecer el perfil Th17 sin embargo para concluir esto necesitamos evaluar otras citocinas como la IL-23, IL-21, TGF- β y la IL-17.
- El estímulo dado por AuNP-VP6 favorece el incremento de las citocinas como IL-12p70, IFN- γ , IL-2 e IL-10.
- El estímulo dado por AuNP-Flag favorece el incremento de las citocinas como IFN- γ e IL-10.
- La flagelina parece promover mayormente la expresión de la IL-12 en CBMCs
- La vacuna con VP6 y Flagelina a bajas dosis aplicada en un periodo neonatal generan una protección del 81 % ante una infección con rotavirus.
- La vacuna con VP6 y Flagelina a bajas dosis en el modelo murino adulto no genera una protección ante el reto por rotavirus EDIM.

10.- Bibliografía

- [1] A. k. A. A. H. L. S. Pillai, “Cellular and Molecular Immunology.” Elsevier Saunders, 2010.
- [2] A. Iwasaki and R. Medzhitov, “Regulation of adaptive immunity by the innate immune system.,” *Science*, vol. 327, no. 5963, pp. 291–5, Jan. 2010.
- [3] M. Pepper and M. K. Jenkins, “Origins of CD4+ effector and central memory T cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 131, no. 6, pp. 467–471, Jun. 2011.
- [4] C. A. H. P. Bona, “Neonatal Immunity,” *Hum. Press*, vol. 1 ed, 2005.
- [5] J. I. Borissoff and H. ten Cate, “From neutrophil extracellular traps release to thrombosis: an overshooting host-defense mechanism?,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, no. 9, pp. 1791–4, Sep. 2011.
- [6] E. a Diget *et al.*, “Characterization of HIV-1 infection and innate sensing in different types of primary human monocyte-derived macrophages.,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, pp. 1–11, Jan. 2013.
- [7] Y. Li, “Modulating Innate Immune Response to Combat Viral Infections-Use HCV as an Example,” *J. Antivir. Antiretrovir.*, vol. 05, no. 03, pp. 5–6, 2013.
- [8] S. D. Kobayashi and F. R. DeLeo, “Systems Biology and Innate Immunity,” *J. Innate Immun.*, vol. 5, no. 2, pp. 97–99, 2013.
- [9] J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, O. Garraud, and F. Cognasse, “Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways.,” *Br. J. Haematol.*, vol. 151, no. 1, pp. 89–92, Oct. 2010.
- [10] D. Werling, O. C. Jann, V. Offord, E. J. Glass, and T. J. Coffey, “Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition.,” *Trends Immunol.*, vol. 30, no. 3, pp. 124–30, Mar. 2009.
- [11] C. C. Lee, A. M. Avalos, and H. L. Ploegh, “Accessory molecules for Toll-like receptors and their function.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 3, pp. 168–79, Mar. 2012.
- [12] B. Jin, T. Sun, X.-H. Yu, Y.-X. Yang, and A. E. T. Yeo, “The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation.,” *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2012, no. Figure 1, p. 836485, Jan. 2012.
- [13] K. Yang, G. Neale, D. R. Green, W. He, and H. Chi, “The tumor suppressor Tsc1 enforces quiescence of naive T cells to promote immune homeostasis and function.,” *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 9, pp. 888–97, Sep. 2011.
- [14] G. W. Litman, J. P. Rast, and S. D. Fugmann, “The origins of vertebrate adaptive immunity,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 8, pp. 543–553, 2010.
- [15] S. Nakayamada, H. Takahashi, Y. Kanno, and J. J. O’Shea, “Helper T cell diversity and plasticity.,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 24, no. 3, pp. 297–302, Jun.

2012.

- [16] L. Zhou, M. M. W. Chong, and D. R. Littman, "Review Plasticity of CD4 + T Cell Lineage Differentiation," *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 646–655, 2009.
- [17] A. R. Maceiras, V. R. Fonseca, A. Agua-Doce, and L. Graca, "T follicular regulatory cells in mice and men," *Immunology*, vol. 152, no. 1, pp. 25–35, 2017.
- [18] J. Zhu, H. Yamane, and W. E. Paul, "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*).," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 28, no. December 2009, pp. 445–489, 2010.
- [19] M. Pepper and M. K. Jenkins, "Origins of CD4+ effector and central memory T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 131, no. 6, pp. 467–471, Jun. 2011.
- [20] Y. K. Lee, R. Mukasa, R. D. Hatton, and C. T. Weaver, "Developmental plasticity of Th17 and Treg cells.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 21, no. 3, pp. 274–80, Jun. 2009.
- [21] E. G. Schulz, L. Mariani, A. Radbruch, and T. Höfer, "Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12.," *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 673–83, May 2009.
- [22] B. Zygmunt and M. Veldhoen, *T Helper Cell Differentiation: More than Just Cytokines*, vol. 109. 2011.
- [23] T. Hoyler, C. a Connor, E. a Kiss, and A. Diefenbach, "T-bet and Gata3 in controlling type 1 and type 2 immunity mediated by innate lymphoid cells.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 25, no. 2, pp. 139–47, Apr. 2013.
- [24] J. J. O. Shea *et al.*, "Signal transduction and Th17 cell differentiation," *Microbes Infect.*, vol. 11, no. 5, pp. 599–611, 2009.
- [25] A. Visperas, J. Do, and B. Min, "Cellular factors targeting APCs to modulate adaptive T cell immunity," *J. Immunol. Res.*, vol. 2014, 2014.
- [26] A. Suto *et al.*, "Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 6, pp. 1369–79, Jun. 2008.
- [27] S. Nakayamada *et al.*, "Early Th1 cell differentiation is marked by a Tfh cell-like transition.," *Immunity*, vol. 35, no. 6, pp. 919–31, Dec. 2011.
- [28] A. Manuscript, "Identification of T helper Type 1-like, Foxp3 regulatory T cells in human autoimmune disease," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 6, pp. 673–675, 2011.
- [29] A. N. Hegazy *et al.*, "Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)-T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions.," *Immunity*, vol. 32, no. 1, pp. 116–28, Jan. 2010.
- [30] a Marchant and M. Goldman, "T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn?," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 141, no. 1, pp. 10–8, Jul. 2005.

- [31] G. Millman, "Neonatal immunity," *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.*, vol. 90, no. 4, pp. F352-f352, Jul. 2005.
- [32] M. Mccarron and D. J. Reen, "Activated Human Neonatal CD8 T Cells Are Subject to Immunomodulation by Direct TLR2 or TLR5 Stimulation," *J. Immunol.*, vol. 182, pp. 55–62, 2009.
- [33] D. C. Hodgins and P. E. Shewen, "Vaccination of neonates : Problem and issues," *Vaccine*, vol. 30, no. 9, pp. 1541–1559, 2012.
- [34] S. J. Opiela, T. Koru-sengul, and B. Adkins, "Murine neonatal recent thymic emigrants are phenotypically and functionally distinct from adult recent thymic emigrants," *Methods*, vol. 113, no. 22, pp. 5635–5643, 2009.
- [35] V. J. Philbin and O. Levy, "implications for neonatal and infant vaccine development," *Pediatr. Res.*, vol. 65, no. 2, pp. 1–17, 2010.
- [36] S. Vanden Eijnden, S. Goriely, D. De Wit, M. Goldman, and F. Willems, "Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 36, no. 1, pp. 21–6, Jan. 2006.
- [37] M. Prabhudas *et al.*, "Challenges in infant immunity : implications for responses to infection and vaccines," *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 3, pp. 189–194, 2011.
- [38] D. C. Hodgins and P. E. Shewen, "Vaccination of neonates: problem and issues.," *Vaccine*, vol. 30, no. 9, pp. 1541–59, Feb. 2012.
- [39] S. Ygberg and A. Nilsson, "The developing immune system - from foetus to toddler.," *Acta Paediatr.*, vol. 101, no. 2, pp. 120–7, Feb. 2012.
- [40] P. a Velilla, M. T. Rugeles, and C. a Chougnet, "Defective antigen-presenting cell function in human neonates.," *Clin. Immunol.*, vol. 121, no. 3, pp. 251–9, Dec. 2006.
- [41] S. Basha, N. Surendran, and M. Pichichero, "Immune responses in neonates," *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 10, no. 9, pp. 1171–1184, 2014.
- [42] S. L. Zhang and A. Bhandoola, "Losing TREC with age.," *Immunity*, vol. 36, no. 2, pp. 163–5, Feb. 2012.
- [43] I. den Braber *et al.*, "Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans.," *Immunity*, vol. 36, no. 2, pp. 288–97, Feb. 2012.
- [44] S. Kadereit *et al.*, "Reduced NFAT1 protein expression in human umbilical cord blood T lymphocytes.," *Blood*, vol. 94, no. 9, pp. 3101–7, Nov. 1999.
- [45] A. O. Galindo-Albarrán *et al.*, "CD8+T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response," *Cell Rep.*, vol. 17, no. 8, pp. 2151–2160, 2016.

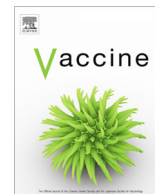
- [46] O. En and I. De, “Dra . María Angélica Santana Calderón,” 2018.
- [47] G. Delespesse *et al.*, “Maturation of human neonatal CD4 + and CDS + T lymphocytes into Th1 / Th2 effecters,” vol. 16, no. 14, pp. 1415–1419, 1998.
- [48] D. J. Reen, “Activation and functional capacity of human neonatal CD4 T-cells,” vol. 16, no. 14, pp. 1401–1408, 1998.
- [49] J. Hassan, D. J. R. Our, and S. Children, “Cord blood CD4 + CD45RA + T cells achieve a lower magnitude of activation when compared with their adult counterparts,” pp. 397–401, 1997.
- [50] E. Hermann *et al.*, “Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response,” vol. 100, no. 6, pp. 2153–2159, 2018.
- [51] D. O. D. R. Ichman, N. O. G. Ruener, G. E. R. D. P. Ape, and A. N. W. Aters, “Memory CD8 + T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections,” pp. 379–385.
- [52] A. Pendleton *et al.*, “Impact of rotavirus vaccination in Australian children below 5 years of age: A database study.,” *Hum. Vaccin. Immunother.*, vol. 9, no. 8, pp. 1617–1625, Jun. 2013.
- [53] M. Rojas, “BIOLOGÍA MOLECULAR DE ROTAVIRUS : UNA MIRADA A TRAVÉS DE LA INTERFERENCIA DE RNA Margarito Rojas , Camilo Ayala-Breton y Susana López *,” vol. XXXII, pp. 149–162, 2008.
- [54] M. a Franco, J. Angel, and H. B. Greenberg, “Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines.,” *Vaccine*, vol. 24, no. 15, pp. 2718–31, Apr. 2006.
- [55] H. Jayaram, M. K. Estes, and B. V. V. Prasad, “Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication.,” *Virus Res.*, vol. 101, no. 1, pp. 67–81, Apr. 2004.
- [56] E. J. Kunkel and E. C. Butcher, “Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes.,” *Immunity*, vol. 16, no. 1, pp. 1–4, Jan. 2002.
- [57] R. L. Ward and M. M. McNeal, “VP6: A candidate rotavirus vaccine.,” *J. Infect. Dis.*, vol. 202 Suppl, pp. S101-7, Sep. 2010.
- [58] A. D. Maynard and E. D. Kuempel, “Airborne Nanostructured Particles and Occupational Health,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 7, no. 6, pp. 587–614, Dec. 2005.
- [59] P. V. Asharani *et al.*, “Investigations on the Structural Damage in Human Erythrocytes Exposed to Silver, Gold, and Platinum Nanoparticles,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 20, no. 8, pp. 1233–1242, Apr. 2010.
- [60] Y.-T. Wang, X.-M. Lu, F. Zhu, and M. Zhao, “The preparation of gold nanoparticles and evaluation of their immunological function effects on rats.,” *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 24, no. 1, pp. 885–92, Jan. 2014.

- [61] K. Niikura *et al.*, “Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo.,” *ACS Nano*, vol. 7, no. 5, pp. 3926–38, May 2013.
- [62] S. B. Mizel and J. T. Bates, “Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential.,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 10, pp. 5677–82, Nov. 2010.
- [63] B. Zhang *et al.*, “Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18,” *Science (80-.)*, vol. 346, no. 6211, pp. 861–865, Nov. 2014.
- [64] G. N. Milligan, “Adjuvants : making vaccines immunogenic,” pp. 93–108, 2015.
- [65] O. Levy, “Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. 5, pp. 379–90, May 2007.
- [66] B. Adkins, C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke, “Neonatal adaptive immunity comes of age.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 7, pp. 553–64, Jul. 2004.
- [67] A. F. McGettrick and L. a J. O’Neill, “Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis.,” *Br. J. Haematol.*, vol. 139, no. 2, pp. 185–93, Oct. 2007.
- [68] V. Hornung *et al.*, “Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides.,” *J. Immunol.*, vol. 168, no. 9, pp. 4531–7, May 2002.
- [69] K. A. Zarembek, P. J. Godowski, and E. Alerts, “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 Kol,” *J. Immunol.*, vol. 168, pp. 554–561, 2002.
- [70] M.-C. Michallet, G. Rota, K. Maslowski, and G. Guarda, “Innate receptors for adaptive immunity.,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 16, no. 3, pp. 296–302, Jun. 2013.
- [71] S. E. Letran, S. Lee, S. M. Atif, S. Uematsu, S. Akira, and S. J. Mccorley, “Frontline TLR5 functions as an endocytic receptor to enhance flagellin-specific adaptive immunity,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, pp. 29–38, 2011.
- [72] S. H. E. Kaufmann, “The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 5, no. 7, pp. 491–504, Jul. 2007.



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Flagellin is a Th1 polarizing factor for human CD4⁺ T cells and induces protection in a murine neonatal vaccination model of rotavirus infection

Rosario Guadalupe Labastida-Conde^a, Oscar Ramírez-Pliego^a, Mercedes Peleteiro-Olmedo^b, Delia Vanessa Lopez-Guerrero^c, Oscar Daniel Badillo-Godinez^d, María de Lourdes Gutiérrez-Xicoténcatl^e, Gabriela Rosas-Salgado^d, África González-Fernández^b, Fernando R. Esquivel-Guadarrama^d, M. Angélica Santana^{a,*}

^a Centro de Investigación en Dinámica Celular (IICBA), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^b Inmunología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO), Centro Singular de Investigación de Galicia, Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, Universidad de Vigo, Campus Universitario de Vigo, 36310 Vigo, Spain

^c Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^d Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^e CISEI Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2018

Received in revised form 29 May 2018

Accepted 3 June 2018

Available online xxxxx

Keywords:

Flagellin

Neonatal vaccines

CD4⁺ T cells

Rotavirus

TLR5

VP6

ABSTRACT

Neonates have an increased susceptibility to infections, particularly those caused by intracellular pathogens, leading to high morbidity and mortality rates. This is partly because of a poor response of neonatal CD4⁺ T cells, leading to deficient antibody production and a low production of IFN- γ , resulting in deficient elimination of intracellular pathogens. The poor memory response of human neonates has underpinned the need for improving vaccine formulations. Molecular adjuvants that improve the response of neonatal lymphocytes, such as the ligands of toll-like receptors (TLRs), are attractive candidates. Among them, flagellin, the TLR5 ligand, is effective at very low doses; prior immunity to flagellin does not impair its adjuvant activity. Human CD4⁺ and CD8⁺ T cells express TLR5. We found that flagellin induces the expression of IFN- γ , IL-1 β and IL-12 in mononuclear cells from human neonate and adult donors. When human naïve CD4⁺ T cells were activated in the presence of flagellin, there was high level of expression of IFN- γ in both neonates and adults. Furthermore, flagellin induced IFN- γ production in Th1 cells obtained from adult donors; in the Th2 population, it inhibited IL-4 cytokine production. Flagellin also promoted expression of the IFN- γ receptor in naïve CD4⁺ T cells from neonates and adults. To test the adjuvant capacity of flagellin *in vivo*, we used a murine neonate vaccination model for infection with rotavirus, a pathogen responsible for severe diarrhea in young infants. Using the conserved VP6 antigen, we observed an 80% protection against rotavirus infection in the presence of flagellin, but only in those mice previously primed in the neonatal period. Our data suggest that flagellin could be an attractive adjuvant for achieving a Th1 response.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Human neonates are highly susceptible to infections [1]. Immaturity of the neonatal immune system is thought to contribute to this problem [2,3]. Neonatal T cells have diminished proliferation rates, low production of cytokines and a distinctive transcriptome profile [2–6]. Despite their poor and immature immunity, neonatal

cells are, under conditions of strong stimulation, capable of a robust response. The type of antigen and the co-stimulatory molecules implicated in the activation are important for achieving a good response [2]. Vaccination in the neonatal period is important because neonatal mortality accounts for about 45% of all deaths in infants under five years old. In addition, in many geographical areas access to medical care is greater at this time than later in life [7,8]. Vaccines do not always confer an efficient and adequate memory response in the high-risk period of the first three months of life, particularly where intracellular pathogens require Th1 memory [9–11]; in some cases, however, it can be achieved [12]. The variability between different vaccines in inducing Th1

* Corresponding author at: Centro de Investigación en Dinámica Celular (IICBA) Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico.

E-mail address: santana@uaem.mx (M.A. Santana).

responses in young infants suggests that it is possible to improve infants' responses by providing the right adjuvants [13,14]. Ligands of the Toll-like receptors (TLR) are attractive candidates [13,15]. TLRs are mostly studied in antigen-presenting cells, but some of them are also expressed on B and T lymphocytes [16–18]. TLR2 and TLR5 promote proliferation and differentiation of T cells [14]; this could be very useful for achieving neonatal immune responses, given the immaturity of dendritic cells in neonates [19,20]. Flagellin, the TLR5 ligand, is an attractive candidate for use in human vaccines as it induces efficient antigen-specific responses against different virus and bacteria pathogens, even at low doses as 0.3 µg [21–27]. Here we show that flagellin induces a Th1 profile in human neonatal and adult CD4⁺ T cells. We also show that, when flagellin was used as an adjuvant for the conserved rotavirus antigen VP6, it conferred 80% protection against infection in a mouse rotavirus model, but only if mice were primed in the neonatal period. Rotavirus is a pathogen responsible for severe diarrhea in young infants, in which CD4⁺ T cell activation is very relevant [28,29]. Altogether, our data show that flagellin could be an attractive adjuvant in neonatal vaccine formulations when a Th1 memory is desired.

2. Materials and methods

2.1. Cells

Venous blood from the umbilical cords of healthy babies naturally delivered, was collected into sterile, endotoxin-free 50-mL polypropylene tubes (Corning), containing 500 µl of EDTA 0.5 M (Sigma-Aldrich) as anticoagulant. Informed consent was obtained from the mothers. The Ethical Committee of General Hospital "Jose G Parres" in Cuernavaca, Morelos, Mexico approved the protocol. Adult cells were obtained from Leukocyte Concentrates from Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea in Cuernavaca, Mexico. Mononuclear cells from adult peripheral blood (PBMC) or cord blood (CBMC) were isolated by density centrifugation over Lymphoprep (Axis-Shield). Total CD4⁺ T cells were then purified using CD4⁺ T cell enrichment cocktail (RosetteSep™ Stemcell Technologies) and 2 mL of erythrocytes from the same donor. To obtain naïve cells, we depleted memory cells using antibodies against anti-CD45RO (UCH-L1 TONBObios) and anti-CD44 (BJ18, BioLegend, San Diego, CA.). Cells were over 97% CD4⁺CD3⁺ and negative for CD45RO^{hi}. They were also over 96% CCR7⁺CD62L⁺ (Supplementary Fig. 1).

2.2. Cell stimulation

CD4⁺ T cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, commercial antibiotics (50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin) and 5% foetal calf serum. Cells were activated with 1 µg/mL anti-CD3 (for short CD3, OKT3; TONBO Biosciences) and 1 µg/mL anti-CD28 (for short CD28, CD28.2; TONBO Biosciences), cross-linked with 1 µg/mL goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) and incubated for 6 or 18 h under 5% CO₂ at 37 °C. Flagellin (50 ng/mL) (Salmonella typhimurium; InvivoGen) was added simultaneously as indicated.

2.3. Flow cytometry

For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 18 h; Brefeldin A 1X (BioLegend) was added during the last 6 h. Cells were permeabilized and incubated with the following antibodies: FITC-labelled anti-IFN-γ (4S.B3, BioLegend), PE labelled anti-IL-4 (8D4-8, BD Pharmingen), FITC labelled anti-IL-17 (eBio64DEC17, eBioscience). PE labelled anti-IL-10 (JES3-19F1, BD Pharmingen),

PE labelled anti-IL-13 (JES10-5A2 BD Pharmingen), Biotin anti-TGF-β (A75-3, BD Pharmingen) and FITC labelled streptavidin (BD Pharmingen). For cytokine receptors detection, cells were stimulated for 18 h and stained with phycoerythrin (PE)-labelled anti-IFN-γ R (GIR-208, BD Pharmingen, San Diego, CA) or PE-anti-IL-4R (3007, R&D Systems, Minneapolis, MN). Cells were fixed with 3.7% p-formaldehyde and fluorescence was evaluated with a FACScalibur or a FACS-canto II cytometers (BD). Th1 and Th2 cells were detected by staining with APC labelled anti-human CD183 (CXCR3 G025H7 Biolegend) and APC labelled anti-human CD194 (CCR4 L291H4 Biolegend) respectively, as previously described [30]. Analysis was performed with the FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR).

2.4. Real time PCR

After stimulation, cells were pelleted and lysed with TRIZOL Reagent (Invitrogen). Samples were stored at –80 °C before RNA isolation, which was performed according to the manufacturer's protocol. RNA (1 µg) was used to obtain cDNA, using RevertAid reverse transcriptase (Fermentas). Real-time PCR was quantified using TaqMan® Pre-Developed Assay Reagents (Applied Biosystems). Cytokine mRNA levels were obtained using the 2^{–ΔΔCt} method and normalized as related to those of GAPDH.

2.5. Viruses

Wild type murine RV EDIM virus [Mu/G3P10 (16)], kindly donated by Dr. Richard Ward (Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH), was grown *in vivo* in neonatal mice (3–5 days old) [31]. Pups were orally infected and the intestine collected 72 h later to generate homogenates. Aliquots of the homogenates were stored at –80 °C until used. The infectious dose *in vivo* (ID50) was determined using adult mice as previously described [32].

2.6. In vitro translation of VP6

To obtain purified rotavirus protein VP6, we used the Rapid Translation System (Roche Cat. No. 3 246 949), following the manufacturer's instructions. We used a pIVEX plasmid to provide the VP6ew >AAC58529.1 major capsid protein [Murine rotavirus] sequence, tagged with 6 histidines for easy purification of the protein. VP6 was purified in batches using a nickel resin, (the protein was tagged with 6 histidines (50%NI-NTA, QIAGEN)), as previously described [30]. VP6 was evaluated by western blot and its purity with PAGE, after Coomassie and silver staining (Supplementary Fig. 2).

2.7. Animals and immunization protocol

Neonate (7d) and adult (28d) female BALB/c mice (H-2d) were immunized by intraperitoneal injection. Mice were housed in an isolation system (NUAIRE The AireGard™ ES (Energy Saver) NU-201 following the institution welfare guidelines, with standard 12 h light/12 h dark conditions, with food and water ad libitum. For each of the four experiments, groups of 3 neonate female mice were primed with PBS, Flagellin (0.25 µg), HIS-VP6 (0.5 µg) or flagellin + HIS-VP6. For experiments with adult mice, animals were primed with 0.5 µg of flagellin and 1 µg of HIS-VP6. A second immunization was performed 21 days after priming, repeating the initial antigen and adjuvant concentrations. In mice primed as adults, the experiment was repeated twice, with 3 mice per group for each treatment per experiment.

2.8. ELISA assays

Mice were challenged 21 days after the second immunization. Before infection, mice were given (by gavage) 100 μ l of 1.3% (w/v) NaHCO_3 to neutralize gastric acids; 5 min later they were given (by gavage) 100 μ l DMEM (without serum) containing 1×10^4

focus forming units (ffu) of Rotavirus EDIMwt (100 times ID50) [30,33]. Infection was monitored in faeces collected every 24 h from day 0 (before challenge) up to day 8. Sera were collected before immunizations and challenge. Samples were centrifuged and stored at -80°C . Virus load, in homogenized faeces, was measured by ELISA assay as previously described [33].

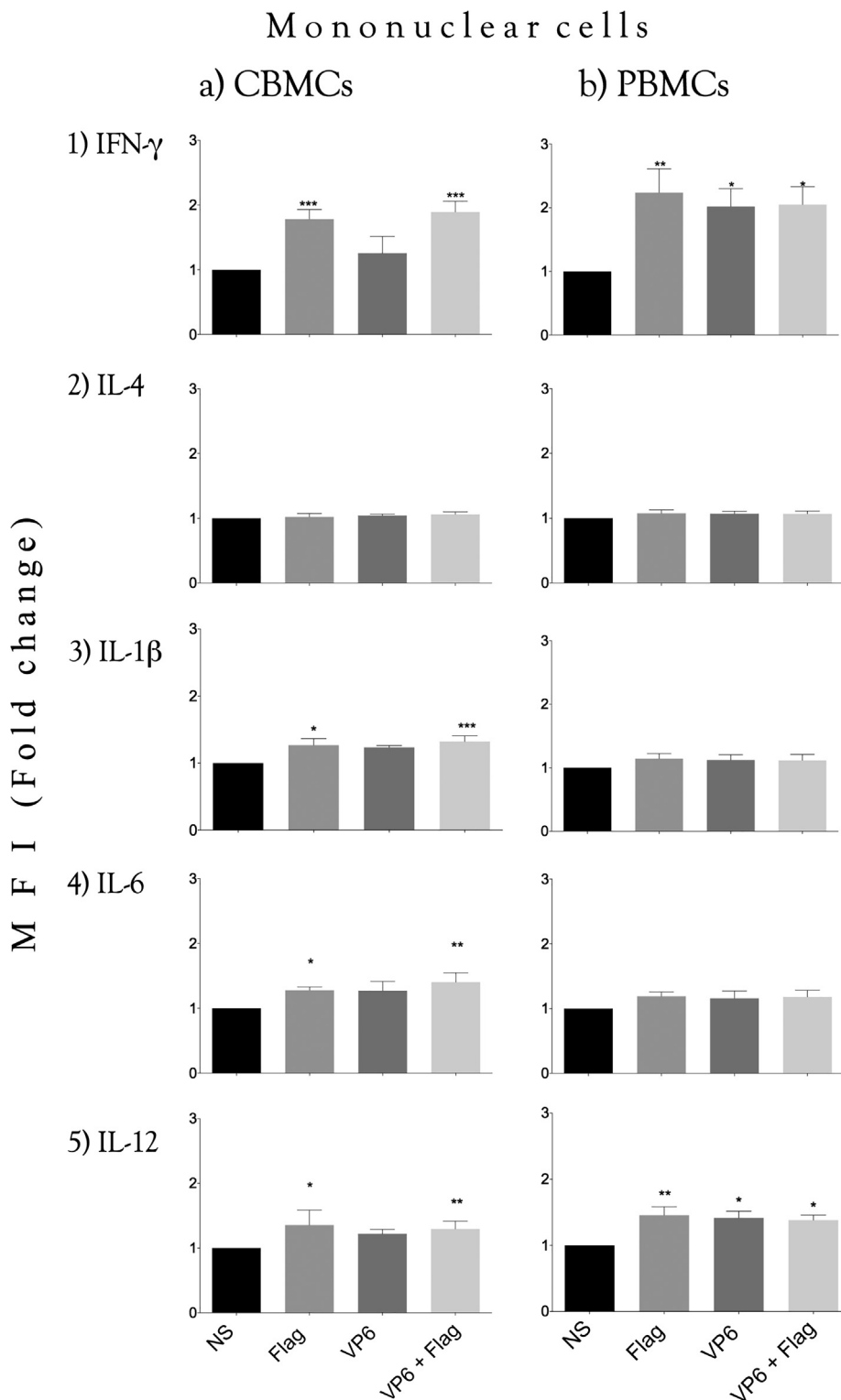


Fig. 1. Flagellin promotes a pro-inflammatory response. Mononuclear cells from peripheral blood (a) PBMC or cord blood (b) CBMC were stimulated with 0.25 μ g VP6, 50 ng flagellin or both during 18 h after which they were intracellularly stained for the indicated cytokines. Results represent the mean \pm SD of five independent samples. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

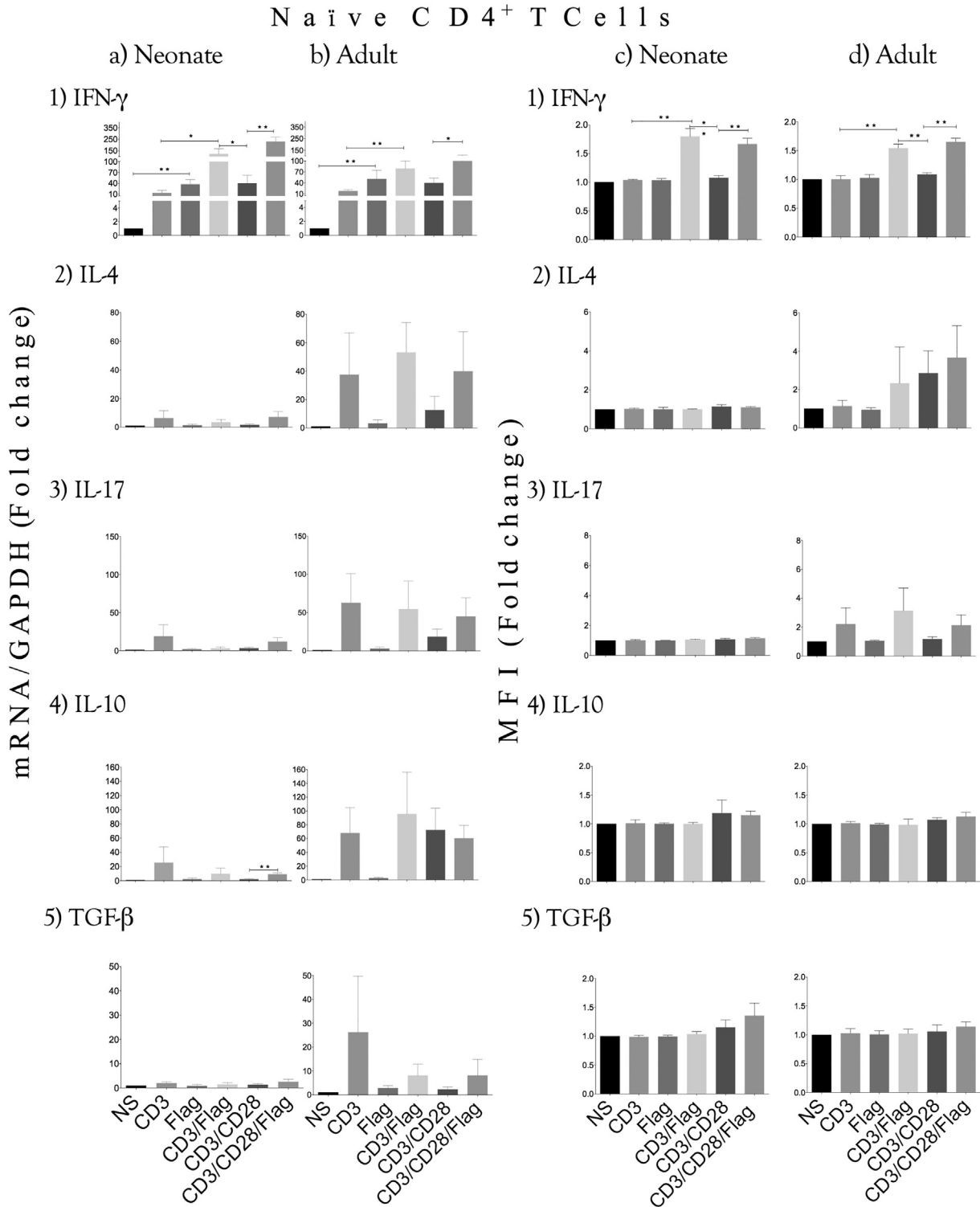


Fig. 2. TLR5 signals induced IFN- γ . Naïve CD4⁺ T cells from neonates (a and c) or adults (b and d) were left untreated or stimulated by cross-linking CD3 or/and CD28 in the presence or absence of flagellin (50 ng). mRNA levels (a and b) were evaluated by RT-qPCR after 6 h and intracellular cytokines levels after 18 h (c and d). Fold increase is shown. Results represent the mean \pm SD of five independent samples. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

2.9. Statistical analysis

Results were analysed with GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA). Unless otherwise specified, a two-tailed unpaired Student's *t* test was used; differences with $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Flagellin induces Th1 responses

To investigate the response of neonatal cells to flagellin and compare this with that of adults, we treated mononuclear cells

from adult (PBMC) and neonate (CBMC) donors with 50 ng of the flagellin monomer for 18 h. As a control of a foreign protein, the viral protein VP6 (250 ng) was used. As shown in Fig. 1, flagellin induced the expression of IL-1 β , IFN- γ and IL-12, but not of IL-4, in both neonatal and adult cells, Flagellin induced an increase in the expression of IL-6 but only in neonatal samples. CBMCs did not respond to the control protein VP6. In PBMC, however, VP6 induced a significant increase in IL-12 and IFN- γ , probably because these adult donors had been previously exposed to rotavirus. The addition of VP6 and flagellin together did not lead to a further increase IFN- γ expression.

Next, we investigated whether naïve CD4⁺ T cells from human neonates or adult donors were able to respond directly to flagellin. We stimulated CD4⁺ T cells (Supplementary Fig 1) and measured mRNA and intracellular cytokines. As shown in Fig. 2 (columns a and b), flagellin itself and in combination with CD3 or CD3/CD28 stimulation in both neonatal and adult naïve CD4⁺ T cells induced a robust expression of IFN- γ mRNA. The extent of the increase of IFN- γ attained by the neonatal cells was higher than in adult cells; this is of particular note because of the high resistance of these cells to expressing this cytokine. Other cytokines were also produced in response to cells' stimulation with CD3 or CD3/CD28,

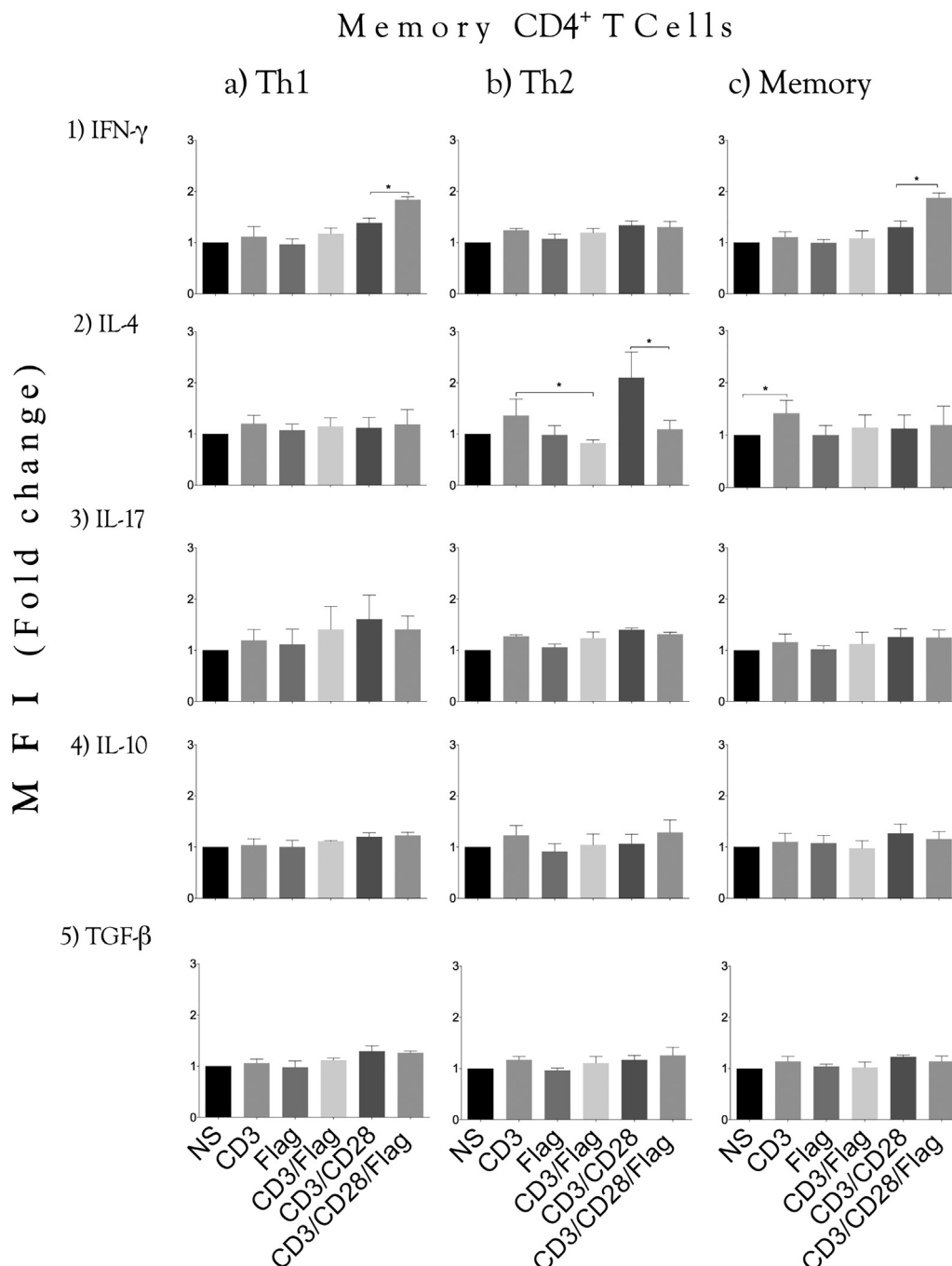


Fig. 3. Flagellin induces a Th1 profile in adult memory cells. Total CD4⁺ T cells from adult donors were left untreated or stimulated with by cross-linking CD3 or/and CD28 in the presence or absence of flagellin (50 ng) for 18 h. Cells were labelled for specific markers for Th1 profile (CXCR3 lane a) or Th2 profile (CCR4 lane b) or total memory cells (CD45RO lane c), and stained for intracellular cytokines. The fold increase in cytokine staining in each of these memory gates is shown. These results represent the mean \pm SD of five independent samples. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

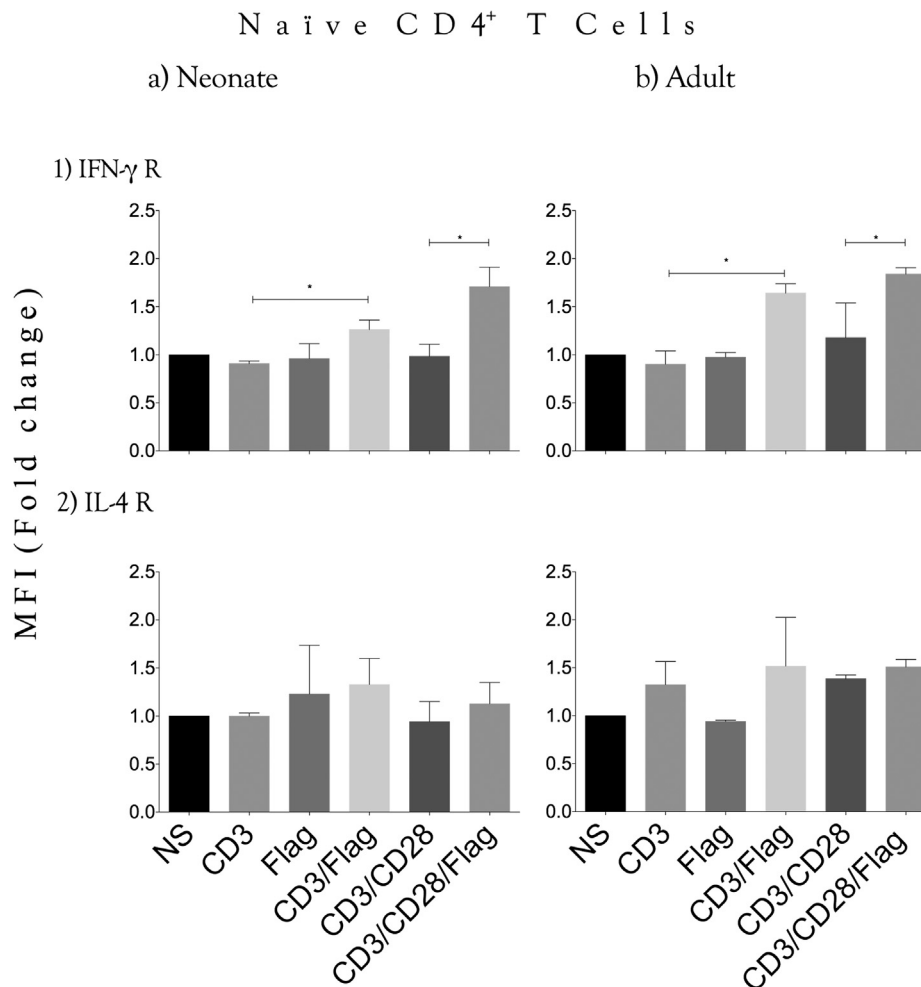


Fig. 4. TLR5 signals promote IFN- γ R expression in naïve cells. Naïve CD4⁺ T cells from neonates or adults were left untreated or stimulated with by cross-linking CD3 or/and CD28 in the presence or absence of flagellin (50 ng) for 18 h. Cytokine receptors were labelled and fold increase is shown. These results represent the mean \pm SD of five independent samples. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

but flagellin addition did not induce any further change in their expression.

We next evaluated cytokine proteins, after similar treatment of naïve cells from neonates and adults, stimulated for 18 h. Flagellin in combination with CD3 also led to the accumulation of IFN- γ in both neonatal and adult naïve CD4⁺ T cells, (Fig. 2 columns c and d). There was no effect of flagellin on the accumulation of the other cytokines evaluated.

Human adult blood contains about 40% of memory cells of different profiles. In order to evaluate the response of memory T cells to flagellin in naturally occurring Th1 or Th2 cells, we used total CD4⁺ T cells from adult donors and specific markers for memory (CD45RO), Th1 (CXCR3) or Th2 (CCR4) [30]. Cells were stimulated with flagellin alone or in combination with cross-linked CD3 or CD3/CD28 for 18 h after which they were labelled with antibodies, against these specific markers as well as against IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10 and TGF- β cytokines. As shown in Fig. 3, flagellin/CD3/CD28 were able to induce the expression of IFN- γ in memory cells and also in the Th1 population. Concomitant with this increase, we observed a significant decrease in the expression of IL-4 expression in response to flagellin/CD3 and flagellin/CD3/CD28 in the Th2 population. Altogether our results show that flagellin favours a Th1 profile in CD4⁺ T cells.

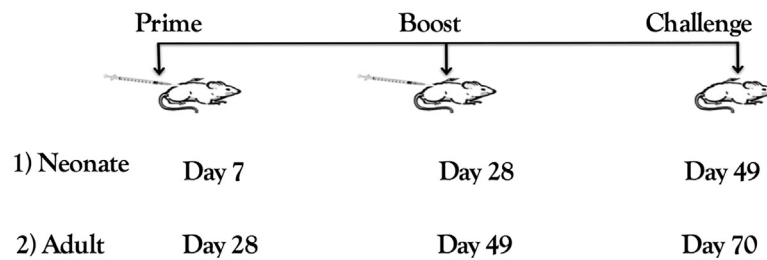
3.2. Flagellin promotes expression of IFN- γ receptor in neonatal and adult CD4⁺ T cells.

Naïve cells have very low expression of cytokine receptors; additional signals are needed to prepare the cells for sensing these cytokines [34]. We thus monitored the effect of flagellin alone or in combination with CD3 or CD3/CD28 signals on the induction of membrane expression of IFN- γ or IL-4 receptors. Flagellin signals increased the expression of IFN- γ R when combined with the signals of CD3 or CD3/CD28 in adult and neonatal cells (Fig. 4). None of the treatments led to a significant change in IL4 R. We also evaluated the expression of IL-23R, as a marker for IL-17 cells, but we could not detect the expression of this marker in peripheral cells.

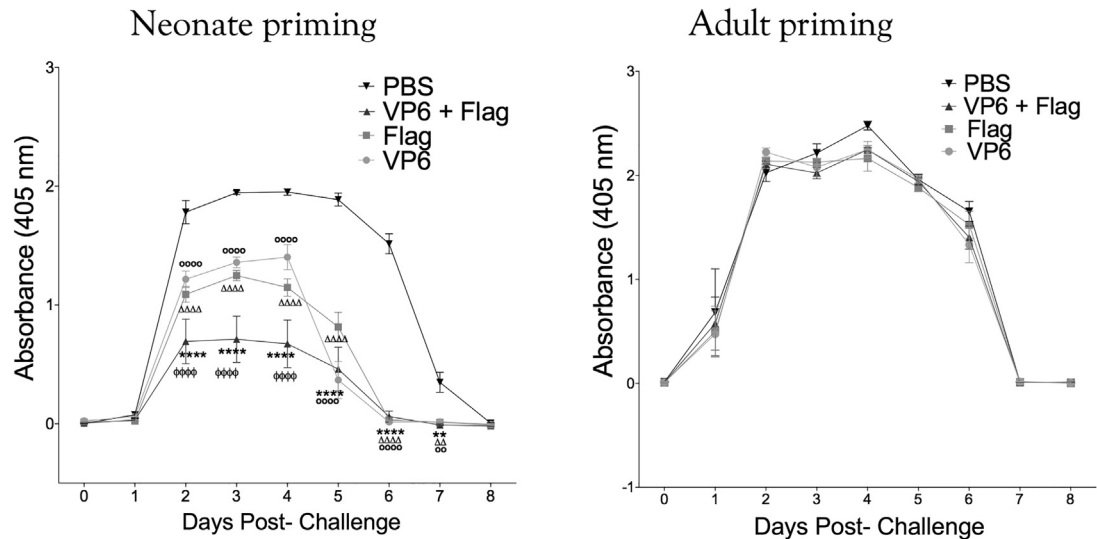
3.3. Flagellin induced protection against rotavirus in neonatal mice

Next, we tested the role of flagellin as an adjuvant in a neonate vaccine protocol *in vivo*. It has been shown that CD4⁺ T cells are very important for immune protection against rotavirus infection [26]. Rotavirus is responsible for infant diarrhea [35] and a good murine model for this disease is available. We used VP6 as antigen, a highly conserved internal structural protein of Rotavirus; this has been shown to provide heterotypic protection against Rotavirus

a) Vaccination and Challenge protocol



b) Virus load in faeces after challenge



c) Protection Quantification

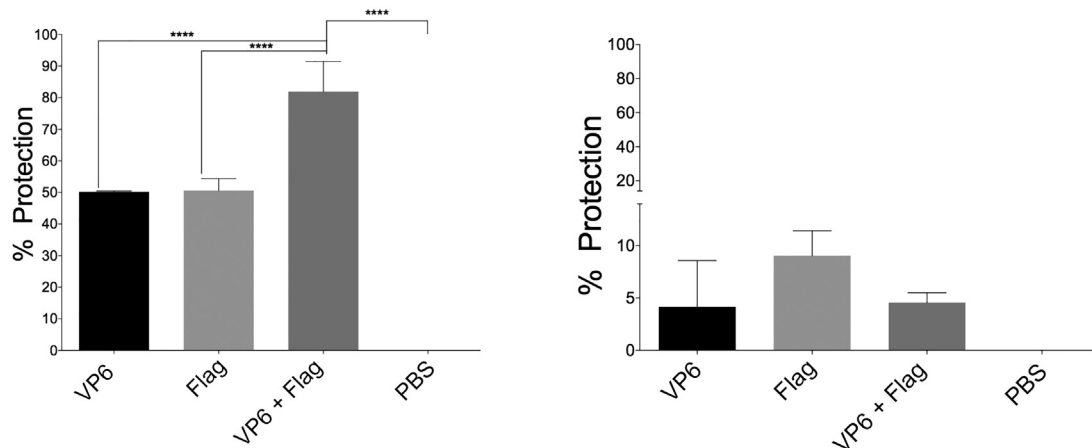


Fig. 5. Neonatal mice priming with flagellin and VP6 confers protection against rotavirus infection. Vaccination protocol is depicted in panel (a). (b) Sandwich ELISA for viral load in faeces of neonate- or adult- primed mice after they were orally challenged with rotavirus EDIM. (c) Percentage of protection against rotavirus. Each point represents the mean \pm SD of 6 independent adult mice (two experiments with 3 adult mice per point) or of 12 independent neonate mice (four experiments with 3 neonate mice per point). *, Δ and o indicate the statistics with respect to the group of PBS, ϕ indicates the statistics of the group vaccinated with VP6/Flagellin with respect to the group only vaccinated with VP6. Each ELISA was evaluated twice. Four symbols $p < 0.001$, two symbols $p < 0.01$.

infection in a CD4⁺ T cells dependent fashion [28]. The vaccination protocol is depicted in Fig. 5a. The virus load after challenge, panel 5b, shows that both VP6 or flagellin alone induced a decrease in the viral load from day 2 only in the mice primed as neonates; there was, an even more dramatic decrease when both flagellin and VP6 were used for neonatal priming. The level of protection achieved by either flagellin or VP6 was 50% in the neonatal primed

mice, while the combined treatment of flagellin and VP6 achieved 80% protection (Fig. 5c). However, none of these treatments had an effect in mice vaccinated when adults. These results indicate that the vaccine is protective in neonates.

We also measured specific antibody levels. As shown in Fig. 6a, the vaccination protocol did not induce significant changes in the IgA responses. We found an IgG response in both neonate- and

IgA and IgG Evaluation

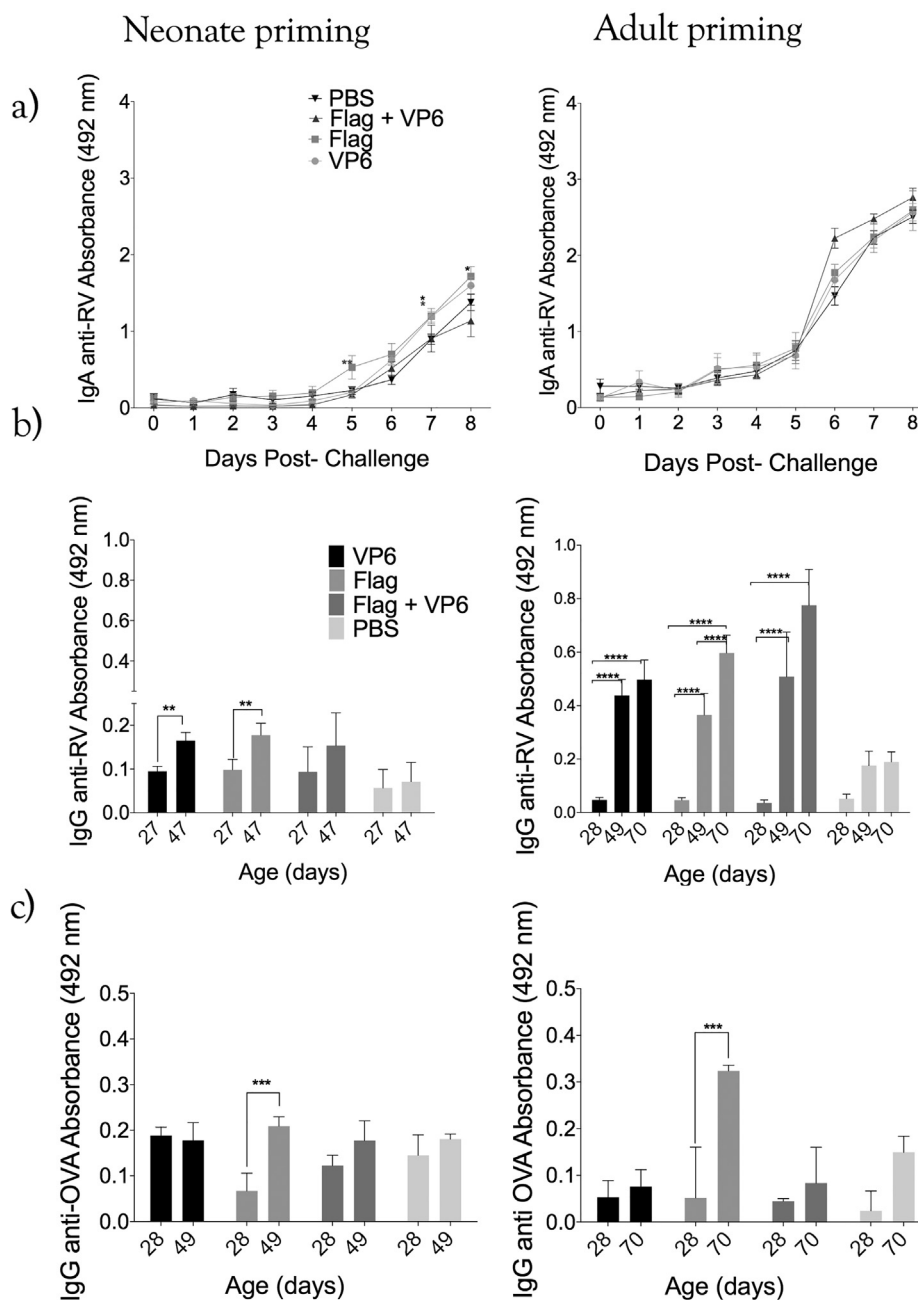


Fig. 6. Rotavirus-specific IgA and IgG antibodies. (a) Rotavirus reactive IgAs were evaluated by ELISA in supernatants from re-suspended faeces from infected mice. (b) Rotavirus reactive IgGs were evaluated from peripheral blood serum at the times shown. (c) anti-ovalbumin IgGs were evaluated in the sera of the treated mice. Results are the mean \pm SD of 6 independent mice (two experiments with 3 mice per point).

adult-primed mice in response to VP6 and flagellin, but the anti-VP6 IgG production was much higher in adult-primed mice. In those treated with both VP6 and flagellin, only adult mice responded with a high anti-VP6 IgG production; the response in neonatal-primed mice was not significant (Fig. 6b).

We observed that flagellin alone induced anti-Rotavirus antibodies. This could be because of a flagellin effect on B1 cells, which could produce antibodies directed against pathogen-associated molecular patterns (PAMP), which could cross-react with VP6 and other proteins. To check this possibility, we measured anti-ovalbumin antibodies in the sera of the treated mice. As shown in Fig. 6c, anti-ovalbumin antibodies were also found in response to flagellin alone in both neonatal- and adult-primed

mice, confirming the idea that flagellin induced the production of 'sticky' antibodies. Altogether our results show that in neonatal, but not adult mice, low levels of flagellin can induce a significant protection against rotavirus infection.

4. Discussion

Vaccines are routinely tested in healthy young adults, although they are mainly used to protect infants and senior citizens. Neonatal T cells need a greater co-stimulatory stimulus in order to respond, and thus the correct choice of adjuvant becomes very important to improve vaccines aimed at neonates. This is particu-

larly relevant for protection against intracellular pathogens, in which a Th1 memory is required. A number of vaccines applied to very young infants fail to induce an adequate Th1 response and multiple boosts are needed to maintain a neutralizing antibody response [36]. Previous reports have shown that flagellin can be an adjuvant for T cell activation [14,28]. Here we show that flagellin was sufficient to induce a Th1 profile directly in CD4⁺ T cells from neonates and adults. Previous studies have shown that neonatal cells have a very low production of IL-12 and IFN- γ because of epigenetic mechanisms; IL-12 synthesis and secretion by mononuclear cells does not reach adult levels in humans until they are 12 years old [30,36,37]. It is thus remarkable that flagellin signals were able to cross the high threshold for expression of IL-12 and IFN- γ genes in neonatal mononuclear cells [38], leading to the production of IL-12 and IFN- γ in similar proportion to those of naïve adult cells. This points out to the significance of using flagellin as an adjuvant in vaccine formulations where the protective cells are Th1. Additionally, flagellin treatment was shown to modify the Th1/Th2 profile of naturally occurring memory cells in adult blood, by decreasing expression of IL-4 of the Th2 cells and increasing production of IFN- γ of the Th1 population. This suggests that the use of flagellin might play a role in new treatments to modify this profile in which a deviation from the Th1 population leads to pathogen resistance or disease.

Our study shows the importance of additional routes for activation of the neonatal CD4⁺ T cells. In our recently generated a dynamic computer model for TLR5 signalling and its crosstalk with a model of TCR signalling in CD4⁺ T cells (Rodríguez-Jorge, submitted), flagellin is capable of activating AP-1, NF κ B and CREB, using a pathway independent the TCR. Neonatal CD4⁺ T cells have a low AP-1 response. The involvement of the TLR5-mediated pathway in the activation of AP-1 could be responsible for the high response of CD4⁺ T cells to flagellin.

Finally, we evaluated the role of flagellin *in vivo* in a murine neonatal vaccination model. We found that VP6 and flagellin in a neonate-priming vaccine protocol provided 80% protection against rotavirus infection. These results indicate that the response was specific to the neonatal stage, as adult-primed mice were not protected, although adult mice show induction of higher levels of serum antibodies, indicating a systemic immune response [33]. Higher doses of VP6 do not confer protection in adult mice, unless they are directed with DEC205 or directly to mucosal tissues [28,33,39]. Several adjuvants were tested to try and confer protection in an oral vaccine without results [40]. Here we show that flagellin and VP6 were able to confer protection by parenteral administration in the neonatal primed mice. A possible explanation could be a higher homing of the neonatal cells into the intestinal mucosa, possibly as a result of their high expression of CCR9 [41] or induction of α 4 β 7 in response IL-7 [42,43]. This would allow the neonatal primed T cells to seed in the gut, conferring protection.

Innate Lymphoid Cells (ILCs) are involved in the protection to rotavirus infection, through the induction of IFN- λ [44,45]. A particular profile of ILCs is found in neonates, in which these cells are involved in the generation of a diverse repertoire of T cells [46]. It is possible that neonatal ILCs are important for T cell priming through dendritic cell activation and secretion of IFN- λ . A higher response of neonatal CD8⁺ T cells to flagellin is also possible, because they have a higher TLR5 expression than the adult cells [4]. Further investigation is needed to clarify this point. Nevertheless, our results show that the response to flagellin *in vivo* is different in neonates and adults and point to the need for a better understanding of the immune response in neonates so that it becomes possible to design efficient vaccine formulations aimed at infants. Altogether, our results show that flagellin could be a good candidate for intracellular pathogen vaccines formulations aimed at neonates and young infants.

Acknowledgements

Work in our laboratories was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (Grants: 168182, 257188 and 180441; and fellowships granted to students of Posgrado en Ciencias, UAEM). Our work was also supported by “Programa para el Desarrollo Profesional Docente”, Mexico. We thank Prof. C.I. Pogson for critical reading of the manuscript.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.005>.

References

- [1] Hodgins DC, Shewen PE. Vaccination of neonates: problem and issues. *Vaccine* 2012;30:1541–59.
- [2] Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today* 1999;20:330–5.
- [3] Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* 2004;4:553–64.
- [4] Galindo-Albarran AO, Lopez-Portales OH, Gutierrez-Reyna DY, Rodriguez-Jorge O, Sanchez-Villanueva JA, Ramirez-Pliego O, et al. CD8⁺ T cells from human neonates are biased toward an innate immune response. *Cell Rep* 2016;17:2151–60.
- [5] Levy O. Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists. *J Endotoxin Res* 2005;11:113–6.
- [6] Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 2007;7:379–90.
- [7] Ehreth J. The value of vaccination: a global perspective. *Vaccine* 2003;21:4105–17.
- [8] Lambert PH, Liu M, Siegrist CA. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? *Nat Med* 2005;11:S54–62.
- [9] Gans H, Yasukawa L, Rinki M, DeHovitz R, Forghani B, Beeler J, et al. Immune responses to measles and mumps vaccination of infants at 6, 9, and 12 months. *J Infect Dis* 2001;184:817–26.
- [10] Ota MO, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, Fielding K, Whittle H, Lambert PH, et al. Hepatitis B immunisation induces higher antibody and memory Th2 responses in new-borns than in adults. *Vaccine* 2004;22:511–9.
- [11] Vekemans J, Ota MO, Wang EC, Kidd M, Borysiewicz LK, Whittle H, et al. T cell response to vaccines in infants: defective IFN γ production after oral polio vaccination. *Clin Exp Immunol* 2002;127:495–8.
- [12] Ota MO, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, Fielding K, Sanneh M, Kidd M, et al. Influence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *J Immunol* 2002;168:919–25.
- [13] Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1997;159:635–43.
- [14] McCarron M, Reen DJ. Activated human neonatal CD8⁺ T cells are subject to immunomodulation by direct TLR2 or TLR5 stimulation. *J Immunol* 2009;182:55–62.
- [15] Uematsu S, Akira S. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb Exp Pharmacol* 2008;1–20.
- [16] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373–84.
- [17] Kulkarni R, Behboudi S, Sharif S. Insights into the role of Toll-like receptors in modulation of T cell responses. *Cell Tissue Res* 2011;343:141–52.
- [18] Rahman AH, Taylor DK, Turka LA. The contribution of direct TLR signaling to T cell responses. *Immunol Res* 2009;45:25–36.
- [19] Crespo I, Paiva A, Couceiro A, Pimentel P, Orfao A, Regateiro F. Immunophenotypic and functional characterization of cord blood dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004;13:63–70.
- [20] Hunt DW, Huppertz HI, Jiang HJ, Petty RE. Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood* 1994;84:4333–43.
- [21] Weimer ET, Ervin SE, Wozniak DJ, Mizel SB. Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 2009;27:6762–9.
- [22] Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 2006;74:1113–20.
- [23] Ben-Yedidia T, Arnon R. Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine. *Immunol Lett* 1998;64:9–15.
- [24] The new NIH public access policy. *Adv Neonatal Care* 2008;8:251.
- [25] Girard A, Roques E, Massie B, Archambault D. Flagellin in fusion with human rotavirus structural proteins exerts an adjuvant effect when delivered with replicating but non-disseminating adenovectors through the intrarectal route. *Mol Biotechnol* 2014;56:394–407.

- [26] Mizel SB, Graff AH, Sriranganathan N, Ervin S, Lees CJ, Lively MO, et al. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:21–8.
- [27] Liu G, Tarbet B, Song L, Reiserova L, Weaver B, Chen Y, et al. Immunogenicity and efficacy of flagellin-fused vaccine candidates targeting 2009 pandemic H1N1 influenza in mice. *PLoS One* 2011;6:e20928.
- [28] McNeal MM, VanCott JL, Choi AH, Basu M, Flint JA, Stone SC, et al. CD4 T cells are the only lymphocytes needed to protect mice against rotavirus shedding after intranasal immunization with a chimeric VP6 protein and the adjuvant LT(R192G). *J Virol* 2002;76:560–8.
- [29] Wang Y, Dennehy PH, Keyserling HL, Tang K, Gentsch JR, Glass RI, et al. Rotavirus infection alters peripheral T-cell homeostasis in children with acute diarrhea. *J Virol* 2007;81:3904–12.
- [30] Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* 2008;9:970–80.
- [31] Ward RL, McNeal MM, Sheridan JF. Development of an adult mouse model for studies on protection against rotavirus. *J Virol* 1990;64:5070–5.
- [32] Burns JW, Krishnaney AA, Vo PT, Rouse RV, Anderson LJ, Greenberg HB. Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. *Virology* 1995;207:143–53.
- [33] Badillo-Godinez O, Gutierrez-Xicotencatl L, Plett-Torres T, Pedroza-Saavedra A, Gonzalez-Jaimes A, Chihu-Amparan L, et al. Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. *Vaccine* 2015;33:4228–37.
- [34] Galindo-Albarran AO, Ramirez-Pliego O, Labastida-Conde RG, Melchy-Perez EI, Liquitaya-Montiel A, Esquivel-Guadarrama FR, et al. CD43 signals prepare human T cells to receive cytokine differentiation signals. *J Cell Physiol* 2014;229:172–80.
- [35] Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:565–72.
- [36] White GP, Watt PM, Holt BJ, Holt PG. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO⁺ T cells. *J Immunol* 2002;168:2820–7.
- [37] Upham JW, Lee PT, Holt BJ, Heaton T, Prescott SL, Sharp MJ, et al. Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood. *Infect Immun* 2002;70:6583–8.
- [38] Yang C, Kim SH, Bianco NR, Robbins PD. Tumor-derived exosomes confer antigen-specific immunosuppression in a murine delayed-type hypersensitivity model. *PLoS One* 2011;6:e22517.
- [39] Choi AH, McNeal MM, Basu M, Bean JA, VanCott JL, Clements JD, et al. Functional mapping of protective epitopes within the rotavirus VP6 protein in mice belonging to different haplotypes. *Vaccine* 2003;21:761–7.
- [40] Choi AH, McNeal MM, Flint JA, Basu M, Lycke NY, Clements JD, et al. The level of protection against rotavirus shedding in mice following immunization with a chimeric VP6 protein is dependent on the route and the coadministered adjuvant. *Vaccine* 2002;20:1733–40.
- [41] Olausson RW, Farstad IN, Brandtzaeg P, Rugtveit J. Age-related changes in CCR9⁺ circulating lymphocytes: are CCR9⁺ naive T cells recent thymic emigrants? *Scand J Immunol* 2001;54:435–9.
- [42] Cimbri R, Vassena L, Arthos J, Cicala C, Kehrl JH, Park C, et al. IL-7 induces expression and activation of integrin alpha4beta7 promoting naive T-cell homing to the intestinal mucosa. *Blood* 2012;120:2610–9.
- [43] Schonland SO, Zimmer JK, Lopez-Benitez CM, Widmann T, Ramin KD, Goronzy JJ, et al. Homeostatic control of T-cell generation in neonates. *Blood* 2003;102:1428–34.
- [44] Hernandez PP, Mahlakoiv T, Yang I, Schwierzeck V, Nguyen N, Guendel F, et al. Interferon-lambda and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nat Immunol* 2015;16:698–707.
- [45] Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, Denning TL, et al. Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science* 2014;346:861–5.
- [46] Bank U, Deiser K, Finke D, Hammerling GJ, Arnold B, Schuler T. Cutting edge: innate lymphoid cells suppress homeostatic T cell expansion in neonatal mice. *J Immunol* 2016;196:3532–6.