



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Trabajo de Tesis para optar por el grado de Doctor de la Facultad de
Ciencias Exactas**

*Análisis de la respuesta innata mucosal
desencadenada por agonistas de receptores tipo toll
(TLR). Evaluación de su relevancia en la interacción
B. pertussis-huésped*

Lic. Agustina Juliana Errea

Director:

Dr. Martin Rumbo

Directora:

Dra. Daniela Hozbor

AÑO 2012

El presente trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Martin Rumbo y la co-dirección de la Dra. Daniela F. Hozbor en el Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

La Plata, marzo 2012

-Agradecimientos-

Quisiera agradecer a todas las personas que de una u otra manera me han ayudado a lo largo de la realización de este trabajo.

A Fernando por introducirme en el mundo de la inmunología.

A Martin, mi director, por brindarme las herramientas para fortalecerme en este proceso de formación.

A Daniela, mi co-directora, por su visión crítica.

A Yani y Lolita por ser más de una vez mis confidentes y darme sus opiniones sinceras.

A Gri por haber compartido gran parte del trabajo cotidiano, por su optimismo y entusiasmo.

A cada uno de mis compañeros LISINOS, los actuales y los pasados, porque me han enriquecido a lo largo de todos estos años. Por las salidas, el compañerismo, por la diversión y sobretodo por nuestro día a día!

A las chicas del grupo *Bordetella* por todas sus ayudas.

A Juancito por su paciencia y opiniones.

Y finalmente a mi familia, que siempre me ha apoyado y acompañado en mis decisiones.

Publicaciones asociadas a este trabajo de Tesis

Errea, A, Moreno, G., Sisti, F., Fernández, J., Rumbo, M., & Hozbor, D. (2010). Mucosal innate response stimulation induced by lipopolysaccharide protects against *Bordetella pertussis* colonization. *Medical microbiology and immunology*, 199(2), 103-8.

Trabajo enviado para su publicación

Moreno G., **Errea A.**, Van Maele L., Roberts R, Léger H., Sirard JC, Benecke A., Rumbo M, Hozbor D. TLR4-dependent signaling orchestrates gene expression and leukocyte recruitment in the first hours of *Bordetella pertussis* infection

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS	3
EL APARATO RESPIRATORIO Y LA INMUNIDAD DE MUCOSAS	6
MECANISMOS DE RECONOCIMIENTO MICROBIANO EN LA MUCOSA RESPIRATORIA:	
LOS RECEPTORES TLR Y SU IMPORTANCIA.	16
<i>Los receptores TLR en la interacción huésped-patógeno.</i>	22
<i>Los receptores TLR y la regulación de la respuesta adaptativa.</i>	25
<i>Los receptores TLR, sus agonistas y las vacunas.</i>	29
<i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> Y LA TOS CONVULSA: GENERALIDADES Y SITUACIÓN	
EPIDEMIOLÓGICA ACTUAL.	32
<i>B. PERTUSSIS</i> Y SUS FACTORES DE VIRULENCIA.	40
<i>Los factores de virulencia y su rol en la infección</i>	42
LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A <i>B. PERTUSSIS</i>	45
<i>Elementos de la respuesta inmune innata frente a B. pertussis.</i>	46
<i>La respuesta inmune adaptativa frente a B. pertussis.</i>	52
HIPOTESIS DE TRABAJO	57
OBJETIVOS GENERALES	57
OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO	58
MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. ANIMALES	63
2. AGONISTAS TLR E INOCULACIONES INTRANASALES	63
3. OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO VACUNAL	64
4. CULTIVO DE <i>B. PERTUSSIS</i> Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS BACTERIANOS.	64
5. TINCIÓN DE <i>B. PERTUSSIS</i> CON CARBOXIFLUORESCEINA DIACETATO	
SUCCINIMIDYL ESTER (CFSE)	65
6. ENSAYOS DE INFECCIÓN E INMUNIZACIÓN	65
7. COLONIZACIÓN BACTERIANA EN PULMÓN.	65
8. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DEL ESPACIO BRONQUIOALVEOLAR Y DE CÉLULAS DEL	
PARÉNQUIMA PULMONAR.	66
9. ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS RECLUTADAS AL PARÉNQUIMA	
PULMONAR Y AL ESPACIO BRONQUIOALVEOLAR.	66
10. ESTIMULACIÓN DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES.	67
11. SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA DE CÉLULAS OBTENIDAS DE LAVADO	
BRONQUIOALVEOLAR Y DE PARÉNQUIMA PULMONAR.	67
12. DEPLECIÓN DE NEUTRÓFILOS	68
13. EXPERIMENTOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.	68
13.1 <i>Obtención de ARN</i>	68
13.2 <i>Obtención de cDNA.</i>	68
13.3 <i>Medida de los niveles de expresión génica por PCR cuantitativa</i>	
<i>(Real Time PCR)</i>	69
13.4 <i>Perfiles de expresión génica pulmonares evaluados mediante</i>	
<i>microarreglos de cDNA (microarray)</i>	70
13.5 <i>Medida de expresión génica por TaqMan Low Density Array</i>	
<i>(TLDA).</i>	71
14. ENSAYOS DE MICRODISECCIÓN	72
15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73

INDICE

CAPÍTULO 1	75
RESPUESTA DE LA MUCOSA RESPIRATORIA FRENTE A LA ESTIMULACIÓN INTRANASAL CON AGONISTAS TLR	77
INTRODUCCIÓN	77
RESULTADOS	80
DISCUSION	99
CAPÍTULO 2	109
ESTUDIO DE LOS EVENTOS TEMPRANOS DE LA INFECCIÓN POR BORDETELLA PERTUSSIS: RELEVANCIA DE TLR-4 EN LA INTERACCIÓN HUÉSPED-PATÓGENO	111
INTRODUCCION	111
RESULTADOS	112
<i>Rol de TLR-4 en el control de la carga bacteriana durante la infección por B. pertussis</i>	113
<i>Caracterización del perfil transcripcional pulmonar en cepas TLR-4 competentes y TLR-4 deficientes mediante ensayos de microarreglos de ADN</i>	114
<i>TLR-4 y respuesta neutrofílica en la infección por B. pertussis</i>	131
<i>TLR-4 y la expresión génica de quimioattractantes leucocitarios durante la infección por B. pertussis</i>	131
<i>El rol de TLR-4 en reclutamiento leucocitario a las vías aéreas durante la infección por B. pertussis.</i>	132
<i>Funcionalidad neutrofílica en la infección</i>	135
<i>Rol de los neutrófilos en el control de la infección por B. pertussis</i>	141
DISCUSION	143
CAPÍTULO 3	153
LA ESTIMULACIÓN DE LA RESPUESTA INNATA Y LA GENERACIÓN DE RESISTENCIA EN LA INFECCIÓN POR B. PERTUSSIS	155
INTRODUCCION	155
RESULTADOS	159
DISCUSION	165
CAPÍTULO 4	173
EMPLEO DE AGONISTAS TLR COMO ADYUVANTES MUCOSALES EN FORMULACIONES ACELULARES FRENTE A B. PERTUSSIS: CAPACIDAD DE INDUCIR INMUNIDAD PROTECTIVA	175
INTRODUCCION	175
RESULTADOS	178
DISCUSIÓN	181
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	187
BIBLIOGRAFÍA	199



INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias

Las infecciones respiratorias son las patologías infecciosas que aparecen con mayor frecuencia en la población. Esto, en combinación con el alto nivel de morbilidad y mortalidad que tienen asociado, las convierte en una problemática de gran relevancia para la salud pública a nivel mundial.

Afectan a todos los grupos etarios, presentándose en sus formas más severas en niños pequeños y adultos mayores. Los agentes etiológicos son diversos, prevaleciendo las patologías virales y bacterianas en el caso de los huéspedes inmunocompetentes. De acuerdo a la forma de aparición y la zona anatómica que afectan, las infecciones respiratorias se clasifican en agudas o crónicas y altas o bajas respectivamente. Las infecciones altas son las enfermedades más comunes en niños e incluyen rinitis, sinusitis, otitis, faringitis, amigdalitis y laringitis. La mayoría son de etiología viral y se autolimitan, a pesar de lo cual constituyen uno de los principales motivos de consulta ambulatoria en los niños menores de 5 años. Aunque en ausencia de factores predisponentes no revisten mayor seriedad, este tipo de infecciones ha sido asociado al desarrollo de patologías bacterianas tanto altas como bajas, estas últimas de mayor seriedad. Los mecanismos por los que esto ocurre no son del todo conocidos aunque se ha observado que los virus pueden modular procesos que favorecen la colonización bacteriana, un paso necesario para el desarrollo de la patología. Así por ejemplo, se ha visto que el virus sincisial respiratorio, agente causal de infecciones respiratorias altas y bajas, es capaz de disminuir la expresión local de péptidos antimicrobianos lo cual ha sido asociado a un aumento en la colonización nasofaríngea por *Haemophilus influenzae* (McGillivray, Mason, Juncisek, Peeples, & Bakaletz, Lauren O, 2009). Asimismo, éste y otros virus facilitan la expresión de receptores en las células epiteliales lo cual contribuye a la adhesión y la colonización bacteriana (Avadhanula et al., 2006).

Por su parte, las infecciones respiratorias bajas son patologías severas que pueden ser causadas por virus y bacterias, fundamentalmente, y abarcan las vías de conducción aérea desde traquea hasta el pulmón y su parénquima. Además de las manifestaciones locales, suelen tener efectos sistémicos que pueden deberse

al impacto de la funcionalidad respiratoria en otras funciones vitales, a la acción de toxinas microbianas o incluso a la diseminación del agente etiológico. En este sentido la anatomía adecuada al intercambio gaseoso convierte al pulmón en una buena puerta de entrada de los microorganismos a la circulación sistémica.

A pesar de la existencia de herramientas profilácticas y terapéuticas, las infecciones respiratorias bajas constituyen una causa frecuente de hospitalización y muerte. De acuerdo a los registros de la OMS, son las patologías con mayor impacto en la población mundial representando aproximadamente el 6% de la totalidad de las enfermedades a nivel global y cerca de 94.5 millones de DALYS (Disability-Adjusted Life Year), mucho más que muchas otras reconocidas amenazas a la salud pública como el cáncer, la malaria e incluso el HIV (Mizgerd, 2006). En conjunto, las infecciones respiratorias, representan el 35% de las muertes por causas infecciosas y se ubican dentro de las 5 primeras causas de mortalidad a nivel mundial, originando 4.2 millones de muertes anuales (OMS: *The Burden of disease Proyect: update 2004*).

Por las características enunciadas, las infecciones respiratorias bajas son patologías de gran impacto en la salud pública y economía. En particular, las infecciones agudas (IRA) son la principal causa de morbilidad y mortalidad pediátrica y el motivo más frecuente de utilización de los servicios de salud. Las estimaciones muestran que las IRAs representan entre 30 y 50% de las visitas de los niños a los establecimientos de salud y entre 20 y 40% de las hospitalizaciones pediátricas en la mayoría de los países en vías de desarrollo. La neumonía y la bronquiolitis son las patologías más comunes. Entre los adultos, la neumonía es la patología más común con una incidencia que oscila entre países desde 1,6 a 11 casos cada 1000 adultos con tasas de hospitalización de entre 40 y 60 % (Polverino & Torres Marti, 2011).

Todo lo dicho indica que las medidas existentes en la actualidad destinadas al control de las infecciones respiratorias aún no son suficientes. En este sentido podemos mencionar por ejemplo que las herramientas profilácticas y terapéuticas disponibles están destinadas sólo a algunos de los agentes causales, la mayor parte de ellos bacterianos, aunque las patologías virales son de gran prevalencia. Por otra parte, si bien estas estrategias han permitido un control considerable de

las enfermedades causadas por *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Bordetella pertussis* y *M. tuberculosis* entre otros, su implementación ha introducido modificaciones en las distintas poblaciones microbianas y su distribución entre los huéspedes, mostrando una interacción dinámica y la capacidad de cambio de muchos agentes infecciosos. Así podemos citar la creciente resistencia a antibióticos para distintas bacterias patógenas o el cambio de la distribución de las cepas circulantes en la población general como consecuencia de las estrategias de vacunación, lo cual ha sido observado para los patógenos mencionados (Adam et al., 2010; Frits R Mooi, 2010; T. van der Poll & Opal, 2009).

Esta co-evolución resalta aún más la necesidad de desarrollar nuevas y mejores herramientas de prevención. Para ello es necesario profundizar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que determinan tanto el establecimiento de las infecciones respiratorias como aquellos que permiten su control. Así, la comprensión de los elementos inmunológicos que contribuyen a la defensa frente a un patógeno dado y cómo éstos pueden ser inducidos resulta fundamental, en combinación con el estudio epidemiológico, para el desarrollo de nuevas alternativas profilácticas frente a agentes microbianos que aún hoy representan un problema considerable para la salud de la población.

En este trabajo nos vamos a centrar en la infección respiratoria causada por *B. pertussis*, el agente etiológico de la tos convulsa o pertussis. Esta patología tiene una alta prevalencia a nivel mundial a pesar de la implementación masiva de la vacunación desde mediados del siglo XX por lo que el desarrollo de nuevas medidas inmunoprolácticas es hoy en día uno de los objetivos destinados a controlar esta enfermedad. De acuerdo al conocimiento existente sobre el funcionamiento del sistema inmune en este trabajo decidimos analizar las vías de reconocimiento patogénico que participan en la defensa del huésped frente a *B. pertussis* con el fin de diseñar y evaluar distintas estrategias de inmunointervención.

Para ello a lo largo de esta introducción empezaremos por describir cómo está organizada la defensa de la mucosa respiratoria centrándonos en el rol clave de la inmunidad innata y sus receptores en la orquestación de la defensa anti-

microbiana. Asimismo presentaremos las evidencias que sostienen la utilidad y potencialidad de la modulación de la inmunidad innata en el diseño de estrategias inmunoproliféricas y cómo esta modulación debe ser seleccionada de acuerdo al patógeno en cuestión. En estas secciones también señalaremos la importancia de la elección de la vía de administración de una formulación vacunal de acuerdo al patógeno y su vía de ingreso al organismo.

Finalmente sintetizaremos los aspectos más relevantes del conocimiento existente sobre *B. pertussis* y la patología que desencadena, presentando cómo la situación epidemiológica actual plantea la necesidad de nuevas formulaciones vacunales. Terminaremos mencionando el conocimiento que existe sobre la respuesta inmune frente a este patógeno y las herramientas mediante las cuales el mismo es capaz de modular tal respuesta a fin de cumplir su ciclo de infección.

El aparato respiratorio y la inmunidad de mucosas

Las mucosas son las superficies que recubren las cavidades internas del organismo, representando puntos de contacto y comunicación entre el interior y el exterior del organismo. Por esta razón, están naturalmente expuestas a una amplia cantidad de estímulos de características y orígenes diversos, entre ellos, los microorganismos patogénicos: más del 90% de las infecciones bacterianas, virales y parasitarias son originadas en los sitios mucosales. En condiciones normales, gran parte de la mucosa está colonizada por una flora microbiana característica con la cual interactúa en forma activa. Con el fin de controlar la colonización y defenderse de la invasión microbiana, los organismos superiores han desarrollado el sistema inmune de mucosas, una especialización del sistema inmune con mecanismos de funcionamiento y poblaciones leucocitarias propias. Este sistema ha evolucionado para reconocer y distinguir diversos estímulos y perturbaciones de manera de sostener una respuesta reguladora frente a antígenos inocuos y establecer una respuesta inmune activa en caso de las interacciones patogénicas.

La mucosa respiratoria está en permanente contacto con agentes externos, incluidos los microorganismos, que ingresan con el aire inspirado. En promedio, la mucosa respiratoria humana se enfrenta a entre 12 y 17 mil litros de aire que son

inspirados diariamente. Estas características junto con las adaptaciones anatómicas necesarias para que el intercambio gaseoso tenga lugar, vuelve a la mucosa respiratoria particularmente susceptible al acceso de agentes nocivos como los alérgenos, las partículas contaminantes y los microorganismos patogénicos.

La mucosa respiratoria dispone de distintos mecanismos de defensa que se adaptan a cada región del tracto respiratorio (superior e inferior) dependiendo de sus requerimientos anatómicos y funcionales. El tracto respiratorio superior, que abarca desde las fosas nasales hasta la laringe, se encuentra en estrecha relación con el ambiente exterior. Por su parte, el tracto respiratorio inferior está formado por las vías de conducción aéreas centrales, traquea y bronquios principales, y el pulmón, con sus vías aéreas y parénquima. Las vías aéreas pulmonares están constituidas por las ramificaciones de los bronquios principales que dan origen a bronquios secundarios y terciarios de menor calibre, los cuales se continúan con los bronquiolos. Estos también sufren divisiones sucesivas para dar lugar a los bronquiolos terminales, a los bronquiolos respiratorios y en último término a los ductos alveolares al final de los cuales se encuentran los sacos alveolares conteniendo múltiples alvéolos, en donde tiene lugar intercambio gaseoso.

Las partes superiores del árbol respiratorio están en contacto con la flora comensal presente en las fosas nasales y en la cavidad oral. A medida que descendemos se establecen una serie de mecanismos que limitan la accesibilidad de los microorganismos y permiten que el tracto respiratorio inferior permanezca estéril de manera de preservar sus funciones y la homeostasis del sistema.

Las vías de conducción aéreas están constituidas por una capa epitelial que abarca, en el humano, una superficie de 70 m². Este epitelio presenta distintas características de acuerdo a su localización siendo un epitelio pseudoestratificado a nivel traqueo-bronquial que sufre una transición hacia un epitelio columnar simple al pasar a las vías aéreas de menor calibre. Las células de este epitelio son células ciliadas y alternan con las células productoras de mucus, las células de Goblet, desde las fosas nasales hasta los bronquiolos grandes (Kim et al., 1997). Estos dos tipos celulares actúan dando lugar a los diferentes mecanismos constitutivos de la respuesta innata con que cuenta la mucosa respiratoria para defenderse. Por un lado, forman una barrera física que limita el pasaje de partículas y microbios que ingresan con cada inspiración hacia el interior del

organismo. Por otra parte, dan origen a una barrera mecánica formada por los mecanismos de clearance mucociliares. Este mecanismo opera a lo largo de la traquea, bronquios y bronquiolos de mayor tamaño y facilita la expulsión hacia el exterior de microorganismos y partículas grandes, limitando su accesibilidad a los alvéolos con el fin de preservar su funcionalidad. La importancia de esta barrera innata es puesta de manifiesto por el desarrollo de infecciones crónicas en pacientes con enfermedades genéticas tales como la fibrosis quística o la disquinesia ciliar primaria en las cuales estos mecanismos se ven alterados por distintos motivos (Knowles & Boucher, 2002). A medida que las vías aéreas van adquiriendo proximidad a la zona alveolar este mecanismo desaparece y el epitelio presenta adaptaciones funcionales que determinan la pérdida de las cilias y el pasaje de un epitelio columnar a un epitelio escamoso adaptado al intercambio gaseoso.

Además de proveer de barreras físico/mecánicas, las células epiteliales presentan una gran plasticidad estructural, molecular y funcional. Esto, junto con su ubicación estratégica para la detección temprana de estímulos exógenos convierte al epitelio respiratorio en un actor clave de la respuesta innata en la mucosa respiratoria.

Ante la detección microbiana o el reconocimiento de señales de daño tisular, el epitelio es capaz de desarrollar distintos mecanismos efectores. Por un lado, expresa una serie de actores moleculares que permiten dar inicio a la organización de la respuesta innata. Entre ellos encontramos diversas citoquinas como IL-6, TNF- α , o IL-1 β y quimoquinas que permiten reclutar y activar distintas poblaciones leucocitarias que participan en la respuesta a diversas injurias tisulares (Bals & Hiemstra, 2004; Hippenstiel, Opitz, Schmeck, & Suttorp, 2006). Por otro lado, el epitelio posee varios mecanismos efectores que participan de la muerte microbiana. Uno de ellos consiste en la expresión de péptidos antimicrobianos diversos, que son liberados al lumen dando origen a una barrera química. Muchos de estos compuestos son expresados en forma constitutiva y su expresión puede ser exacerbada ante la detección microbiana o en respuesta a procesos pro-inflamatorios. Las catelicidinas y las defensinas forman parte de las moléculas de menor tamaño, mientras que las de mayor tamaño se corresponden con las colectinas, la lisozima, la lipocalina, la lactoferrina y las proteínas de la familia S100 que incluyen las calgranulinas A y B. Estos componentes tienen propiedades

microbicidas basadas en distintos mecanismos de acción, que incluyen la ruptura de las paredes microbianas y el secuestro de iones críticos para el metabolismo microbiano entre otros (Grubor, Meyerholz, & Ackermann, 2006; Hiemstra, 2007). La relevancia de estos factores ha sido establecida en múltiples escenarios infecciosos que tienen lugar en el aparato respiratorio existiendo ejemplos puntuales para la mayoría de ellos (Evans 2010).

Por otra parte, mecanismos adicionales, que tradicionalmente han estado restringidos a poblaciones leucocitarias con capacidades fagocíticas ahora también están siendo encontradas en el epitelio respiratorio. Este es el caso de la producción de especies reactivas del oxígeno que es estimulada en respuesta a infecciones (Gerson et al., 2000; Moskwa et al., 2007).

Así, el epitelio tiene una contribución activa en la defensa de la mucosa respiratoria, brindando barreras constitutivas, participando en la inducción y orquestación de la respuesta inmune y también en el control microbiano directo.

Por debajo de la capa epitelial que recubre las vías aéreas se dispone el tejido mucosal, en el que podemos encontrar dispersas distintos tipos de células del sistema inmune, incluidas células macrofágicas, células dendríticas y algunos mastocitos. Los linfocitos, por su parte, pueden presentar distintas localizaciones. Al igual que en la mucosa intestinal, existe un pool de linfocitos intraepiteliales. La fracción $\gamma\delta$ de esta subpoblación parecería estar implicada en la inducción de tolerancia y el mantenimiento de la homeostasis frente a antígenos inhalados (Lahn et al., 1999).

Las células linfocitarias también pueden disponerse en forma de folículos linfoides en las vías aéreas superiores donde dan lugar a sitios inductores de la respuesta inmune adaptativa de la mucosa respiratoria. A lo largo de la mucosa de las vías inferiores y el parénquima pulmonar se encuentran de manera dispersa, con un fenotipo principalmente de memoria.

Al final de las vías de conducción encontramos el alveolo en donde los mecanismos innatos de defensa se adecuan para permitir el intercambio gaseoso y se basan fundamentalmente en las barreras químicas mencionadas previamente y en la activación de respuestas celulares. En condiciones normales tres tipos celulares son encontrados en el alveolo. Por un lado, las células

epiteliales que están representadas en un 90% por los neumocitos tipo I, especializadas en el intercambio gaseoso, y un 10% por los neumocitos tipo II que intervienen en la inducción de defensa de este compartimento. Por otro, encontramos las células que se disponen en el espacio alveolar y que están, en condiciones normales/no inflamatorias, representadas en un 95% por los macrófagos alveolares (MA) (Holt, Strickland, Wikström, & Jahnsen, 2008). Estas células conforman la primera línea de defensa de los alvéolos y presentan una amplia gama de funciones que permiten mantener el sitio donde tiene lugar el intercambio gaseoso libre de compuestos y agentes microbianos que puedan interferir. Para ello, presentan una amplia capacidad fagocítica a la que contribuyen diversos receptores de la inmunidad innata, incluidos los receptores de complemento, los de manosa, los receptores de la porción Fc de los anticuerpos y los receptores scavengers. De forma similar a lo que ocurre con las células epiteliales, los MA son actores centrales en la inducción de la respuesta innata ante la invasión microbiana. En respuesta al evento de reconocimiento estas células desencadenan mecanismos efectores encargados de la eliminación microbiana y brindan señales de activación, instauración y estructuración de la respuesta innata en la mucosa respiratoria. Así, por ejemplo, la depleción de los (MA) con agentes químicos como el clodronato reduce la inducción de la respuesta inflamatoria y limita el clearance de bacterias gram negativas como *S. pneumoniae* entre otras (Cheung, Halsey, & Speert, 2000; Traeger et al., 2009) señalando los aspectos mencionados. Estas células participan además en la regulación de la respuesta inmune a nivel pulmonar manteniendo circuitos de regulación homeostática que dependen de la interacción activa con las células epiteliales (Lambrecht, 2006; Takabayshi et al., 2006).

A la defensa alveolar también contribuyen las células leucocitarias distribuidas en el parénquima pulmonar entre las que encontramos macrófagos intersticiales, células dendríticas, linfocitos T y B, principalmente de memoria y algunos mastocitos.

Los MA y las células epiteliales de las vías aéreas mantienen una comunicación estrecha. Ambos tipos celulares actúan como centinelas de la inmunidad en la mucosa respiratoria al ser los primeros en detectar la presencia

microbiana y poner en juego los mecanismos de defensa inducibles que forman parte de la inmunidad innata. Tal respuesta es fundamental por dos aspectos, en primer lugar, brinda mecanismos efectores que se activan en pocos minutos y permiten controlar a los agentes microbianos rápidamente. En segundo lugar, una cantidad creciente de evidencia indica que las señales moleculares establecidas por la inmunidad innata son claves para inducir y direccionar la última barrera de defensa mucosal: la inmunidad adaptativa antígeno específica (Hammad & Lambrecht, 2011; Holt et al., 2008; A. Kato & Schleimer, 2007). Esta respuesta es una parte vital de la protección del aparato respiratorio no sólo porque potencia los mecanismos microbicidas de la inmunidad innata favoreciendo la resolución de las patologías infecciosas, sino además porque su activación ocurre de forma específica y conduce al establecimiento de memoria inmunológica (Pasare & Medzhitov, 2005a; Bali Pulendran & Ahmed, 2006). Durante la inducción de la respuesta adaptativa, aparte de las células efectoras, se generan células T de memoria. Estas se diferencian funcional y fenotípicamente de las células T *naive* por presentar un umbral menor de activación y la capacidad de adquirir funciones efectoras con mayor velocidad. Además, las células de memoria presentan un patrón de migración diferente al de las células *naive* que les permite distribuirse tanto en tejidos linfoides como en tejidos periféricos, facilitando el encuentro con el antígeno al que responden. Estas características, en combinación con la expansión de la población antígeno específicas que tiene lugar luego de un primer contacto con el antígeno, determinan que ante un re-encuentro con un patógeno dado, el organismo pueda establecer una defensa en forma dirigida, que supera en magnitud y velocidad a la que se origina en una primo-infección y que es capaz de prevenir, en la mayoría de los casos, las re-infecciones (Campos & Godson, 2003; Esser et al., 2003; Randall, 2010; Zielinski et al., 2011). En esta cualidad del sistema inmune se sustenta la utilidad de las vacunas como herramienta profiláctica para el control de las enfermedades infecciosas.

La mucosa respiratoria cuenta con distintos sitios inductores donde la inmunidad adaptativa puede activarse y adquirir características propias de la respuesta mucosal. En las vías aéreas superiores existen estructuras de tejido linfoide organizado que se sitúan principalmente a nivel de las bifurcaciones bronquiales, por lo que reciben el nombre de BALT (tejido linfoide asociado a

bronquios). La estructura de estos agregados linfocitarios está caracterizada básicamente por la existencia de folículos de linfocitos B recubierto por epitelio no ciliado, la ausencia de células de Goblet y la presencia de células M con funciones adaptadas a la captación antigénica. En la periferia de estos folículos pueden encontrarse células plasmáticas mientras que la mayor parte de las células presentes en el BALT son células B que expresan en su superficie IgA o IgM (Bienenstock & Mcdermott, 2005). Distintas áreas con predominio de linfocitos T han sido descritas en BALT localizándose mayoritariamente en las zonas perifoliculares. En estas estructuras también se ha descrito la presencia de células dendríticas dispersas cuya caracterización no es precisa (Bienenstock & Mcdermott, 2005). Si bien la existencia de estos agregados presenta gran variabilidad entre e intra especies están considerados sitios de captación antigénica e inducción de la inmunidad adaptativa.

En las vías aéreas inferiores, que carecen de estas estructuras linfoides, el sitio inductor está formado por los ganglios drenantes, los ganglios mediastínicos. Durante los procesos infecciosos, la detección microbiana lleva a la activación de la inmunidad innata y las células presentadoras de antígenos profesionales: las células dendríticas. Mediante esta activación estas células adquieren modificaciones funcionales y migran a los ganglios drenantes, en donde presentan antígenos a las células T, las activan y direccionan su perfil funcional (Th1, Th2, Th17, etc) y su capacidad migratoria de acuerdo a las señales de la inmunidad innata que hayan recibido en el entorno mucosal (Legge & Braciale, 2003; Vermaelen & Pauwels, 2003).

En algunas situaciones, la activación de la respuesta adaptativa puede ocurrir en estructuras linfoides terciarias que no aparecen normalmente sino que son inducidas por procesos infecciosos o inflamatorios tanto en ratones como en humanos (Rangel-Moreno et al., 2006). Estas regiones son análogas al BALT, por lo que son denominadas "BALT inducible" (iBALT) y aparecen en pulmón en donde adquieren diferentes disposiciones: peribronquial, perivascular o intersticial. Si bien aún no está esclarecida la contribución relativa de estas regiones en la inducción de la respuesta, se ha observado que la misma puede ser significativa en algunos contextos. Así, en el modelo murino de infección por el virus de influenza se ha visto la aparición de iBALT, el cual es suficiente para inducir una respuesta adaptativa antígeno específica capaz de promover la eliminación viral y facilitar la

supervivencia sin participación de órganos linfoides convencionales (Moyron-Quiroz et al., 2004).

La forma en que tiene lugar la articulación entre la inmunidad innata y la adaptativa y el rol clave de los receptores de la inmunidad innata será descrita con mayor profundidad posteriormente puesto que representa uno de los ejes conceptuales en los que se basa este trabajo de tesis.

Como hemos mencionado previamente, la activación de la inmunidad adaptativa en la mucosa respiratoria genera ciertas diferencias respecto de la activación a nivel sistémico. Una de ellas es la inducción de un patrón de migración específico, que permite que tanto las células efectoras como las células de memoria se redistribuyan en la mucosa, en donde ejercen sus funciones. La mayor parte de las células son instruidas para retornar a la mucosa en la que fueron activadas mientras que una parte menor se distribuye en mucosas distales, en el caso de la mucosa respiratoria, la mucosa génito-urinaria (Ciabattini et al., 2011; C Czerkinsky & Holmgren, 2012; Johansson, Wassén, Holmgren, Jertborn, & Rudin, 2001). Esta característica es de suma importancia puesto que brinda armas de defensa específicas en las vías de ingreso fisiológicas de cada agente patogénico brindando protección frente a futuras exposiciones.

Diversas evidencias indican la existencia y la relevancia de este mecanismo. Gran parte de ellas proviene del estudio de las infecciones virales en donde se ha observado que luego de la resolución de una primo-infección una cantidad considerable de células de memoria persisten en la mucosa de las vías aéreas y en el parénquima pulmonar. En general, estas células se reducen con el tiempo hasta dar lugar a una población estable (Hogan, Usherwood, et al., 2001). Tal disminución ha mostrado correlación con la pérdida de protección observada frente a los correspondientes agentes infecciosos. Esto resalta la importancia que tiene la distribución de estas células en la vía de ingreso agente patogénico al organismo del para proteger de las re-infecciones (Lahn et al., 1999). Además, en este tipo de estudios pudieron encontrarse ciertas diferencias fenotípicas y funcionales entre las células T de memoria antígeno específicas que se encuentran en las vías aéreas y aquellas de origen sistémico (Hogan, Zhong, et al., 2001).

Otros trabajos muestran que la estimulación de la respuesta inmune a nivel local, a diferencia de la activación sistémica, permite establecer una respuesta de memoria en la mucosa respiratoria. En las infecciones virales la persistencia de tales células parece estar regulada, al menos en parte, por la presencia de antígeno residual en los ganglios mediastínicos luego de eliminado el microorganismo. Takamura y colaboradores encontraron que las células T CD8+ de memoria que son activadas por vía intraperitoneal son incapaces acceder a dichos ganglios y ser activadas por la presencia antigénica mientras que aquellas que fueron activadas por vía intranasal mantienen tal habilidad (Takamura et al., 2010). Evidencias similares existen a nivel humano. El estudio de las células T de memoria que residen a nivel pulmonar revela la existencia de diferencias fenotípicas y funcionales respecto de las de origen sistémico: las células presentes en pulmón muestran una proliferación activa al ser enfrentadas al virus de influenza a diferencia de las células sistémicas. Esto sugiere nuevamente que tales células se distribuyen de manera diferencial de acuerdo al sitio en el que fueron inducidas (Purwar et al., 2011).

Así, el conocimiento disponible indica que en el caso de la mucosa respiratoria, la activación de la respuesta inmune a nivel local presenta ventajas sobre la activación sistémica para el establecimiento de mecanismos de defensa antígeno específicos en la dicha mucosa. Esta característica señala a la vía de inmunización mucosal, particularmente la vía intranasal, como una ruta de inmunización de relevancia para la inducción de profilaxis frente a aquellos patógenos restringidos a la mucosa respiratoria o cuya vía de ingreso al organismo sea a través de este camino. Asimismo, el estudio de la respuesta promovida por la estimulación intranasal indica que esta vía de estimulación no sólo confiere mecanismos específicos de protección local sino además, que los mismos pueden mantenerse durante largos períodos de tiempos (Scheerlinck et al., 2006).

En los últimos años las evidencias indican que la protección de sitios mucosales es mejor conseguida a través de la inmunización mucosal han ubicado a la vacunación mucosal como una alternativa de interés para a múltiples patógenos (Otczyk & Cripps, 2010). Además de las ventajas inmunológicas mencionadas, la inmunización mucosal implica una administración no invasiva.

Esto limita la necesidad de dispositivos de aplicación y transforma a la inmunización en un proceso que no requiere agujas. Esto resulta ventajoso por distintos motivos. Por un lado minimiza el riesgo de transmitir enfermedades que existe en la aplicación tradicional. Por otra parte, mejora la aceptación de la vacunación en la población lo cual resulta relevante considerando el número creciente de vacunas de las que se dispone actualmente y que son normalmente incluidas en los Esquemas Nacionales de Vacunación. La facilidad de la aplicación requiere además de personal con menor adiestramiento disminuyendo los costos y favoreciendo el diseño de campañas y planes de vacunación (Kersten & Hirschberg, 2007; Mitragotri, 2005).

Cada una de estas características han impulsado la creciente investigación y desarrollo de la vacunación mucosal a fin de obtener inmunidad protectora frente a agentes virales y bacterianos responsables de patologías intestinales, respiratorias, y génito-uritarias (Czerkinsky & Holmgren, 2010). Los desarrollos en el campo de la vacunación mucosal son diversos y cubren distintos aspectos del diseño de una formulación vacunal. Entre ellos podemos mencionar, por ejemplo, la búsqueda de compuestos adyuvantes que permitan superar los fenómenos regulatorios propios de distintas mucosas de forma de generar una respuesta inmune apropiada (Vajdy & Singh, 2005). Por otro lado también están en evaluación diversos sistemas de administración que permitan preservar a los antígenos de los ambientes degradativos de algunas mucosas de forma y facilitar a su vez el acceso de los mismos a la región mucosal deseada (Lawson, Norton, & Clements, 2011). Si bien en la mayoría de los casos los avances realizados se mantienen aún en el nivel experimental, la existencia de algunas vacunas de administración oral e intranasal licenciadas para su uso en humanos muestra que la vacunación mucosal es una alternativa posible (Czerkinsky & Holmgren, 2010).

Como hemos señalado anteriormente, la estimulación de la inmunidad innata en la mucosa respiratoria es vital para establecer una respuesta de defensa rápida frente a los microorganismos patogénicos y dirigir la activación de la inmunidad adaptativa. A continuación, describiremos las herramientas que posee la mucosa respiratoria para el reconocimiento patogénico, el paso inicial de la activación de la inmunidad innata, y su vinculación con el desarrollo de la respuesta adaptativa

haciendo hincapié en los receptores tipo toll (TLR) que serán una eje central de este trabajo de tesis.

Mecanismos de reconocimiento microbiano en la mucosa respiratoria: los receptores TLR y su importancia.

Ante la invasión microbiana, el entorno regulatorio de la mucosa destinado a mantener las condiciones homeostáticas debe ser revertido para dar lugar al establecimiento de los mecanismos de defensa. La activación de la inmunidad innata tiene un rol central en dicho proceso y ocurre mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos receptores tienen la capacidad desencadenar la expresión de un programa genético caracterizado por la producción de compuestos antimicrobianos y distintos factores como citoquinas y quimoquinas que participan en la inducción de la inmunidad innata y la orquestación de la inmunidad adaptativa. Los distintos receptores de reconocimiento de patrones representan un eslabón esencial en el desarrollo de una respuesta inmune apropiada para la eliminación del patógeno (Janeway & Medzhitov, 2002).

Existen distintas familias de PRR: los TLR y dos familias de receptores citosólicos recientemente descritos, los RLRs (RIG-I-like receptors) y los NLRs (Nod-like receptors) (Kumar, Kawai, & Akira, 2011). Miembros de cada una de estas familias contribuyen a la defensa de la mucosa respiratoria frente a patógenos específicos. Sin embargo, el conocimiento del rol de los NLRs y los RLRs en el direccionamiento de la respuesta inmune en las infecciones respiratorias es aún incipiente. Como mencionamos anteriormente, en este trabajo nos focalizaremos en analizar la participación de distintos TLR a la defensa de la mucosa respiratoria por lo cual vamos a describir en mayor profundidad el conocimiento actual sobre estas vías de reconocimiento patogénico y su relación con el direccionamiento de la respuesta inmune adaptativa.

La familia TLR ha sido la primera en ser descrita y es por ende la más estudiada hasta el momento (Janeway & Medzhitov, 2002; Kumar et al., 2011). Estos receptores son proteínas transmembrana tipo-1, con un dominio extracelular rico en secuencias repetitivas de leucinas (LRR) encargado de la interacción con el

PAMP. Estos receptores constan además de un dominio citosólico compartido con el receptor de IL-1, el dominio TIR, encargado de iniciar la transducción de señales. En su mayoría, se expresan en forma de homodímeros aunque algunos receptores tienen la capacidad de actuar también como heterodímeros. Hasta el presente, 12 TLR funcionales han sido descritos en ratones y 10 en humanos, siendo los receptores TLR-1 al TLR-9, conservados entre especies (Janeway & Medzhitov, 2002).

De acuerdo al tipo de ligando que reconocen y a su localización dentro de la célula, los TLR pueden ser divididos en dos grupos. En **el primer grupo** encontramos aquellos receptores que se expresan en la membrana celular y que reconocen componentes de las superficies microbianas incluyendo lípidos, lipopolisacáridos, lipoproteínas y proteínas. En este grupo se encuentran TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 y TLR-11.

TLR-2 y TLR4 son importantes para la protección frente a infecciones bacterianas (Takeuchi, Hoshino, & Akira, 2000; Wieland, van Lieshout, Hoogendijk, & van der Poll, 2011). TLR-2, frente a bacterias gram positivas a través del reconocimiento del componente estructural de su pared, el peptidoglicano y TLR-4, frente a bacterias gram negativas a través del reconocimiento de lipopolisacárido que forma parte de la membrana externa de este tipo de microorganismos.

TLR-2 ha sido implicado en el reconocimiento de otros ligandos a través de la formación de heterodímeros. De esta manera, es relevante también en el marco de infecciones por otros tipos de microorganismos como las micobacterias, mediante el reconocimiento de lipopéptidos diacilados por TLR-2/TLR-1 o de bacterias gram negativas mediante la formación de TLR-2/TLR-6 que reconoce lipopéptidos triacilados (Farhat et al., 2008). Asimismo, ha sido implicado en el reconocimiento de micobacterias a través del lipoarabinomanano, de hongos a través del zymosano, de tGPI-mucina de *Trypanosoma cruzi* y de la hemaglutinina del virus de la viruela (West, Koblansky, & Ghosh, Sankar, 2006).

Para TLR-4 también se han encontrado otros ligandos como ser la proteína de fusión del virus sincisial respiratorio y la pneumolisina de *S. pneumoniae*, aunque la forma en la que interactúan con el receptor así como las respuestas desencadenadas no están claramente demostradas (Kawai & Akira, 2010). Algunos trabajos sugieren además, que éste y otros receptores tipo toll son capaces de interactuar con ligandos endógenos (Sandri et al., 2008).

El receptor TLR-5 por su parte, interviene en el reconocimiento de bacterias flageladas a través de la interacción con la flagelina, el monómero estructural de los flagelos. Su señalización contribuye a la defensa de diversos agentes infecciosos como *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* y *Salmonella spp* (Vijay-Kumar, Aitken, & Gewirtz, 2008).

Inicialmente, TLR-11 fue descrito como un receptor que participa en la defensa de las infecciones urinarias. Recientemente también se lo ha implicado en la respuesta a parásitos protozoarios como *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky et al., 2005) siendo el ligando la profilina, proteína que contribuye a la polimerización de los filamentos de actina y la consecuente movilidad y capacidad invasiva de este tipo de parásitos (Plattner et al., 2008).

El **segundo grupo de TLR** incluye a TLR-3, TLR-7, TLR-8 y TLR-9, que se expresan en vesículas endosomales y en el retículo endoplásmico y se caracterizan por reconocer ácidos nucleicos de distintos microorganismos. TLR-9 está involucrado en el reconocimiento de secuencias de ADN no metiladas conteniendo 2'-desoxiribo (citidinafosfato-guanosina) (CpG), motivos que son frecuentes en bacterias y virus pero que son raros en mamíferos. Los otros receptores de este grupo están asociados a la detección de patrones moleculares de virus de ARN. El receptor TLR-3 reconoce ARN de doble hebra que se produce durante el proceso de replicación viral. Los receptores TLR-7 y TLR-8 por su parte, han sido implicados en el reconocimiento de ARN de simple hebra ricos en secuencias Guanina-Uracilo (Hemmi, Kaisho, Takeda, & Akira, Shizuo, 2003; Jurk et al., 2002).

Como hemos visto, los receptores TLR son capaces de reconocer bacterias, virus, hongos y parásitos. Esta diversidad de reconocimiento es una de las características que los distingue de otras familias de receptores de la inmunidad innata. El desarrollo de respuestas apropiadas contra el patógeno sentido se logra gracias a una señalización que implica el reclutamiento diferencial de moléculas adaptadoras. Las vías implicadas incluyen la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y de factores de transcripción NFκB y los factores regulados por interferón (IRF) (Colonna, 2007).

Hasta la actualidad han sido descritos 4 adaptadores: gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), proteína adaptadora con dominio

TLR que contiene el dominio (TIRAP), proteína adaptadora con dominios TIR inductora de interferón (TRIF) y molécula adaptadora de TRIF (TRAM) (Kenny & O'Neill, 2008). Dos de estas moléculas, MyD-88 y TRIF, funcionan como adaptadores centrales que determinan vías de señalización diferenciales clasificadas como MyD-88 dependientes y MyD-88 independientes (o TRIF dependientes) de acuerdo al empleo de uno u otro adaptador. Las proteínas TIRAP y TRAM funcionan como adaptadores accesorios empleados por TLR-2 y TLR-4 que permiten el reclutamiento de MyD-88 y TRIF respectivamente. En la Figura 1 se presenta un esquema de las vías de señalización TLR con distinción los receptores que emplean vías MyD-88 dependientes y MyD-88 dependientes.

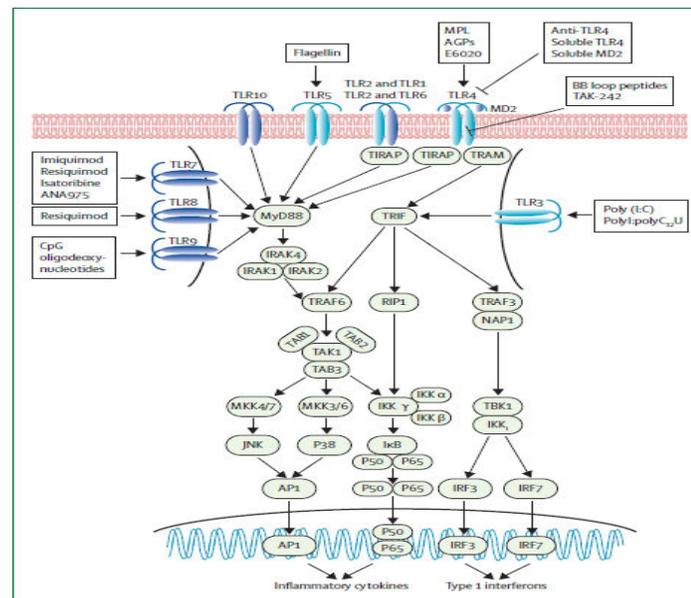


Figura 1: Receptores tipo toll y las vías de señalización MyD-88 dependientes y TRIF dependientes. Tomado de M. Hedayat et al. 2011

Todos los TLR, a excepción de TLR-3, utilizan el adaptador MyD-88. Sin embargo, no todos los receptores son exclusivamente TRIF dependientes o MyD88- dependientes: TLR-4 es capaz de señalizar a través de estos dos adaptadores. Esta misma situación ha sido recientemente descrita para la señalización de TLR-5 en células mieloides y en células epiteliales intestinales (Choi, Im, Chung, Pothoulakis, & Rhee, Sang Hoon, 2010).

Tanto las vías MyD-88 dependiente como las independientes conducen a la activación del factor de transcripción NF κ B a través de la vía canónica (Janeway & Medzhitov, 2002) aunque con diferente intensidad y cinética: las primeras en forma temprana y las segundas en forma tardía (Covert, Leung, Gaston, & Baltimore, David, 2005). Además, existen evidencias de que ambas vías, dependiendo del ligando y tipo celular, pueden conducir a la activación de los factores de transcripción IRF. Como se observa en la Figura 2, que detalla la localización subcelular de los distintos TLR y las vías de señalización empleadas, la activación de TRIF a través de TLR-3 y TLR-4 conduce a la activación de IRF-3 y a la inducción de genes de interferones tipo I y genes de quimoquinas (Yamamoto et al., 2003). Por su parte, el reclutamiento de MyD-88 en respuesta a la activación de TLR-2 en los monocitos inflamatorios culmina en la inducción de interferones tipo I a través de la activación de IRF-3 e IRF-7 (Barbalat, Lau, Locksley, & Barton, Gregory M, 2009). De manera análoga TLR-7 y TLR-9 también señalizan a través de MyD-88. En las células dendríticas plasmocitoides, que se caracterizan por la producción de interferones tipo I, la activación de estos receptores conduce a la activación de IRF-7 (Kawai & Akira, 2010). Algunos trabajos han descrito que la activación de MyD-88 puede conducir también a la activación de otro factor de transcripción de la familia de los IRF: IRF-5. Esta molécula participaría de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF- α e IL-12p40 (Ouyang et al., 2007).

Un aspecto notable de la biología de los TLR, que también se ejemplifica en la Figura 2, es que tanto el ligando reconocido como la vía de señalización empleada están en relación con su localización sub-celular (Kawai & Akira, 2011). Mientras que los receptores presentes en la superficie celular reconocen ligandos de la pared bacteriana e inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias, los que se expresan en el compartimento endosomal, TLR-3, TLR-7 y TLR-9, detectan ácidos nucleicos y promueven la producción de interferones tipo I, moléculas claves para la defensa antiviral (Kawai & Akira, 2007). Los receptores TLR-7 y TLR-9 señalizan desde un compartimento endosomal donde emplean a MyD-88 para activar IRF-7 (Honda et al., 2005), mientras que TLR-3 señala a partir de otro compartimento endosomal donde promueve la activación IRF-3 a través de la vía TRIF-dependiente (Yamamoto et al., 2003)

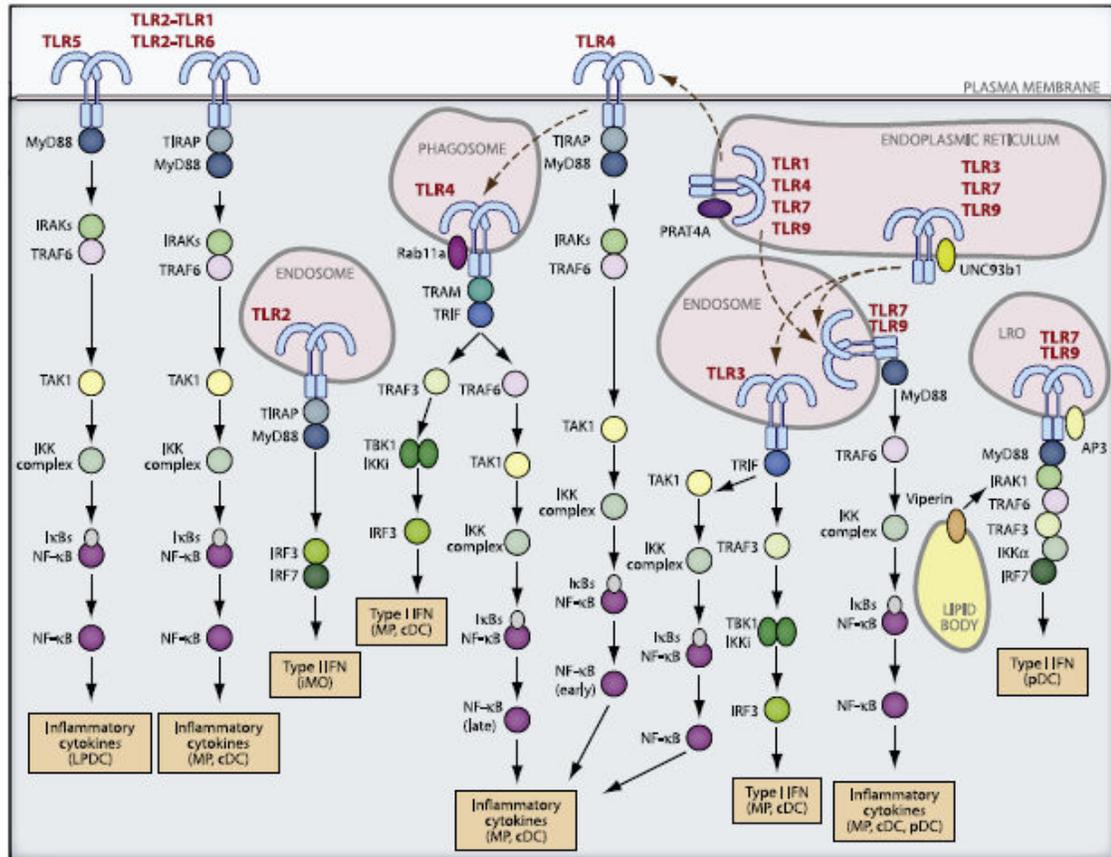


Figura 2: Tráfico y señalización de los receptores TLR. (Kawai & Akira, 2011)

Así, la activación de los receptores TLR desencadena una serie de eventos que involucran la producción de mediadores solubles destinados a promover el reclutamiento, la activación y la comunicación entre los diversos tipos celulares necesarios para la orquestación de los mecanismos de defensa del huésped. Entre las células reclutadas se encuentran las células presentadoras de antígenos profesionales, que son capaces de integrar las señales generadas por la activación de la inmunidad innata y promover la respuesta adaptativa subsecuente. De esta forma, ambos tipos de respuestas están íntimamente relacionadas. La activación efectiva de la inmunidad innata, así como las características desarrolladas, condicionan el establecimiento y las propiedades de la respuesta adaptativa, capaz de brindar protección frente a encuentros sucesivos con un mismo patógeno. De esta forma, los receptores TLR son actores claves en el establecimiento de la inmunidad antimicrobiana convirtiendo a los agonistas TLR

en potenciales adyuvantes para el diseño de formulaciones vacunales sistémicas y mucosales.

Frente a muchos agentes infecciosos, la resolución de la infección resulta en la inducción de inmunidad protectora. En estos casos, el diseño de vacunas que permitan emular el proceso infeccioso parece una estrategia razonable para obtener formulaciones efectivas. De hecho esto ha sido realizado para distintos patógenos mediante el desarrollo de vacunas celulares que emplean microorganismos atenuados o muertos. Este es el caso de las vacunas para la prevención de la rubéola, el sarampión, la viruela y paperas entre otras, las cuales han sido administradas ampliamente entre la población y han conseguido un buen control de las patologías correspondientes. En el diseño de formulaciones vacunales basadas en componentes o subunidades microbianas esta estrategia presenta mayor complejidad pero podría ser conseguida mediante el empleo de agonistas TLR pertinentes. En este sentido, el estudio de las vías de reconocimiento que son activadas en el contexto de la infección y el discernimiento sobre su relevancia para la defensa del huésped resulta de interés para la elección de potenciales adyuvantes y el diseño racional de tales estrategias (Guy, 2007).

En las secciones siguientes revisaremos el conocimiento existente sobre la participación de los TLR en los eventos iniciales de reconocimiento patogénico y su relación con la respuesta inmune adaptativa.

Los receptores TLR en la interacción huésped-patógeno.

Las interacciones huésped-patógeno son fenómenos complejos en las cuales factores de ambas partes se involucran dinámicamente en una sucesión temporal y espacial que determina el resultado de la interacción: la eliminación del microorganismo o el establecimiento de la infección y el desarrollo de la enfermedad. Esta interacción es difícil de estudiar en su globalidad y aunque existe información, el entendimiento sobre la biología de las infecciones respiratorias es aún insuficiente.

La mayoría de la información existente sobre la interacción temprana entre el patógeno y el huésped y la importancia del evento de reconocimiento patogénico proviene del estudio de infecciones en modelos animales con deficiencias en la

funcionalidad de receptores TLR (S Akira, 2000). Sin embargo, los TLR también han mostrado ser relevantes en el hombre como lo señala la asociación entre ciertos polimorfismos para estos receptores y el aumento de la susceptibilidad a infecciones (Agnese et al., 2002; Hawn et al., 2003; Lorenz, Mira, Cornish, Arbour, & Schwartz, 2000). En la actualidad algunos agonistas TLR son empleados como herramientas terapéuticas en humanos (Diamantis, Bartlett, & Tying, 2009).

Un aspecto interesante observado para algunos patógenos es que a pesar de que los microorganismos expresan simultáneamente varios patrones moleculares que pueden ser reconocidos a través de distintos receptores innatos, un único receptor puede jugar un rol preponderante en el control de la infección. Así, TLR-2 resulta importante para el control de las infecciones causadas por bacterias gram positivas tales como *Staphylococcus aureus* (O Takeuchi et al., 2000) y *Lysteria monocytogenes* (D. Torres et al., 2004). De manera análoga, el empleo de animales deficientes para TLR-4 ha puesto de manifiesto el rol de este receptor en el control de las infecciones originadas por un gran espectro de bacterias gram negativas incluyendo *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Eschericia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y *Bordetella* (Schurr et al., 2005; X. Wang et al., 2002).

En contraposición, la defensa frente a otros microorganismos parece orquestarse por la acción conjunta de varios receptores TLR. En algunos casos distintos receptores actúan en forma complementaria. Esto se ha observado en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en donde los animales deficientes en TLR-2 y TLR-9 presentan mayor susceptibilidad a la infección respecto de los knock out para uno sólo de estos genes (Bafica et al., 2005). En otros casos, los receptores involucrados parecen tener efectos redundantes como ocurre con TLR-2, TLR-4 y TLR-5 en el establecimiento de la defensa frente al patógeno respiratorio *Pseudomonas aeruginosa* (Skerrett et al., 2006). Una situación similar ha sido descrita para la infección por *Legionella pneumophila*: mientras la ausencia funcional del receptor TLR-2 genera deficiencias en el control de la infección, la deficiencia adicional en TLR-5 o TLR-9 no exacerba el fenotipo a pesar de que los tres receptores participan en el reconocimiento de esta bacteria (Archer, Alexopoulou, Flavell, & Roy, 2009).

Los mecanismos inducidos por distintas vías de señalización TLR pueden participar en la defensa frente distintos patógenos. Así no sólo la activación de MyD-88 a través de distintos receptores TLR puede tener efectos cooperativos. También se ha observado que la activación de receptores que emplean vías MyD-88 dependientes y vías TRIF dependientes pueden actuar conjuntamente en el establecimiento de la respuesta inmune. Esto ocurre en la infección respiratoria causada por *K. pneumoniae* en la que la activación de las vías MyD-88 y TRIF dependientes son necesarias para el control de la patología (Cai et al., 2009).

Así como distintos receptores TLR pueden colaborar entre sí en la defensa de la mucosa respiratoria recientemente se ha descrito la colaboración entre los TLR y otros receptores innatos pertenecientes a diversas familias de PRR. En la infección por *L. pneumophila* tanto los receptores TLR como los NOD y Naip5, el sensor intracelular de flagelina, participan en el reconocimiento microbiano proporcionando distintos grados de protección frente a la infección (Archer, Ader, Kobayashi, Flavell, & Roy, 2010).

Además, se ha observado que distintos receptores TLR pueden participar en la detección microbiana activándose secuencialmente. Por ejemplo, TLR-5 es importante para la regulación de la infiltración neutrofílica a las 6 h post-infección pero no a las 24 h o a tiempos posteriores durante la infección por *L. pneumophila* (Hawn et al., 2007). En la infección por *K. pneumoniae* en la que varias vías MyD-88 dependientes cooperan en la defensa del huésped, los receptores TLR-4 y TLR-9 tienen funciones específicas en momentos diferentes de la infección (Bhan et al., 2010). Evidencias similares se han observado en relación a TLR-4 y TLR-2 en la infección por *Salmonella* (Weiss, Raupach, Takeda, Akira, & Zychlinsky, 2004).

Se ha descrito también que el rol de algunos receptores puede depender de la ruta y del modelo de infección analizado. Así, por ejemplo, para *S. aureus* TLR-2 es relevante para el control de la infección sistémica así como la respiratoria, la cutánea y la ocular (Gerold, Zychlinsky, & de Diego, 2007; O Takeuchi et al., 2000) pero no resulta relevante en el modelo de infección cerebral (Kielian, Haney, Mayes, Garg, & Esen, 2005). Algo análogo ocurre con *S. pneumoniae*, para el cual TLR-2 es significativo en el control de la infección respiratoria, pero no en la meningitis (Echchannaoui et al., 2002; Knapp et al., 2004). Estos ejemplos sugieren la existencia de diferencias en los mecanismos de

control de las interacciones huésped-patógeno en distintos compartimentos anatómicos, lo cual es un factor más a tener en cuenta para el diseño de profilaxis inmunológica frente a un microorganismo dado.

Todo lo antes expuesto nos muestra que cada interacción patógeno huésped es un evento complejo con características específicas que deben ser analizadas en forma particular. Es por ello que el diseño de estrategias profilácticas basadas en la inmuno-intervención debe ser estudiado en forma puntual para cada patógeno y contexto infeccioso. La identidad de las vías de reconocimiento que participan, así como la forma en que contribuyen a la inducción de la defensa antimicrobiana, es una situación exclusiva de cada patógeno.

Los receptores TLR y la regulación de la respuesta adaptativa.

La activación de la respuesta inmune adaptativa y la consecuente generación de células de memoria es el mecanismo por el cual el sistema inmune protege a los organismos frente a sucesivos encuentros con un mismo agente patogénico. Para que dicha activación ocurra, los linfocitos T *naive*, y en particular los T CD4+, que son los organizadores de la respuesta adaptativa, tienen que recibir varias señales simultáneamente. La inmunidad innata es la que provee dichas señales, generando un entorno pro-inflamatorio con mediadores solubles claves para la activación de las células T. A su vez, esta respuesta recluta las células presentadoras de antígeno profesionales (células dendríticas) al sitio de infección, en donde son activadas y capacitadas funcionalmente para activar a los linfocitos T en los ganglios linfoides drenantes o en la propia mucosa.

Los receptores TLR son importantes en la inducción de estos eventos debido a su capacidad de activar a las células dendríticas. En general este proceso requiere de una señal principal, que es la activación directa de los TLR expresados en la propia célula. Las células dendríticas pueden expresar diversos receptores TLR, dependiendo del subtipo considerado, de su capacidad funcional y de su localización tisular (Blander & Medzhitov, 2006). En muchos casos esta activación inicial es reforzada a través de mediadores solubles que se producen como consecuencia de la activación de receptores TLR en otras células de la inmunidad

innata, tales como células epiteliales o los macrófagos alveolares en el caso de la mucosa respiratoria (Hammad & Lambrecht, 2011).

Como resultado de la señalización TLR, en las células dendríticas se desencadena un programa de maduración y activación. Este proceso involucra el aumento de la expresión tanto de moléculas co-estimuladoras y de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad así como el aumento del procesamiento peptídico y la consecuente presentación antigénica y la producción de citoquinas (Banchereau et al., 2000; Shortman & Liu, 2002). La activación de los receptores TLR permite además a las células dendríticas discriminar entre antígenos propios y no propios conduciendo primordialmente estos últimos a la presentación en moléculas de MHC II y promoviendo la respuesta adaptativa hacia el agente microbiano (Blander & Medzhitov, 2006). La conjunción de estos eventos capacita a la célula dendrítica para la activación antígeno específica de las células T. Esto conduce a la expansión clonal y a la adquisición de un perfil efector particular (Th1, Th2, Th17 u otro) que dependerá no sólo de las de las señales que llevaron a la activación de la célula dendrítica sino también del entorno en el que ocurre la activación inicial (Pasare & Medzhitov, 2005a).

La mayoría de los TLR han sido asociados a la generación de un perfil de respuesta Th1 a excepción de TLR-2 y TLR-5 que inducen un perfil mixto Th1/Th2. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la activación de distintos receptores TLR en el entorno mucosal dirige la respuesta hacia un perfil Th17. Esta respuesta efectora es inducida por la inmunización intranasal con agonistas de TLR-2 o TLR-9 (Zygmunt, Rharbaoui, Groebe, & Guzman, Carlos A, 2009). Así mismo, el reconocimiento de LPS y TLR-5 en la mucosa intestinal genera una respuesta mixta Th1/Th17 (Mcaleer & Vella, 2011; Uematsu et al., 2008).

Además de inducir una respuesta inmune adaptativa activando las células dendríticas y proporcionando las condiciones al microambiente, los receptores TLR también pueden actuar directamente sobre las células linfocitarias. En el caso de los linfocitos T existen variaciones tanto en los perfiles de expresión de los receptores como en las respuestas promovidas por su activación de acuerdo a la población en cuestión. Así parece haber diferencias dependiendo del grado de diferenciación celular (célula naive vs célula de memoria) y de su perfil funcional (células efectoras vs células reguladoras) (G. Liu, Zhang, & Zhao, 2010).

En las células *naive*, la estimulación TLR parece tener funciones co-estimuladoras reforzando las señales inducidas por el receptor de reconocimiento antigénico (TCR) durante la activación. Así, los ligandos de TLRs Pam3CysSK4 (TLR-1/TLR-2), Poly I:C (TLR-3), flagelina (TLR-5), R-848 (TLR7/8) y CpG (TLR9) pueden directamente promover la supervivencia, la proliferación, la producción de citoquinas y la actividad citotóxica de células T murinas en cultivo (Caron et al., 2005; Gelman, Zhang, Choi, & Turka, Laurence A, 2004).

En distintos contextos infecciosos también se han evidenciado estos fenómenos. Por ejemplo, en la patología causada por *T. gondii* y vaccinia virus, la ausencia de señalización TLR en los linfocitos compromete la capacidad de la respuesta adaptativa de controlar al agente microbiano (LaRosa et al., 2008; Yuan Zhao et al., 2009). Por su parte, la administración de CpG en protocolos de inmunización experimentales aumenta la producción de anticuerpos específicos por acción directa sobre las células T (Gelman 2006).

En el caso de los linfocitos T regulatorios, las evidencias sobre el rol de los receptores TLR aún es limitada y en algunos casos contradictoria. Algunos receptores parecen ser relevantes para limitar la respuesta supresora de estas células, facilitando la inducción de una respuesta efectora tanto en contextos de infección como de vacunación. Este efecto, en algunos casos, puede ser conseguido indirectamente por la co-estimulación TLR de la célula T efectora lo que la vuelve más resistente a la acción reguladora como ocurre con TLR-9 (Chiffolleau et al., 2007). Por su parte, otros receptores como TLR-2 o TLR-5, parecerían contribuir a la funcionalidad supresora de los Tregs. Así, en el marco de una infección, los receptores TLR pueden modular la respuesta inmune adaptativa del huésped expandiendo la población T efectora y reduciendo, en forma transiente, la funcionalidad de las células regulatorias directa o indirectamente.

Los receptores TLR también pueden determinar la respuesta adaptativa del huésped modulando la magnitud y el perfil de la respuesta humoral. La evidencia al respecto es creciente y muestra la participación de estos receptores en la proliferación de las células B, el cambio de isotipo, la maduración de la afinidad, la diferenciación terminal a células plasmáticas y la producción de citoquinas (Bekeredjian-Ding & Jengo, 2009).

La participación de los TLR puede ocurrir tanto directa como indirectamente. Por un lado, los receptores TLR activan y dirigen el perfil de los linfocitos T helper

necesarios para la colaboración B-T en el centro germinal, la inducción del cambio de isotipo y la maduración de la afinidad en la respuesta a antígenos T dependientes. Además, la activación de receptores TLR en las células adyacentes induce la expresión y la liberación al medio de factores solubles que intervienen en el proceso de activación. En particular, las células epiteliales que sensan la presencia microbiana vía TLR secretan las citoquinas BAFF y APRIL, activando las células B presentes en la periferia y promoviendo el cambio de isotipo (B. He et al., 2007; Xu et al., 2007). Por otro lado, las células B también expresan receptores TLR sugiriendo su participación directa en la regulación de la respuesta humoral, aunque el perfil de receptores expresados puede variar entre especies y entre subtipos celulares dentro de una misma especie.

La activación TLR en las células B conduce a la activación de NF κ B y la expresión de la enzima citidina deaminasa inducida por activación (AID) que participa en el cambio de isotipo. Así por ejemplo en respuesta a la inmunización con OVA en un modelo murino la activación TLR en la propia célula B resulta necesaria para la producción de anticuerpos IgM, IgG2c y IgG1, mientras que la expresión de IgE e IgA es independiente. Estos datos indican que los TLR *per-se* son capaces de modular el perfil de respuesta humoral y que esto puede ocurrir en forma directa o indirecta (Pasare & Medzhitov, 2005a). En el mismo sentido, animales que son incapaces de señalar apropiadamente a través de receptores TLR (MyD88-deficientes) presentan una disminución en los niveles de anticuerpos tipo 1 (IgG2a/c, IgG2b e IgG3) en respuesta a la infección con *Borrelia burgdorferi*, *Leishmania major*, influenza virus o *S. pneumoniae* (Heer et al., 2007; Khan, Chen, Wu, Paton, & Snapper, Clifford M, 2005).

Los receptores TLR también contribuyen al proceso de maduración de la afinidad. La inactivación de ligandos TLR en una formulación vacunal de virus sincicial respiratorio condujo al desarrollo de anticuerpos de baja afinidad que no resultaron protectivos (Delgado et al., 2009).

Recientemente, Kasturi demostró que la administración simultánea de agonistas de TLR-4 y TLR7 en combinación con antígenos vacunales resulta en un incremento en la magnitud y persistencia de la respuesta humoral como consecuencia de la persistencia de los centros germinales y células plasmáticas. Además, estos efectos fueron dependientes de la activación de receptores en los tres tipos celulares involucrados en la generación de anticuerpos en forma T

dependiente: las células dendríticas, los linfocitos T y los linfocitos B (Kasturi et al., 2011).

En resumen, todo lo señalado indica que la activación de los receptores TLR tiene un impacto directo en la magnitud y calidad de la respuesta adaptativa, tanto celular como humoral, modulando además el perfil y la duración de la misma. Las células dendríticas, son los actores principales en este proceso, integrando las señales del reconocimiento microbiano y transmitiendo la información a las células leucocitarias. A su vez, la activación de los receptores TLR en las propias células de la inmunidad adaptativa, los linfocitos T y B, y en otros tipos celulares también contribuye a este proceso. De esta forma estos receptores representan piezas fundamentales de conexión entre la inmunidad innata y la adquirida indicando que es posible dirigir la inducción de una respuesta adaptativa deseada a través de la manipulación de la inmunidad innata y situando a los agonistas TLR en un papel central en esta estrategia. Si bien la mayor parte de las actividades relacionadas con este campo están en situación experimental algunos candidatos ya han sido licenciados y funcionan actualmente en la práctica clínica humana.

Los receptores TLR, sus agonistas y las vacunas.

Aunque el conocimiento de la existencia de los receptores TLR y la identificación de sus ligandos sólo tiene unos pocos años, estos han contribuido a la inmunogenicidad vacunal desde el inicio de la vacunología. Formulaciones con microorganismos enteros como en el caso de la BCG, la vacuna celular anti-pertussis, la de la fiebre amarilla, entre otras, contienen múltiples ligandos de TLR. En particular, nuevos enfoques en el estudio vacunal han señalado que el éxito de la vacuna a virus atenuado contra la fiebre amarilla es debido, al menos en parte, a su capacidad de activar diversos receptores TLR (Querec et al., 2006). Hoy en día la tendencia creciente hacia al desarrollo de vacunas a subunidades ha incrementado la necesidad de hallar compuestos inmunoestimuladores poniendo en escena a los ligandos TLR. Además, la búsqueda creciente de nuevas vías de administración vacunal que mejoren la protección frente al agente infeccioso y que simplifiquen los aspectos relacionados con su aplicación, han hecho significativa la

exploración de la vacunación mucosal como una alternativa pausable. Esta estrategia resulta de interés por varios aspectos entre ellos la capacidad de inducir mecanismos inmunológicos efectores propios del sistema inmune mucosal como la producción de IgA secretoria. Además, la activación de la respuesta inmune en el contexto mucosal genera un patrón de migración leucocitaria propio que permite a las células que son activadas en los órganos linfoides drenantes repoblar las distintas mucosas, principalmente la mucosa de origen, donde pueden ejercer sus funciones o diferenciarse a células de memoria. Así, la inmunización mucosal resulta de interés para situar las herramientas de defensa en la principal puerta de ingreso de los agentes patogénicos favoreciendo la protección. Este tipo de inmunización sería relevante además para la prevenir no sólo la enfermedad sino la infección a diferencia de la inmunización sistémica que, en general, sólo previene las formas más severas de las patologías infecciosas.

Hasta la actualidad sólo una vacuna de administración mucosal ha sido ampliamente distribuida entre la población general: la vacuna a virus vivo atenuado del poliovirus de administración oral. Algunos otros ejemplos existen como el caso de las vacunas orales frente a patógenos entéricos como *V. cholerae*, rotavirus o *S. Typhi* que mostraron una eficacia protectora superior al 70 % dentro de los tres años de seguimiento y que han contribuido significativamente a la inmunidad de la población por el efecto conocido como “*herd immunity*”. También ha sido licenciada una vacuna de aplicación intranasal contra el virus de influenza (FluMist®. MedImmune), la cual presenta una efectividad comparable a la de la vacuna administrada por vía parenteral (Belshe, Lee, Walker, Stoddard, & Mendelman, 2004).

Varios de los aspectos por los que la vacunación mucosal aún no ha tenido mayor desarrollo radican en que ha sido difícil establecer una relación efectividad-seguridad adecuada. En este contexto, encontrar adyuvantes que puedan ser empleados por esta vía se vuelve relevante. De acuerdo a las evidencias mencionadas anteriormente, los agonistas TLR merecen atención como potenciales adyuvantes mucosales por su capacidad de revertir el estatus regulatorio característico de las mucosas y generar condiciones adecuadas de inducción de respuesta adaptativa y memoria inmunológica. Sin embargo, dados sus aspectos pro-inflamatorios la generación de efectos adversos debe ser contemplada cuidadosamente.

Aunque la utilización de agonistas TLR como adyuvantes en formulaciones de administración mucosal permanece en el plano experimental actualmente se ha licenciado para su uso en humanos por vía parenteral el monofosforil lípido A o MLP de *Salmonella minnesota*. Esta porción del LPS de *S. minnesota* interactúa con TLR-4 y es capaz de aumentar la respuesta de anticuerpos, facilitar la expansión de células T y generar una respuesta de memoria sin causar efectos colaterales de consideración (Casella & Mitchell, 2008). Su toxicidad es aproximadamente el 0.1% de la correspondiente al LPS y presenta un perfil de seguridad similar al de las sales de aluminio, el adyuvante mayormente utilizado en humanos. Desde hace poco tiempo este adyuvante ha sido incluido en las formulaciones vacunales de Fendrix® y Cervarix® (GlaxoSmithKline) contra el virus de la hepatitis B y el virus de papiloma humano respectivamente. Esto confirma la factibilidad del empleo de agonistas TLR como agentes inmunoestimuladores en el desarrollo de adyuvantes vacunales aunque su empleo sigue estando, en la mayor parte de los casos, en etapas experimentales.

En términos generales hasta aquí hemos establecido los conceptos básicos sobre los que se basan los trabajos realizados en esta tesis, centrado en las infecciones respiratorias y los mecanismos de defensa mucosales. Hemos empezado señalando la problemática que representan tales infecciones y el impacto que tienen actualmente sobre la población mundial. En este contexto, la aparición de las vacunas para varios de sus agentes causales y su aplicación masiva ha sido sumamente útil para controlar tanto la incidencia como la severidad de las mismas, manifestando la importancia de este tipo de inmuno-intervención. Actualmente el conocimiento acumulado sobre el funcionamiento del sistema inmune plantea la posibilidad emplear esta información en el diseño de nuevas y mejores formulaciones vacunales. A tal fin, uno de los aspectos centrales es la elección de la vía de inmunización. En este sentido, hemos indicado cómo las evidencias disponibles, en el plano experimental y en el plano clínico, muestran las ventajas de la vía mucosal para conferir protección frente a patógenos mucosales. Además, la existencia de compartimentalización dentro del sistema inmune de mucosas sitúa a la vía intranasal como aquella más relevante en el diseño de vacunas frente a patógenos respiratorios.

Hemos presentado también la información que sustenta la conexión existente entre la inmunidad adaptativa y la inmunidad innata señalando la posibilidad de direccionar la respuesta inmune adaptativa a través de la manipulación de la inmunidad innata y resaltando la potencialidad de los agonistas de receptores TLR a tal fin. Esta información es fundamental para el diseño vacunal y pone de manifiesto la necesidad de estudiar las vías inmunológicas involucradas en la infección y su relación con la defensa del huésped para elaborar estrategias vacunales efectivas.

En esta tesis vamos a emplear tales conceptos en la infección causada por *B. pertussis* tratando de discriminar las vías TLR que participan en la defensa del huésped durante la infección con el fin de analizar qué vías pueden ser blanco de agonistas a ser incorporados en formulaciones vacunales a fin de conferir protección.

A continuación describiremos resumidamente el estado actual del conocimiento sobre *Bordetella pertussis* y la patología que desencadena, centrándonos en la respuesta inmune del huésped y las herramientas mediante las cuales este patógeno es capaz de modular tal respuesta a fin de cumplir su ciclo de infección.

***Bordetella pertussis* y la tos convulsa: generalidades y situación epidemiológica actual.**

B. pertussis es una bacteria aerobia gram negativa, perteneciente al género *Bordetellae*. Este patógeno causa en el hombre una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa conocida como tos convulsa, pertussis o coqueluche. Esta patología inmunoprevenible afecta preferentemente a los niños menores de 1 año de edad, quienes desarrollan los casos más severos, aunque también se presenta en la población adolescente y adulta. A pesar de la existencia de vacunas y planes de vacunación masiva desde hace más de 50 años, la tos convulsa continua siendo una problemática vigente para la salud pública. En la actualidad esta enfermedad constituye una de las diez primeras causas de mortalidad infantil asociadas a enfermedades infecciosas. Aproximadamente entre el 75% y el 90% de los niños menores de 6 meses que padecen pertussis requieren hospitalización

correspondiendo a individuos de este grupo etario el 90% de las muertes debidas a esta patología (Mattoo & Cherry, 2005; de Greeff, Mooi, Schellekens, & de Melker, 2008).

La enfermedad tiene una duración prolongada que varía entre 6 y 12 semanas. Su diagnóstico temprano y la implementación del tratamiento resulta fundamental para limitar la diseminación de su agente causal entre la población puesto que una persona infectada y no tratada puede transmitir la infección durante tres semanas o más después del inicio de la sintomatología.

El cuadro clínico característico aparece entre los 7 y 10 días post-infección (con un rango entre 6 y 20 días) y se presenta en tres etapas diferenciales: catarral, paroxística y de convalecencia. En la etapa inicial o catarral hay rinorrea, lacrimación y tos que, durante 7 a 14 días, va empeorando en intensidad y frecuencia hasta entrar en la fase paroxística en la cual se produce manifestación típica de la enfermedad: la tos paroxística. Al final del paroxismo ocurre un gran esfuerzo inspiratorio durante el que puede tener lugar la convulsión, de ahí el nombre de la enfermedad. Conjuntamente a este episodio pueden ocurrir cianosis, lacrimación, vómitos, exaltación de los ojos y protrusión de la lengua. Los episodios paroxísticos ocurren repetidas veces por hora durante día y noche y pueden durar de 2 a 8 semanas o más, resultando extenuante para los infantes. Como parte de las manifestaciones sistémicas los pacientes pueden presentar pérdida de peso, linfocitosis y en algunos casos hipoglucemia. El diagnóstico etiológico de la patología suele ser indicado durante este estadio aunque el diagnóstico microbiológico se vuelve progresivamente más dificultoso a medida que pasa el tiempo.

Finalmente se entra gradualmente en la etapa de convalecencia, que puede prolongarse por más de dos semanas. En este período la intensidad y la frecuencia de la sintomatología van disminuyendo hasta desaparecer aunque en algunos casos, los accesos de tos pueden persistir manera aislada durante tres o cuatro meses.

Dentro de las complicaciones comunes de la enfermedad se encuentran la neumonía, que puede deberse a *Bordetella pertussis* o ser secundaria a otro patógeno respiratorio, la otitis media, las convulsiones y las encefalopatías.

Si bien las manifestaciones descritas se corresponden con el cuadro clínico característico, la tos convulsa puede presentarse en diversas formas dependiendo de varios factores entre los que pueden mencionarse la edad, el sexo, la genética del huésped y la historia previa de vacunación y/o infección, lo cual en ciertos casos dificulta el diagnóstico adecuado de la patología.

Como hemos mencionado, para el control y prevención de la tos convulsa existen en la actualidad dos tipos de vacunas: las vacunas celulares (wP) y las acelulares (aP). Ambos tipos de formulaciones se aplican en forma combinada con al menos el toroide diftérico y el tetánico formando la vacuna triple bacteriana DTwP o DTaP según el caso. En algunas regiones el componente anti-pertussis ha sido combinada además con la vacuna contra el poliovirus o contra *H. influenzae* tipo B e incluso hepatitis B.

La vacuna celular, conteniendo la bacteria muerta y detoxificada, fue la primera en desarrollarse. Su implementación masiva a partir de 1950 permitió reducir en forma significativa la morbilidad y mortalidad asociada a pertussis (Mattoo & Cherry, 2005). Sin embargo, en los años setenta, la aceptación de la vacunación entre la población fue disminuyendo progresivamente debido a la publicidad sobre una posible asociación con diversos efectos adversos que incluyen desde la fiebre, el llanto y la irritabilidad hasta complicaciones neurológicas (Donnelly, Loscher, Lynch, & Mills, 2001). De hecho algunos países como Japón, Inglaterra se vieron obligados a interrumpir su uso con el consecuente aumento de casos. En este marco epidemiológico y con el objetivo de disminuir la reactogenicidad de estas formulaciones fueron desarrolladas nuevas vacunas conteniendo factores de virulencia de *B. pertussis* altamente purificados. Estas vacunas se conocen como vacunas acelulares o de componentes. Estas formulaciones han sido introducidas en algunos países desde hace más de 20 años, con eficacias aceptables y comparables a la vacuna celular, pero con disminución considerable de los efectos adversos favoreciendo nuevamente la aceptación de las vacunas anti-pertussis entre la población general.

Hoy día existen distintos tipos de formulaciones acelulares que varían tanto en el número de componentes activos como en sus cantidades. Las vacunas para niños pueden incluir 2, 3 y 5 componentes que se van agregando de a uno en el

siguiente orden: toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina y fimbria 2 y fimbria 3. Aunque no existe consenso sobre cuál de las formulación es conveniente emplear, parecería estar aceptado que la eficacia de las mismas aumenta al aumentar el número de componentes activos (Olin, Rasmussen, Gustafsson, Hallander, & Heijbel, 1997).

Si bien en algunas regiones la vacuna acelular ha remplazado totalmente a la celular, en otros países ambas vacunas co-existen en los Planes de Vacunación Nacional. Los esquemas de vacunación también presentan variaciones de acuerdo a la región analizada aunque todos incluyen la vacunación primaria de tres dosis administradas durante el primer año de vida (generalmente a los 2, 4 y 6 meses de edad). Esta vacunación inicial es capaz de brindar protección frente a las formas severas de la patología durante la infancia y la niñez temprana tanto si se emplean formulaciones celulares como acelulares (http://www.who.int/entity/immunization/pertussis_grad_efficacy.pdf). De acuerdo a la OMS, el 82% de los lactantes del mundo están recibiendo en la actualidad estas tres dosis primarias y esto ha evitado en 2008 aproximadamente 687.000 muertes. Seguido a este plan inicial, la OMS recomienda la inclusión de una dosis de refuerzo preferencialmente en el segundo año de vida entre los 18 y 24 meses (Who Publication, 2011) y varios países incluyen además una segunda dosis de refuerzo entre los 4 y 6 años previo a la escolarización.

Sin embargo, a pesar de la existencia de vacunas y planes de inmunización masivos la tos convulsa ha persistido en poblaciones con grandes coberturas de vacunación causando altos índices de morbilidad y mortalidad (James D Cherry, 2006; Hester E de Melker, Versteegh, Schellekens, Teunis, & Kretzschmar, Mirjam, 2006). De acuerdo a la OMS, en 2008 se originaron alrededor de 16 millones de casos de pertussis en el mundo, el 95% de los cuales tuvo lugar en países desarrollados con altas tasas de vacunación. Aproximadamente 195 mil fueron casos fatales de los cuales la mayoría correspondieron a niños no vacunados o con planes de vacunación incompletos. Sin embargo, la mayor parte los expertos señala que aún existen deficiencias en los sistemas de recopilación de datos epidemiológicos, incluso en países desarrollados, y existe consenso general acerca de que los datos oficiales señalan una incidencia de la patología por debajo de la real.

A diferencia de lo que ha ocurrido frente a otros patógenos la introducción de la vacunación no ha producido cambios en los ciclos epidémicos que presenta la tos convulsa. Estos han mantenido su periodicidad originando brotes de la patología cada 3 a 5 años los cuales son responsables de costos humanos y económicos considerables (Davis, 2005) en las distintas comunidades. Esta situación sugiere que las vacunas existentes si bien han disminuido la aparición de las formas severas de la tos convulsa no han controlado significativamente la circulación de *B. pertussis* en la población.

La vigilancia epidemiológica indica que pertussis no sólo es una enfermedad que ha persistido entre la población con altas coberturas de vacunación sino que es además una patología re-emergente: durante las tres últimas décadas se ha observado un incremento constante en el número de casos registrados tanto a nivel nacional como mundial (Forsyth, Wirsing von König, Tan, Caro, & Plotkin, Stanley, 2007; Q. He & Mertsola, 2008; D Hozbor et al., 2009). Este aumento en la incidencia ha sido asociado además con un corrimiento en los grupos etarios afectados por la patología registrándose un mayor número de casos también en adolescentes y adultos a diferencia de lo que ocurría en la era pre-vacunal en la cual el 93% de los casos correspondía a niños menores de 10 años. (Q. He & Mertsola, 2008; Wirsing von König & Riffelman, 2007; de Greeff et al., 2010). Diversos tipos de estudios epidemiológicos se han realizado para determinar la incidencia de pertussis en estos grupos etarios. Entre ellos, el diagnóstico etiológico en adolescentes y adultos con tos persistente, que indica que entre el 13% y 20% de los casos son debidos a infección por *B. pertussis* (James D Cherry, 2006). Por su parte, estudios basados en análisis serológicos han mostrado una tasa de infección anual en los países bajos del 6,6% en personas de entre 3-79 años, con mayor incidencia en el grupo de 20 a 24 años (10,8%) seguidos por los adultos de 25 a 55 años en los que la incidencia es del 6.5 % (Hester E de Melker et al., 2006). Análisis equivalentes han sido realizados en Estados Unidos en donde el 50% de los casos registrados entre 1997 y 2008 tuvieron lugar en personas mayores de 10 años a la vez que situaciones análogas pueden ser descriptas para múltiples países incluidos Argentina y otros países de América Latina (D Hozbor et al., 2009; Ulloa-Gutierrez et al., 2010).

Este aumento de la incidencia de pertussis entre individuos con mayor edad facilita la circulación de *B. pertussis* en la población y su transmisión, un punto de sumo interés en relación a los niños que no han recibido el plan de inmunización completo, quienes presentan mayor riesgo de desarrollar pertussis severa (Bisgard et al., 2004). Así, diversos estudios han confirmado que son los adolescentes y adultos del vínculo cercano los que transmiten la infección a los infantes (de Greeff et al., 2010). En muchos de estos casos la detección de pertussis en el adulto sólo es realizada luego del diagnóstico en el niño puesto que la historia de vacunación/infección previa limita la aparición de las manifestaciones clásicas de la enfermedad dificultando su reconocimiento en los adolescentes y adultos. Sin embargo, en muchos otros casos se ha observado la aparición clásica de la patología en estos individuos lo cual constituye un problema en sí mismo para la salud y economía individual y pública (J. Torres et al., 2011).

Por otro lado, el aumento de la incidencia en adolescentes y adultos sugiere que la inmunidad conferida por la vacunación no es duradera puesto que la mayor parte de las personas en estos grupos etarios han recibido esquemas de inmunización completos. En concordancia, los estudios realizados estiman que la inmunidad conferida por las vacunas empieza a decaer entre los 3 y 5 años y su duración puede variar entre los 4 y 12 años (Halperin, 2007; Wendelboe, Van Rie, Salmaso, & Englund, 2005).

De manera análoga, la infección natural por *B. pertussis* genera una inmunidad protectora aunque la misma también decae en el tiempo, pudiendo durar entre 3.5 y 20 años aproximadamente (Wendelboe et al., 2005). Así una persona puede sufrir varias infecciones a lo largo de la vida (Broutin, Rohani, Guégan, Grenfell, & Simondon, 2004; F G A Versteegh, Schellekens, Nagelkerke, & Roord, 2002).

Si bien la caída de la inmunidad ha sido señalada como uno de principales motivos asociados a la resurgencia de la tos convulsa, no es el único. La información al respecto sugiere además que existe una disminución en la eficacia de las vacunas actuales en comparación con las originales causando la disminución del tiempo durante el cual la población se ve protegida (James D Cherry, 2005). En este sentido, en regiones determinadas se ha descrito una asociación entre la reaparición de la patología y el empleo de formulaciones celulares de baja eficacia en los calendarios nacionales de vacunación como ha

ocurrido en Canadá en donde estas vacunas fueron finalmente remplazadas en su por la vacuna acelular. Sin embargo, un factor principal ha sido asociado a la disminución de la eficacia vacunal: la aparición de variaciones genéticas en el patógeno que han permitido la adaptación a las vacunas actuales (Daniela Bottero et al., 2007; Kallonen & He, 2009; King, van Gorkom, van der Heide, Advani, & van der Lee, 2010; Frits R. Mooi, 2009). El análisis de DNA fingerprint en cepas colectadas desde 1949 al 1996 ha mostrado cambios notables en la población de *B. pertussis* pre y post-vacunal. Esta divergencia se detectó fundamentalmente en dos de los antígenos dominantes en las vacunas acelulares contra pertussis: la toxina pertussis y la pertactina. Así este factor junto con la disminución de la inmunidad parecen ser los motivos más relevantes al momento de entender la resurgencia de la tos convulsa.

Otros factores también han contribuido en forma parcial al aumento en el registro de casos de la tos convulsa. Por un lado, las mejoras en la capacidad de reconocer las variaciones en las manifestaciones clínicas y la aparición de la patología en adolescentes y adultos. Por otro, la estandarización de las metodologías empleadas para el diagnóstico que incluyen la detección microbiológica por PCR y el cultivo.

Así, pertussis no sólo es una patología que sigue vigente, sino que su control representa un desafío considerable para la salud pública. Los esfuerzos de expertos de distintas regiones han sido convocados en la Global Pertussis Initiative (GPI) con el fin de mejorar la recopilación de la información epidemiológica a nivel mundial y delinear estrategias de faciliten el control de la enfermedad. Las medidas llevadas a cabo se han basado hasta ahora en la modificación de los planes de inmunización empleando las formulaciones vacunales actuales. Estas modificaciones varían de un lugar a otro, pero en su mayoría radican en la administración de dosis de refuerzo sucesivas. La primera, como mencionamos anteriormente, tiene lugar entre los 4 y 6 años de edad previo a la escolarización. La segunda es entre los 10 y 12 años de edad antes de la adolescencia en la cual la incidencia de pertussis vuelve a ser alta. Esta dosis de refuerzo ha sido aplicada en los Calendarios de Vacunación Nacional de distintos países incluido Argentina. De acuerdo a las recomendaciones de la OMS, la formulación empleada en la vacunación de personas de más de 6 años de edad es la vacuna acelular (Who

Publication, 2011). Estudios sobre el impacto económico de pertussis y la implementación de nuevas estrategias de inmunización se están realizando para evaluar el efecto de la vacunación de adolescentes y adultos sobre todo en lo que se refiere disminuir la incidencia en los infantes (Forsyth et al., 2007; Stokley et al., 2011).

También se han presentado otras alternativas, tales como la vacunación del personal de salud en contacto con niños y la vacunación selectiva de madres y parientes cercanos de los neonatos, lo cual parece ser una estrategia relevante para limitar la transmisión de la patología de adultos a niños (Coudeville, van Rie, & Andre, 2008; Nicole Guiso, Liese, & Plotkin, 2011). Incluso se ha sugerido la vacunación de mujeres embarazadas (Costa Rica, Nuestro país, ACIP).

Si bien en ciertas regiones la modificación de los planes de vacunación podría resultar beneficiosa, esto sólo parece ser una alternativa razonable a corto plazo. Por un lado, la introducción de múltiples dosis de refuerzo complejiza el diseño, la implementación y aplicabilidad de planes de vacunación destinados a la población general, aspecto fundamental para conseguir coberturas vacunales que permitan el control de la patología. En segundo término, porque si bien las vacunas actuales han sido sumamente efectivas para disminuir la mortalidad infantil en relación a la era pre-vacunal los datos presentados señalan que no son lo suficientemente adecuadas para controlar la situación epidemiológica actual. Al respecto podemos recordar que aún en casos de coberturas poblacionales cercanas al 96% las vacunas actuales no han controlado de manera significativa la circulación de *B. pertussis* en la población manteniéndose los ciclos epidémicos. Por otra parte, la eficacia de estas formulaciones está limitada por la adaptación del patógeno y la aparición de cepas divergentes. Además, en aquellos países que han implementado la vacunación acelular, existe actualmente un aumento en la incidencia de *B. parapertussis* el otro patógeno respiratorio restringido al humano dentro del género *Bordetellae* (J. G. Liese, Renner, Stojanov, & Belohradsky, 2003; Long, Karanikas, Harvill, Read, & Hudson, 2010).

Frente a esta situación, el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales o el mejoramiento de las existentes resulta de gran interés. El diseño de tales estrategias tiene distintos desafíos. En primer término generar inmunidad

protectiva a largo plazo, limitando la necesidad de planes de vacunación extendidos de manera de facilitar su implementación aún en regiones donde los recursos económicos y humanos son escasos. En segundo término, estas vacunas deberían ser capaces de conferir protección frente a las cepas divergentes de *B. pertussis* al igual que frente a *B. parapertussis*. Puesto que *B. pertussis* es un patógeno restringido al humano el diseño de estrategias adecuadas debería permitir controlar disminuir su circulación dentro de la población, limitando así la incidencia de la patología.

Las estrategias para mejorar la eficacia de las vacunas frente a *B. pertussis* son diversas e incluyen desde cambios en las formulaciones en relación a la composición y dosis antigénicas y en los adyuvantes empleados hasta cambios en la ruta de inmunización. Una revisión de los desarrollos actuales ha sido desarrollada por Marzouqui y colaboradores (Marzouqi, Richmond, Fry, Wetherall, & Mukkur, 2010).

Sin embargo, el diseño de vacunas efectivas frente a *B. pertussis* requiere de la profundización en el conocimiento de la biología de la infección siendo fundamental el entendimiento no sólo de los mecanismos de patogenia y sino también de los mecanismos inmunológicos involucrados en la defensa del huésped y la resolución de la infección. En este sentido *B. pertussis* es un patógeno complejo con una gran capacidad inmunomoduladora y varios aspectos mencionados continúan en la actualidad sin ser comprendidos. El estudio de las vías involucradas en el reconocimiento del patógeno y su impacto en el establecimiento de la defensa del huésped es de sumo interés para el diseño racional de nuevas formulaciones vacunales pudiendo facilitar significativamente el desarrollo de las mismas. Repasaremos a continuación el conocimiento actual sobre virulencia, patogénesis e inmunidad asociada a *B. pertussis*

***B. pertussis* y sus factores de virulencia.**

Para poder superar las barreras de la defensa mucosal y dar origen a la infección *B. pertussis* se vale de diversos factores de virulencia. Los mismos pueden ser divididos en dos grupos funcionales: las adhesinas y las toxinas. Estas últimas tienen diversas funciones entre las que resulta destacable la capacidad de

interferir con múltiples mecanismos inmunológicos destinados a la eliminación bacteriana (de Gouw, Diavatopoulos, Bootsma, Hermans, & Mooi, Frits R, 2011). Esta característica distingue a *B. pertussis* de otros respiratorios, convirtiéndolo en un patógeno complejo con una gran capacidad inmunomodulatoria, un aspecto clave en la patogénesis bacteriana. La Figura 3 muestra un esquema de los factores los factores de virulencia.

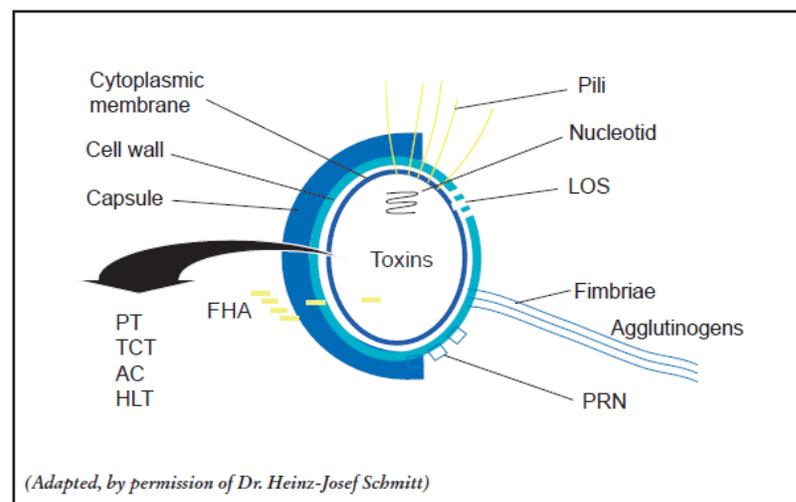


Figura 3: Factores de virulencia de *B. pertussis*. Tomado de “The Immunological Bases for Immunization”. Series-Update OMS-2009.

La expresión de la mayoría de los factores de virulencia está coordinada por un sistema de dos componentes (*bvgASR*) y permite una variación dinámica de la expresión génica en respuesta a las señales provenientes del entorno (Cotter & Jones, 2003). Esto, a su vez, determina la capacidad de *B. pertussis* de oscilar entre distintos estados fenotípicos en cuyos extremos se encontraría por un lado el fenotipo virulento (más conocido como fase virulenta) y por otro el avirulento (conocido como fase avirulenta). Así, la fase virulenta se caracteriza por la expresión de un grupo específicos de genes de virulencia y la represión de otros. Entre los primeros se encuentran la mayoría de los factores de virulencia de *B. pertussis* cuya activación no ocurre en forma simultánea sino de manera

secuencial, pudiendo encontrar genes de activación temprana, intermedia y tardía de acuerdo a la etapa en la que resulta relevante su expresión para el desarrollo de la infección (Cotter & Jones, 2003). Sin embargo, las señales *in vivo* que determinan el pasaje de una a otra fase en relación a la infección no son conocidas al igual que el significado de la existencia de una fase avirulenta puesto que *B. pertussis* es una bacteria cuya vida está restringida al huésped.

B. pertussis ha sido definido como un patógeno extracelular aunque distintos trabajos señalan que a través de la actividad inmunomodulatoria de varios de sus factores de virulencia permiten a la bacteria persistir dentro de células epiteliales y leucocitarias (de Gouw et al., 2011). Si bien esta información permite especular sobre la existencia de un estadio intracelular en el curso de la infección, este aspecto aún es discutido y la relevancia de un nicho intracelular en el ciclo de vida de *B. pertussis* no está esclarecida.

Los factores de virulencia y su rol en la infección

Los primeros factores en ser expresados durante la infección son las adhesinas: las **fimbrias (Fim)** y la **hemaglutinina filamentosa (FHA)**. Ambas proteínas favorecen la adhesión a las células epiteliales de distintas regiones del tracto respiratorio tal como indican estudios de infección con mutantes bacterianos deficientes en cada uno de estos factores que muestran deficiencias en la colonización a nivel de la nasofaringe y la traquea. La colonización a nivel pulmonar por su parte sólo parece ser promovida por la fimbrias (Geuijen et al., 1997; F R Mooi et al., 1992).

La **pertactina (PRN)** (M. Roberts et al., 1991) es otra de las adhesinas de *B. pertussis* importante para la patogenicidad (J D Cherry, Gornbein, Heininger, & Stehr, 1998; Heininger, Klich, Stehr, & Cherry, 1997; J Storsaeter, Hallander, Gustafsson, & Olin, P, 1998). Además podría tener otros roles como sugiere el estudio en *B. bronchiséptica*, otro patógeno respiratorio del género *Bordetellae*. En esta infección actúa promoviendo la colonización y la persistencia bacteriana en el tracto respiratorio al limitar la acción neutrofílica y la eliminación bacteriana (Inatsuka et al., 2010). Su contribución parece estar más extendida durante la

infección puesto que la infección con mutantes *B. bronchiseptica* PRN deficientes conduce a niveles atenuados de colonización bacteriana temprana y tardíamente (Nicholson, Brockmeier, & Loving, 2009).

Una vez promovida la adhesión bacteriana al tracto respiratorio *B. pertussis* produce diversas toxinas que participan en el establecimiento de la colonización. Uno de estos factores es la **citotoxina traqueal (TCT)**, el monómero estructural del peptidoglicano de la pared de las bacterias gram negativas. La TCT es responsable del daño del epitelio ciliado que se observa durante la enfermedad (R. Wilson et al., 1991) y su efecto citotóxico parece ser mediado por la inducción de NO (Flak & Goldman, 1999; Heiss, Lancaster, Corbett, Goldman, & Al., 1994). En este proceso, se exponen receptores de la membrana basal que permiten una adhesión celular más firme y se previene la eliminación bacteriana por el escalador mucociliar, lo cual ha sido asociado a la tos persistente observada en pacientes con pertussis. Puesto que la tos probablemente esté involucrada en la diseminación de este patógeno en la población estos factores de virulencia serían claves para la ecología de *B. pertussis* no sólo permitiendo la adherencia sino también favoreciendo la transmisión.

Además de estos cuatro factores otros factores contribuyen en distinto grado a la adhesión bacteriana y colonización. Por un lado el **factor de colonización traqueal (TcfA)**, una proteína autotransportadora (Finn & Stevens, 1995), y **BteA** una de las proteínas efectoras del sistema de secreción tipo III con efectos citotóxicos (Panina et al., 2005; Shrivastava & Miller, 2009).

Con el fin de garantizar la infección y su persistencia *B. pertussis* emplea otras toxinas destinadas a interferir con la defensa del huésped, afectando tanto los mecanismos efectoras de la inmunidad innata como en la inducción de la respuesta adaptativa.

Uno de estos factores es la **toxina pertussis (PTx)** una proteína con capacidad de ADP ribosilar la subunidad inhibitoria de la proteína G ocasionando su inhibición y la desregulación de múltiples procesos de transducción de señales que conducen a la alteración de la fisiología y homeostasis celular (Katada, Tamura, Ui, & Al., 1983). Este factor de virulencia es clave en los estadios tempranos de la infección en donde actúa sobre las células residentes del pulmón, incluidos los MA, disminuyendo la producción de quimioattractantes de neutrófilos en respuesta a la infección (Carbonetti, Artamonova, Van Rooijen, & Ayala, 2007).

Así, limita la llegada de este tipo celular al foco de infección previniendo la eliminación bacteriana (Andreasen & Carbonetti, 2008; Kirimanjeswara et al., 2005). Sin embargo, el rol de esta población en la eliminación de este patógeno respiratorio no parece ser relevante en ausencia de anticuerpos opsonizantes (Andreasen & Carbonetti, 2009). En este sentido, el trabajo de Kirimanjeswara sugiere que la acción de la toxina pertussis es más importante relevante en los procesos de re-infección en los que retrasa la eliminación bacteriana dependiente de anticuerpos limitando la llegada de neutrófilos al sitio de infección (Kirimanjeswara et al., 2005). Si bien **PTx** es capaz de limitar el reclutamiento temprano de neutrófilos en los estadios iniciales de la infección, el huésped es capaz de establecer a tiempos más tardíos una respuesta altamente pro-inflamatoria que depende de la presencia de este factor de virulencia y que se caracteriza por la producción IL-17 e IFN γ y el reclutamiento neutrofílico (Andreasen, Powell, Carbonetti, & Al., 2009).

Otra de las toxinas con efectos inmunomoduladores es la **adenilato ciclasa-hemolisina (AC-Hly)**. Esta proteína posee un dominio con actividad enzimática de adenilato ciclasa, como indica su nombre, responsable de los principales efectos citotóxicos, y un segundo dominio con actividad hemolisina que media, además, la translocación de esta toxina a la célula blanco. Entre los principales blancos de esta toxina se encuentran las células fagocíticas en las que inhibe los procesos de pinocitosis y fagocitosis (dependiente e independiente de anticuerpos) así como el estallido respiratorio e induce apoptosis (Gueirard, Druilhe, Pretolani, & Guiso, N, 1998; Guermonprez et al., 2001; Kamanova et al., 2008).

A medida que la infección progresa, distintos factores son capaces de interferir tanto en el desarrollo de la inmunidad adaptativa como en la eficacia de los mecanismos asociados. Así, por ejemplo, tanto la **PTx** como la **AC-Hly** afectan las células dendríticas modulando el perfil de activación y la producción de citoquinas (Hickey, Brereton, & Mills, 2008; Martino et al., 2006; Shumilla et al., 2004; Spensieri et al., 2006). Además, la **AC-Hly** es capaz de alterar el reclutamiento y la activación leucocitarios mientras que la **PTx** actúa limitando la producción de anticuerpos en respuesta a la infección (Carbonetti et al., 2004; Paccani et al., 2008).

B. pertussis también presenta mecanismos de resistencia a la eliminación bacteriana mediada por anticuerpos. Parte de ellos están mediados por el factor

denominado “***Bordetella resistance to killing A***” (**BrkA**) que limita la activación de la vía clásica del complemento (Barnes & Weiss, 2001).

En resumen, la interacción entre *B. pertussis* y su huésped es sumamente compleja en donde múltiples factores de virulencia operan para modular la respuesta inmune del huésped haciendo difícil la identificación de aquellos mecanismos que son relevantes para la eliminación bacteriana. La comprensión acerca de cuáles son y la forma en que se inducen durante la infección es resulta de interés para la elaboración de nuevas estrategias de control de este patógeno.

La respuesta inmune frente a *B. pertussis*

Los estudios sobre la inmunidad anti-pertussis se han centrado mayoritariamente en la caracterización de la respuesta inmune que confiere protección frente a distintas formulaciones vacunales, tanto en ensayos clínicos como en modelos animales (K. Mills, 2001). Dichos trabajos señalan la complejidad de la infección por *B. pertussis*, en la cual no parece haber un único perfil de respuesta relevante sino que diversos mecanismos inmunológicos son capaces de brindar protección. Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre frente a otros patógenos, en el caso de *B. pertussis* no existe un antígeno dominante sino que la respuesta a distintos antígenos y factores de virulencia de la bacteria parecen tener una contribución, existiendo cierto grado de redundancia entre los mismos. La información disponible señala que tanto la inmunidad humoral como la celular son relevantes en la resolución de la infección participando ambos tipos de respuestas en la inmunidad conferida por las vacunas. Sin embargo, las contribuciones relativas varían de una formulación a otra: en las vacunas acelulares la inmunidad humoral parecería ser más relevante contrariamente a lo que ocurre en el caso de las vacunas celulares (C M Ausiello, Urbani, La Sala, et al., 1997; Mills, Ryan, Ryan, & Mahon, 1998).

Gran parte del conocimiento sobre la respuesta inmunológica frente a *B. pertussis* proviene del estudio en modelos animales. El modelo más ampliamente utilizado para estos estudios es el modelo murino de infección

intranasal o por aerosolización de una suspensión bacteriana (K. Mills, 2001). A pesar de la ausencia de tos, este modelo reproduce varias de las características de la enfermedad incluido el ciclo de proliferación y eliminación bacteriana, la restricción de la infección al tracto respiratorio, el aumento de la severidad en animales jóvenes y varios de los cambios fisiológicos sistémicos y neurológicos como la leucocitosis y la hipoglicemia. El modelo ha probado ser relevante además en estudios de eficacia, tanto de vacunas celulares como de distintas vacunas acelulares, en donde es capaz de discriminar entre formulaciones con distintas eficacias y correlacionar con las eficacia de la vacuna en niños (N Guiso, Capiou, Carletti, Poolman, & Hauser, 1999; K. H. Mills, Brady, Ryan, & Mahon, 1998; Mills, Ryan, et al., 1998).

A continuación haremos una revisión del conocimiento existente sobre respuesta inmune innata y adaptativa frente a *B. pertussis*. Para ello nos referiremos tanto a datos provenientes del estudio de la infección como de la respuesta observada frente a la vacunación, obtenidos de estudios clínicos o de estudios en modelos animales según el caso.

Elementos de la respuesta inmune innata frente a *B. pertussis*

La inmunidad innata frente a *B. pertussis* ha recibido menos atención que la respuesta adaptativa. Sin embargo, esta respuesta es sumamente importante para la defensa del huésped puesto que brinda mecanismos de contención tempranos y señales de instrucción y direccionamiento de la inmunidad adaptativa y la memoria inmunológica.

El estudio del curso natural de la infección en animales deficientes en células de la inmunidad adaptativa ha permitido determinar que la inmunidad innata es necesaria para restringir la infección en el tracto respiratorio. Sin embargo, no es suficiente para la resolución de la infección (Mahon, Sheahan, Griffin, Murphy, & Mills, 1997). Diversas citoquinas parecen evitar la diseminación de la infección. Una de ellas es IFN γ . Los niveles pulmonares de esta citoquina se elevan tempranamente en respuesta a la infección (dentro de la primera semana) y se mantienen elevados durante su transcurso debido a la funcionalidad de las células

NK y posteriormente al establecimiento de respuesta adaptativa de perfil Th1. Los mecanismos por los cuales el IFN γ contribuye al control de la infección no han sido plenamente dilucidados aunque se sabe que su acción es necesaria para el control de la carga bacteriana (Barbic, Leef, Burns, & Shahin, 1997; Mahon et al., 1997).

Recientemente se ha descrito además la contribución de otras citoquinas de la inmunidad innata en el control de la infección por *B. pertussis*. Wolfe y colaboradores demostraron que la citoquina pro-inflamatoria TNF- α , cuya importancia en la respuesta del huésped frente a otros patógenos respiratorios ha sido evidenciada, es clave para el control de la infección por *B. pertussis* (Wolfe, Mann, Buboltz, & Harvill, 2007). Animales deficientes en TNF- α presentan una infección letal como consecuencia de la falta de control de la carga bacteriana pulmonar y un exacerbado reclutamiento leucocitario que promueve el daño tisular y la resistencia de las vías aéreas. Los eventos desencadenados por TNF- α en la infección parecen ser necesarios para limitar los efectos promovidos por la toxina pertussis puesto que las deficiencias en el control de la infección observadas en animales deficientes en TNF- α se ven atenuadas cuando la infección tiene lugar con una cepa bacteriana deficiente en dicho factor de virulencia (Wolfe et al., 2007). Los mecanismos por los que esta citoquina facilita el control de la infección no están establecidos. Sin embargo, es posible que TNF- α contrarreste el retraso en el reclutamiento de neutrófilos causado por la toxina pertussis a través de la inducción de quimoquinas y la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales. Además esta citoquina participa en la inducción de los mecanismos microbicidas dependientes de la fagocitosis, lo cual probablemente contribuya a la eliminación de *B. pertussis* mediada por estas células.

La acción de **PTx** también parece estar contrarrestados por la acción de otra citoquina clave de la inmunidad innata: IL-1 β . Zhang y colaboradores demostraron que la ausencia de funcionalidad del receptor para esta citoquina promueve una enfermedad atípica diseminada con aumento de la carga bacteriana a lo largo del tracto respiratorio y un consecuente aumento en el reclutamiento leucocitario y la patología inflamatoria pulmonar (X. Zhang, Hester, et al., 2011). Estos animales presentan una mortalidad incrementada frente a dosis infectivas que son subletales. Como se ha descrito, IL-1 β participa en la inducción de la respuesta adaptativa Th17 la cual facilita el control de la infección por *B. pertussis* (Dunne et al., 2010). Sin embargo, mientras el animal deficiente en el receptor de IL-17 sólo

presenta deficiencias en el control de la carga bacteriana de manera tardía, el animal deficiente en el receptor de IL-1 muestra tales deficiencias desde el inicio de la infección (X. Zhang, Hester, et al., 2011). Esto señala que las deficiencias observadas en la defensa anti-pertussis en el animal deficientes en el receptor de IL-1 no sólo se deben a las fallas en el establecimiento de una respuesta Th17 sino que existen otros mecanismos aunque estos no han sido establecidos.

Análogamente a lo que ocurre con TNF- α la señalización inducida por el receptor de IL-1 β parece ser necesaria para limitar la acción de la toxina pertussis aunque se desconoce el mecanismo. El huésped es capaz de producir IL-1 β en respuesta a este factor de virulencia como señalan ensayos de estimulación *in vitro* de células dendríticas derivadas de medula ósea con bacterias salvajes o deficientes en PTx. Se desconoce aún cuáles son los receptores que le permiten al huésped el reconocimiento de PTx y la generación de IL-1 β . Aunque se ha descrito que la toxina pertussis puede inducir la activación de TLR-2 mediante la unión a TLR2/TLR4 (Nasso et al., 2009) la producción de IL-1 β requiere la activación del inflamosoma. Recientemente Dune y colaboradores han señalado por primera vez la participación del inflamosoma en el reconocimiento de *B. pertussis* (Dunne et al., 2010). Específicamente, el receptor NALP3, uno de sus sensores, estaría involucrado en la detección de la adenilato ciclasa-Hly y la consecuente activación de caspasa 1 y la producción de IL-1 β activa. De acuerdo a esto es posible que un mecanismo similar participe en la detección de la toxina pertussis y la generación de esta citoquinas. Estos hallazgos son relevantes puesto que sugieren la capacidad del huésped de detectar factores de virulencia presentes en el patógeno e inducir una respuesta inflamatoria que contribuye a través de distintos mecanismos al control de la infección.

Otra citoquina involucrada en la inducción de la respuesta Th17 que contribuye al control de la infección por *B. pertussis* es IL-6. Esta es una citoquina pleotrópica de la inmunidad innata que ha sido involucrada en la regulación del desarrollo de la respuesta adaptativa (S. A. Jones, 2005). Participa en el reclutamiento leucocitario mediante la inducción de quimoquinas y moléculas de adhesión, en la diferenciación de células B y es un regulador de la proliferación, diferenciación y supervivencia de linfocitos T (Romano et al., 1997; Van Snick, 1990). El trabajo de Zhang y colaboradores muestra que animales IL-6 knock out presentan una patología exacerbada en la que diversos aspectos de la generación

de respuesta del huésped están desregulados. Entre ellos el reclutamiento leucocitario, la generación de células tanto Th17 como Th1 involucradas en el control de la infección, la producción de anticuerpos de perfil Th1 y los mecanismos de clearance dependientes de anticuerpos (X. Zhang, Goel, Goodfield, Muse, & Harvill, 2011).

Así, diversas citoquinas que son expresadas tempranamente en el curso de la infección contribuyen al control de *B. pertussis* a través de mecanismos diversos no completamente dilucidados. En muchos casos los mismos incluyen la regulación de distintos aspectos de la inmunidad adaptativa frente a este patógeno, señalando nuevamente la importancia de la respuesta temprana del huésped en el control del patógeno en los estadios subsiguientes.

Por su parte, la participación de distintos actores celulares en el control de la infección por *B. pertussis* aún no está completamente establecido. Los MA constituyen la primera defensa celular a la que los patógenos respiratorios se enfrentan. En el caso de *B. pertussis* la depleción de esta población produce aumentos significativos en la carga bacteriana pulmonar durante la primera semana post-infección, indicando su participación activa en el control de la infección (Carbonetti et al., 2007). Así, los MA son capaces de promover la eliminación bacteriana. Sin embargo, una fracción de la población bacteriana parece escapar de los mecanismos de muerte, lo cual estaría en relación con la acción de factores de virulencia como la AC-Hly y de la ruta intracelular que parecería seguir la bacteria (Y. A. Lamberti, Hayes, Perez Vidakovics, Harvill, & Rodriguez, 2010). En concordancia con ello, distintos autores han reportado el hallazgo de *B. pertussis* viable dentro de los macrófagos alveolares luego de 19 días post-infección (Masure, 1993).

En respuesta a la infección los MA, junto con otras células residentes del tracto respiratorio, secretan diversas quimoquinas lo cual resulta en el reclutamiento de distintas poblaciones leucocitarias al foco infeccioso. Usualmente los neutrófilos son las primeras células en llegar, seguidos por una segunda ola de células NK, macrófagos, células dendríticas y linfocitos (McGuirk, Mahon, Griffin, & Mills, K H, 1998; Vandebriel, 2003).

En la infección por *B. pertussis*, el reclutamiento inicial de los neutrófilos es retrasado por la acción de la toxina pertussis que limita la expresión de distintos

quimioattractantes por parte de las células residentes (Andreasen & Carbonetti, 2008). En el modelo murino se ha observado que esta población es fundamental para la eliminación bacteriana dependiente de anticuerpos pero no en la primoinfección (Andreasen & Carbonetti, 2009; Kirimanjeswara et al., 2005). Por su parte, algunos ensayos sugieren que los neutrófilos humanos son capaces de eliminar la bacteria fagocitada en presencia y en ausencia de anticuerpos (Lenz, Weingart, & Weiss, 2000). Sin embargo, otros estudios indican que en ausencia de anticuerpos la bacteria es endocitada por un mecanismo dependiente de la presencia de colesterol en la membrana celular que conduce a un aumento de la sobrevivencia intracelular en comparación con la fagocitosis mediada por anticuerpos (Y. Lamberti, Perez Vidakovics, van der Pol, & Rodríguez, 2008).

En relación a los MA y los neutrófilos cabe recordar además, que, como hemos visto en la sección anterior, varias de las toxinas de *B. pertussis* tienen efectos sobre la funcionalidad de estas células alterando sus capacidades fagocíticas e induciendo, en muchos casos, apoptosis.

Por su parte, las células NK participarían tempranamente en la producción de IFN γ y la contención temprana de la infección y además generan un entorno favorable para la inducción de la respuesta adaptativa de perfil Th1 (Patricia Byrne, McGuirk, Todryk, & Mills, 2004).

Como hemos descrito, el conocimiento sobre la inmunidad innata anti-pertussis se refiere a la participación de algunas citoquinas y en menor medida de algunas poblaciones celulares. En la mayoría de los casos se desconocen cuáles son los mecanismos efectores que resultan necesarios y suficientes para eliminar al patógeno y controlar efectivamente la infección. Además, se desconoce cómo el evento de reconocimiento patogénico determina el desarrollo de tales características. A diferencia de lo que ocurre frente a otros agentes patogénicos en el caso de *B. pertussis* poco se ha estudiado sobre los receptores innatos que participan en la defensa del huésped. Como hemos mencionado anteriormente algunos trabajos recientes han indicado que el huésped parece ser capaz de reconocer algunos de los factores de virulencia expresados por *B. pertussis* a través de receptores de reconocimientos de patrones moleculares asociados a patógenos. NALP3, uno de los receptores innatos asociado a la activación del inflamosoma, es capaz de activarse en presencia de la adenilato

ciclasa (Dunne et al., 2010). Por su parte, el receptor intracelular NOD-1, que reconoce peptidoglicano, es activado por la toxina citotraqueal aunque esto parece ser una propiedad específica del NOD-1 murino y no del NOD-1 humano (Magalhaes et al., 2005). Aunque cada uno de estos factores puede tener una contribución en la inducción de la defensa anti-pertussis, el receptor innato más importante parece ser TLR-4. Estudios realizados en el modelo murino sobre los factores genéticos asociados a las variaciones en el curso de la infección han señalado a TLR-4 como el principal factor involucrado en el control de la infección (H. Banus et al., 2006). En forma consistente otros autores han mostrado que los animales deficientes en TLR-4 presentan mayor susceptibilidad a la infección presentando una patología más severa con deficiencias en la eliminación bacteriana y mayor daño histopatológico (Higgins et al., 2003).

La participación de TLR-4 también ha sido establecida en el marco de protocolos de inmunización en donde la funcionalidad de este receptor condiciona el desarrollo de una respuesta adaptativa protectora frente a la infección por *B. pertussis* en el modelo murino de infección intranasal (S. Banus et al., 2008; Fransen et al., 2010; Higgins, Jarnicki, Lavelle, & Mills, 2006). Algunos estudios clínicos también revelan la participación de este receptor en el desarrollo de la respuesta inmune frente a la inmunización con la vacuna celular. En este sentido se ha observado la asociación entre ciertos polimorfismos en el gen de TLR-4 en el hombre y la aparición de deficiencias en la producción de anticuerpos anti-toxina pertussis como consecuencia de la de vacunación (S. Banus, Bottema, et al., 2007; TG Kimman et al., 2008). Así, los estudios existentes señalan la relación entre los receptores de la inmunidad innata y el desarrollo de la respuesta adaptativa, poniendo de manifiesto la participación de TLR-4 en la respuesta frente a la infección por *B. pertussis* y el establecimiento de inmunidad protectora. Sin embargo, aunque estos trabajos han señalado la participación de TLR-4 en la defensa del huésped ninguno ha analizado cuál es su contribución. En este sentido, el conocimiento sobre los mecanismos que son desencadenados por su activación y cuáles de ellos son necesarios y/o suficientes para el establecimiento de la defensa aún es escaso. El estudio de tales aspectos resulta de interés para el diseño de estrategias profilácticas y terapéuticas que permitan mejorar el control de la patología entre la población.

La respuesta inmune adaptativa frente a *B. pertussis*

La respuesta celular

Las diversas ramas de la respuesta inmune son orquestadas para resolver la infección por *B. pertussis*. La necesidad de respuesta adaptativa ha sido evidenciada tanto en ratones atímicos nu/nu, que carecen de linfocitos T a/b, como en ratones con inmunodeficiencia severa SCID, que carecen de linfocitos T y B. En ambos casos la infección se hace crónica y se vuelve letal a diferencia de lo que ocurre en animales control que son capaces de resolver la infección (Barbic et al., 1997)

Tanto los mecanismos dependientes de linfocitos T como B son necesarios para el control de *B. pertussis*. Las células T, y en particular los LT CD4+, son necesarias para el control de la infección como lo señalan las mayores cargas bacterianas y la cronicidad de la infección en animales knock out para el receptor de células T (TCR) y en animales knock out para CD4. En el mismo sentido, animales irradiados letalmente son protegidos frente a la infección mediante la transferencia adoptiva de linfocitos T CD4+ específicos para *B. pertussis*. Sin embargo, la transferencia de linfocitos específicos T CD8+ no es capaz de restaurar la capacidad de resolver la infección (K. H. Mills, Barnard, Watkins, & Redhead, 1993). Asimismo, la inmunización con *B. pertussis* inactivada no confiere protección en animales carentes de linfocitos T CD4+, pero sí en ausencia de linfocitos T CD8+, señalando el rol crítico de las primeras en la generación de respuesta secundaria a la inmunización (M. Leef, Elkins, Barbic, & Shahin, 2000).

La contribución de los linfocitos T CD4+ en la defensa frente a *B. pertussis* excede la colaboración con los linfocitos B y la producción de anticuerpos sino que además participa en la inmunidad celular (M. Leef et al., 2000) en concordancia con algunos ensayos que sugieren el comportamiento dual de *B. pertussis* como un patógeno extracelular con capacidad de sobrevivir intracelularmente.

El perfil de respuesta adaptativa generado por la infección y asociado a la protección promovida por la vacuna celular se ha descrito como Th1 (C M Ausiello, Urbani, la Sala, Lande, & Cassone, 1997; K. H. Mills et al., 1993; M. Ryan et al., 1998). Sin embargo, publicaciones recientes indican que el perfil es mixto y que la respuesta Th17 también contribuye a la defensa frente a *B. pertussis* (Andreasen et al., 2009; Dunne et al., 2010). Además, se ha señalado la

participación de diversos componentes bacterianos en su inducción. En particular, el lipooligosacárido de *B. pertussis* promueve en las células dendríticas humanas la expresión de IL-12p70, IL-1- β , IL-6 e IL-23 de los cuales los últimos tres son citoquinas necesarias para la inducción de células Th17. Además, tanto la toxina pertussis como la adenilato ciclasa promueven la generación de células Th17 a través de mecanismos que parecerían diferir entre sí (X. Chen, Howard, & Oppenheim, 2007; Nasso et al., 2009).

En el caso de *B. pertussis*, aún no se conocen los mecanismos por los cuales la respuesta Th17 es capaz de promover la eliminación bacteriana. Higgins et al (2006) han sugerido que esta citoquina favorece la activación macrofágica y la eliminación del patógeno. Algunos autores han observado la capacidad de *B. pertussis* de replicar dentro de este tipo celular (Y. A. Lamberti et al., 2010), lo cual hace probable dicho mecanismo constituya al menos una de las formas en que IL-17 contribuye al control de la infección.

Por otra parte, cabe mencionar que no sólo los perfiles Th1 y Th17 confieren protección frente a este patógeno. Las vacunas acelulares cuya eficacia es comparable a la de la vacuna celular confiere protección por un mecanismo asociado con la inducción de respuesta Th2 (C M Ausiello, Urbani, la Sala, et al., 1997; M. Ryan et al., 1998). Esto pone de manifiesto, la complejidad de la inmunidad frente a *B. pertussis* y la existencia de distintos mecanismos que contribuyen a la protección frente a este patógeno.

La respuesta humoral

Como mencionamos anteriormente la defensa frente a *B. pertussis* requiere también de la respuesta mediada por linfocitos B. Una de las evidencias principales proviene de la reducción de la severidad de la patología en individuos infectados como consecuencia de la inmunización pasiva con suero inmune (Granström, Olinder-Nielsen, Holmblad, Mark, & Hanngren, 1991). Evidencias adicionales surgen del estudio de la infección e inmunización en el modelo murino. Los animales Ig^{-/-}, que carecen de células B maduras, desarrollan una infección crónica a diferencia de los animales control que son capaces de eliminar al patógeno normalmente (Mahon et al., 1997). Además, la inmunización intranasal con la bacteria inactivada genera una protección limitada en este modelo la cual se

restaura por transferencias de células B inmunes. Sin embargo, puesto que este efecto es conseguido aún en presencia de niveles mínimos de anticuerpos séricos, se ha sugerido que las células B podrían contribuir a la defensa frente a *B. pertussis* por mecanismos adicionales a la producción de anticuerpos (M. Leef et al., 2000).

La respuesta humoral facilita la eliminación bacteriana y los neutrófilos parecen ser los actores de principales en este proceso que depende de la fagocitosis mediada por el receptor de Fc (Kirimanjeswara et al., 2005; M E Rodriguez et al., 2001). Sin embargo *B. pertussis* limita esta respuesta retrazando el reclutamiento neutrofilico inicial mediante la actividad de la toxina pertussis (Andreasen & Carbonetti, 2008) por lo cual el proceso de fagocitosis se vuelve evidente sólo a tiempos tardíos durante la infección (Kirimanjeswara et al., 2005). Se ha sugerido que la resistencia de *B. pertussis* al clearance mediado por anticuerpos debido a la acción de este factor de virulencia podría explicar, al menos en parte, los casos de infección entre la población vacunada y la persistencia de este patógeno en la población al aumentar la capacidad infectiva y las posibilidades de transmisión.

A pesar de que resulta clara la contribución de la inmunidad humoral a la defensa frente a *B. pertussis*, no ha podido establecerse una correlación entre los niveles de anticuerpos y la protección. La mayoría de la información al respecto proviene del estudio de la respuesta inducida por la vacuna acelular tanto en el modelo murino como en diversos estudios clínicos. Como hemos mencionado esta formulación induce una respuesta adaptativa con un perfil mixto Th1/Th2 con predominio Th2 y la respuesta humoral tiene un rol principal en la inmunidad protectora conferida por esta formulación aunque la protección permanece aún cuando los títulos de anticuerpos han disminuido significativamente (Giuliano et al., 1998; J Storsaeter et al., 1998). La presencia de varios factores de virulencia en estas formulaciones ha permitido estudiar la participación de la respuesta frente a distintos antígenos (fimbrias, pertactina, hemaglutinina filamentosa y la toxina pertussis) en la protección.

Algunas evidencias sugieren que los niveles y la actividad de los anticuerpos específicos anti-toxina pertussis serían la variable más relevante: parece existir alguna asociación entre los bajos niveles de anticuerpos específicos frente a este factor de virulencia y la susceptibilidad a la infección en individuos sin historia

previa de infección (Jann Storsaeter, Hallander, Gustafsson, & Olin, 2003). Adicionalmente, ensayos clínicos de evaluación de la eficacia de la vacuna acelular con PTx como único componente mostró que los altos niveles iniciales de anticuerpos frente a este antígeno hace menos probable la infección, pero la protección permanece aún cuando los títulos de anticuerpos han declinado indicando que otros mecanismos contribuyen a la protección a largo plazo (Taranger et al., 2000). Sin embargo, la adición de otros componentes como la FHA y la pertactina a la formulación acelular (conteniendo la toxina pertussis) aumentan significativamente la eficacia de la vacuna indicando que la respuesta frente a múltiples antígenos favorece la protección del individuo (Mills, Ryan, et al., 1998).

La información refleja que la respuesta inmune frente a *B. pertussis* es compleja e involucra la tanto la respuesta humoral como la respuesta celular frente a varios de sus factores de virulencia. Asimismo distintos perfiles de respuesta pueden dar origen a una inmunidad protectora aunque ni la contribución relativa de cada uno de ellos ni sus mecanismos efectores están claramente establecidos. Por otra parte, las descripciones existentes sobre la respuesta innata frente a *B. pertussis* y la forma en que la misma instaura mecanismos de eliminación microbiana tempranos y direcciona el desarrollo de una inmunidad protectoras son aún incipientes. Profundizar en el conocimiento de cada uno estos aspectos resulta de interés para el diseño racional de estrategias vacunales que resulten efectivas para el control de la tos convulsa.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Es posible esbozar estrategias vacunales efectivas mediante el entendimiento del proceso infeccioso y los mecanismos inmunológicos involucrados en la defensa del huésped.

Nuestra hipótesis de trabajo es que el desarrollo de formulaciones vacunales que permitan mimetizar el proceso infeccioso resultarán eficaces para el desarrollo de inmunidad protectora.

En el caso de los patógenos respiratorios esto se logrará empleando un diseño de intervención que considere:

- el empleo de la ruta de infección natural como vía de inmunización (la vía mucosal).
- el empleo de adyuvantes que, en combinación con el antígeno vacunal escogido, permitan activar aquellas vías de relevancia en la infección natural.

OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de esta tesis es generar conocimiento sobre los aspectos claves de la respuesta inicial frente a una infección respiratoria para aplicarlo en la formulación de estrategias de inmunoprofilaxis de la enfermedad. Este trabajo puede servir de prueba de concepto para contrastar las hipótesis enunciadas.

Con este fin, emplearemos el modelo murino de infección por *B. pertussis*, analizando la contribución de distintos receptores TLR en la inducción de la defensa mucosal frente a la infección para luego evaluar cómo la activación de dichas vías en protocolos de inmunización intranasal son capaces de dar origen a respuestas protectoras frente al desafío intranasal con *B. pertussis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

Con el fin de analizar posibles estrategias de inmuno-intervención frente a *B. pertussis* a lo largo de este trabajo vamos a analizar cómo la activación de distintos receptores TLR en la mucosa respiratoria contribuye a la inducción de mecanismos capaces de brindar resistencia frente a la infección por este patógeno.

Como hemos mencionado, la bibliografía disponible indica que TLR-4 es el principal receptor innato involucrado en la defensa del huésped frente a *B. pertussis*. De acuerdo a ello es posible suponer que la modulación de la respuesta inmune a través de la activación de este receptor podría resultar en el diseño de una estrategia inmuno-profiláctica pertinente. Sin embargo, el rol de este receptor y los mecanismos a través de los cuales participa en la defensa del huésped no han sido descritos hasta el presente. Puesto que el conocimiento de tales aspectos puede resultar en avances significativos en el esbozo racional de dichas estrategias en este trabajo decidimos profundizar en el estudio de los mismos. Con este fin elegimos estudiar en forma comparativa la contribución de TLR-4 frente a la contribución de otras dos vías TLR: TLR-3 y TLR-5. Estos dos receptores fueron seleccionados por emplear vías de señalización diferentes entre sí y parcialmente compartidas con TLR-4: mientras éste último utiliza los adaptadores MyD-88 y TRIF, TLR-3 emplea exclusivamente la vía TRIF dependiente y TLR-5 emplea mayormente MyD-88 (Kawai & Akira, 2011). El estudio en forma comparativa de las respuestas desencadenadas por cada uno de estos tres receptores resulta de interés a fin de discriminar los mecanismos inmunológicos que son necesarios y suficientes para estructurar la defensa anti-pertussis, un aspecto que aún sigue sin estar establecido.

Con este fin en el capítulo inicial de esta tesis nos dedicaremos a caracterizar la respuesta desencadenada en la mucosa respiratoria por la activación de los tres receptores mencionados. Para ello realizaremos ensayos de inmunización intranasal con los respectivos agonistas: Poly IC para TLR-3, LPS para TLR-4 y flagelina de *S. typhimurium* para TLR-5. Como parte de estos estudios analizaremos la respuesta de distintas regiones del tracto respiratorio evaluando las respuestas de distintas poblaciones celulares que participan

activamente en el reconocimiento patogénico y la inducción de la respuesta anti-microbiana.

En el Capítulo 2 nos centraremos en el estudio del rol de TLR-4 en el reconocimiento de *B. pertussis* y la inducción de una respuesta innata capaz de contener la infección. Para ello analizaremos la importancia de esta señalización durante los primeros estadios de la infección empleando el modelo murino de infección intranasal con el fin de caracterizar posibles mecanismos TLR-4 dependientes que participen en el control de la infección.

En el Capítulo 3 evaluaremos la contribución de TLR-3, TLR-4 y TLR-5 a la defensa frente a *B. pertussis*. Analizaremos cómo la estimulación de cada uno de los receptores al momento de la infección es capaz de desencadenar mecanismos efectores de la inmunidad innata que permitan controlar la infección tempranamente. Con este fin realizaremos ensayos en los cuales los agonistas Poly IC, flagelina y LPS serán co-administrados con *B. pertussis*.

Finalmente, en el capítulo 4 evaluaremos la contribución de las tres vías TLR seleccionadas en el direccionamiento de una respuesta adaptativa capaz de conferir protección frente a *B. pertussis*. Para ello realizaremos ensayos en los que el antígeno vacunal será co-administrado con los agonistas de tales receptores. La vía de inmunización seleccionada es la vía intranasal puesto que mimetiza la ruta de infección natural de *B. pertussis* y tal como se indicó anteriormente la estimulación local es la mejor forma de direccionar los mecanismos de defensa a la mucosa respiratoria con el fin de conferir protección.



MATERIALES
Y
MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Distintas cepas murinas fueron empleadas en este trabajo: Balb/C, C3H/HeJ y C3H/HeN. Estas dos últimas cepas poseen el mismo background genético pero a diferencia de los C3H/HeN, empleados como control, la cepa C3H/HeJ es deficiente en la funcionalidad del receptor TLR-4 debido a una mutación puntual en el gen que sustituye un residuo conservado de prolina en el dominio de intracitoplasmático del receptor por un residuo de lisina (Poltorak et al., 1998).

En todos los casos fueron empleados animales hembras de 4 a 6 semanas de edad.

2. Agonistas TLR e inoculaciones intranasales

Tanto Poly IC como el lipopolisacárido (LPS) de *Esterichia coli* 0111: B4 fueron provistos por a Sigma (USA). Los LPS de *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* 9.73 y *Sinorhizobium meliloti* Rm41 fueron obtenidos a partir de los respectivos cultivos bacterianos por el método de extracción fenol ácido (D Hozbor, Rodriguez, Samo, Lagares, & Yantorno, 1993). Los LPS obtenidos fueron dializados y liofilizados y la cantidad obtenida fue determinada por medida de peso seco. La calidad de las muestras fue controlada por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

Flagelina fue obtenida a partir de *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* ATCC 14028 de acuerdo al protocolo descrito por Hiriart y colaboradores (Hiriart Y, Errea A, Gonzales Maciel D, Lopez JC, Rumbo M, 2011). La ausencia de LPS residual en esta preparación fue controlada por el método de Limulus (Pierce, USA)

Para los ensayos realizados en el capítulo 1 los animales anestesiados con éter recibieron por vía intranasal 1µg de LPS de *E. coli*, 1µg de Flagelina o 50 µg de

Poly IC según el caso en un volumen final de 25µl empleando como vehículo solución fisiológica inyectable estéril.

3. Obtención del antígeno vacunal

Las vesículas de membrana externa (OMV) de *B. pertussis* fueron obtenidas a partir del cultivo bacteriano de la cepa de referencia Tohama I (CIP 8132, Collection de l'Institut Pasteur, France). Para ello, las bacterias se obtienen a partir de un cultivo que ingresa en fase estacionaria, mediante centrifugación a 10.000g durante 20 minutos a 4°C. El pellet conseguido se resuspende en buffer TRIS-EDTA pH 8.5 (buffer TE) en una relación aproximada de 5 mL de buffer por cada gramo de bacteria (peso húmedo). Esta suspensión es sonicada en agua fría durante 20 minutos y a continuación es sometida a dos centrifugaciones sucesivas iguales a las indicadas anteriormente. El sobrenadante así obtenido se centrifuga a 100.000g a 4°C durante 2hs. El pellet originado se resuspende en deoxicolato 1,5% (peso/volumen) en buffer TE en una relación. Cada 6 ml de esta suspensión se adicionan 2ml de sacarosa 60% y se realiza una centrifugación a 100.000g durante 2h a 4°C. Luego de este proceso la OMV es obtenida de la interfase TE/sacarosa. Este proceso se repite una vez. El antígeno obtenido (OMVlow) fue cuantificado por medida del contenido proteico mediante el test de Bradford (BioRad).

4. Cultivo de *B. pertussis* y preparación de inóculos bacterianos.

La cepa de *B. pertussis* empleada fue la cepa Tohama I (CIP 8132, Collection de l'Institut Pasteur, France). Para preparar los inóculos el microorganismo correspondiente fue crecido en agar Bordet Gengou (Difco) suplementado con 10% de sangre desfibrinada (medio BGA). Después de la incubación durante 72 hs a 37°C, las colonias fueron plaqueadas en medio BGA durante 24hs y recolectadas en buffer fosfato (pH=7.4) el día de la infección. Los inóculos correspondientes fueron ajustados por medida de la densidad óptica a 650 nm. En cada experimento el tamaño del inóculo fue determinado por plaqueo y recuento bacteriano en BGA suplementado.

5. Tinción de *B. pertussis* con carboxifluoresceína diacetato succinimidyl ester (CFSE)

B. pertussis fue incubada durante 45 minutos a 37°C en una solución 10 mM en PBS de CFSE (Invitrogen) en una relación 10⁹ UFC/ml. El pellet bacteriano obtenido por centrifugación durante 10 minutos a 10000g fue lavado tres veces con PBS y diluido para obtener el inóculo necesario para la administración intranasal.

6. Ensayos de infección e inmunización

En todos los ensayos, la infección fue realizada por vía intranasal. Para ello los animales fueron anestesiados con éter y la dosis bacteriana escogida fue administrada en un volumen final de 40µl de PBS estéril distribuida equitativamente entre ambas narinas.

La dosis de los inóculos en los ensayos mostrados en el Capítulo 2 fue de 10⁸ ufc mientras que para los ensayos correspondientes al Capítulo 3 la dosis empleada fue de 10⁶ ufc. Para estos últimos se prepararon suspensiones bacterianas a las que se adicionaron 1µg de LPS de *B. pertussis*, 1µg de LPS de *B. bronchiseptica*, 1µg de LPS de *E. coli*, 1 µg de LPS de *Sinorhizobium meliloti*, 1 µg de Flagelina o 50µg de Poly IC en cada caso de acuerdo al tratamiento.

En los ensayos de inmunización presentados en el Capítulo 4, los animales recibieron dos inmunizaciones intranasales a día 0 y día 14 con 3µg de OMVlow en combinación con 1µg de LPS de *B. pertussis*, 1µg de Flagelina o 50 µg de Poly IC de acuerdo al tratamiento. A día 28 los animales fueron sometidos a desafío intranasal con 10⁷ UFC de *B. pertussis*. El efecto de cada tratamiento fue evaluado por recuento en placa de la carga bacteriana pulmonar a día 5 post-desafío. En todos los casos las dosis empleadas fueron dosis subletales.

7. Colonización bacteriana en pulmón.

Animales infectados como se describió anteriormente fueron sacrificados por dislocación cervical y los pulmones fueron recolectados y homogeneizados en 1ml de PBS estéril. El homogenato fue diluido en forma seriada y distintas

diluciones fueron plaqueadas en BGA e incubadas durante 4 días a 37°C. Al cabo de este tiempo, las unidades formadoras de colonias fueron contadas. Por condición fueron empleados 5 animales en todos los ensayos realizados.

8. Obtención de células del espacio bronquioalveolar y de células del parénquima pulmonar.

Para estos ensayos los animales fueron sacrificados por administración intraperitoneal de dosis apropiadas del compuesto comercial EUTHANYLE®, según indicaciones del proveedor. Una vez abierta la cavidad torácica y cortada la aorta descendente y se procedió a la perfusión pulmonar mediante punción del ventrículo izquierdo y administración de 10 ml de PBS con el fin de eliminar la sangre del tejido pulmonar.

El lavado bronquioalveolar (BAL) se realizó por canulación de la traquea e introducción y aspiración de 1 ml de PBS 1% BSA estéril. Este proceso fue repetido tres veces. Para eliminar la contaminación por células rojas se utilizó buffer de lisis AcK durante tres minutos a temperatura ambiente. El recuento de celular fue realizado en cámara de Neubauer's.

La suspensión de células del parénquima pulmonar se obtuvo por digestión enzimática. Los pulmones fueron cortados en pequeños pedazos e incubados durante 20 minutos a 37°C en 2ml de medio de digestión conteniendo RPMI, 5% de suero fetal bobino (FSC), colagenasa 1mg/mL y DNAsa I a 40 ug/mL (Invitrogen). Las células obtenidas fueron filtradas con filtro de 40 µm (BD), lavadas con RPMI 5% FSC y centrifugadas a 500 g durante 5 minutos. A continuación se realizó un gradiente con percoll y se colectó el anillo de células correspondientes a los leucocitos. Las células obtenidas se lavaron dos veces con PBS 5% FSC y se resuspendieron en 1ml de PBS 5% FSC, 5 mM EDTA para ser contadas en cámara de Neubauer.

9. Análisis y cuantificación de células reclutadas al parénquima pulmonar y al espacio bronquioalveolar.

Las células obtenidas como se describió anteriormente fueron teñidas con anticuerpos conjugados a fluorocromos a la dilución adecuada, durante 45

minutos a 4°C para análisis por citometría de flujo en el equipo FACSCalibur de Becton Dickinson. Los anticuerpos utilizados fueron: CD11c (clon N418, hamster IgG, eBioscience), CD11b (clon M1/70.15, Rat IgG2b, CALTAG LABORATORIOS), Gr-1 (clon RB6-8C5, Rat IgG2b, eBioscience), Ly-6C (clon AL-21, Rat IgM,k) y Ly6G (clon 1A8, Rat IgG2a). Para cada caso fueron empleados los controles de isotipos correspondientes. Para cada muestra fueron adquiridos 10.000 eventos en la región de interés. El análisis de los resultados fue realizado con el software Flojow © (Tree Star, Inc.).

10. Estimulación de macrófagos alveolares.

Las células obtenidas por BAL de animales Balb/c naive fueron resuspendidas en RPMI 5% FSC y se sembraron 2×10^5 células/ fosa. La estimulación fue realizada con 1µg/ml de LPS, 1µg/ml de flagelina o 50 µg/ml de Poly IC durante 2 horas. Para cada condición se realizaron dos estimulaciones independientes. Al tiempo indicado, se realizó el lisado celular para las mediciones de expresión de genes, tal como se describe en el punto 12.

11. Separación inmunomagnética de células obtenidas de lavado bronquioalveolar y de parénquima pulmonar.

El enriquecimiento de células Gr1+ a partir de suspensiones celulares obtenidas de pulmón o BAL fue realizado empleando perlas magnéticas unidas a anti-Gr-1 murino (BD ImagTM, BD Biosciences). Cada 10^7 células se adicionaron y mezclaron 50 µl de perlas. Luego de la incubación a 6-12° C durante 30 minutos, la suspensión celular fue diluida con buffer BDIMagTag ($1-8 \times 10^7$ células / mL) y sometida a la acción de un campo magnético. Las células marcadas fueron retenidas por el magneto y denominadas fracción Gr1+ mientras que las células no retenidas fueron recolectadas y denominadas fracción Gr1 negativas. La fracción Gr1+ fue diluida nuevamente y sometida a dos pasos más de separación por acción del campo magnético con el fin de incrementar la pureza de la población celular obtenida. Finalmente, el grado de enriquecimiento de las

respectivas fracciones fue evaluado por citometría de flujo empleando como referencia el patrón celular de la suspensión celular de origen.

12. Depleción de neutrófilos

Los neutrófilos de animales C3H/HeN y C3H/HeJ fueron depletados mediante administración intraperitoneal de ascitis conteniendo el anticuerpo monoclonal anti-Gr1 de ratón (clon RB6-8C5). Los niveles de proteína de la ascitis fueron medidos por el método de BSA, normalizando por dilución los distintos lotes de ascitis a una concentración proteica de 8 mg/mL.

El esquema de administración empleado es el siguiente: administración de 500 μ l de ascitis 24hs previas a la infección de *B. pertussis* y de 250 μ l/ día post-infección a partir de las 24hs de realizada la infección. El efecto de la depleción fue evaluado por citometría de flujo. Como control se emplearon animales no tratados. Para cada condición se emplearon 5 animales.

13. Experimentos de expresión génica.

13.1 Obtención de ARN

Todos los experimentos de expresión génica se realizaron a partir de ARN total de la muestra de interés. El ARN total fue obtenido mediante utilización del Kit Nucleospin RNAII (Macherey-Nagel, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN obtenido fue realizada por medida de absorbancia a 260 nm usando el espectrofotómetro ND-1000 NanoDrop. La medida A260/280 se empleó para determinar la pureza de las muestras que fueron almacenadas a -80°C hasta ser procesadas.

13.2 Obtención de cDNA

La síntesis de cDNA fue realizada empleando 500 ng de RNA por muestra, random primers (Invitrogen) y la transcriptasa reversa MMLV-RT (Invitrogen), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El ARN y los random primers son mezclados e incubados a 65°C durante 5 minutos y puestos inmediatamente en hielo hasta la incorporación de la enzima, el buffer de reacción y los dNTPs.

Para preservar la integridad del ARN se emplearon inhibidores de RNAasas (RNAasa out Invitrogen). La transcripción reversa se realizó en la cicladora térmica Mastercycler eppendorf de acuerdo al siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 90 minutos a 42°C para la transcripción reversa y 15 minutos a 90°C para la desnaturalización enzimática.

12.3 Medida de los niveles de expresión génica por PCR cuantitativa (Real Time PCR)

La reacción fue realizada empleando SYBRgreen master mix 2X (Invitrogen) y diluciones 1/20 del cDNA. Todas las muestras, incluidos los controles negativos empleando agua en lugar de cDNA, fueron corridos en duplicados. La reacción fue llevada a cabo en el equipo MyiQ™- Single color real-time PCR detection system (Bio-Rad) de acuerdo al siguiente protocolo: incubación durante dos minutos a 50°C y 10 minutos a 95° seguido por una amplificación de 40 ciclos con 1 minuto de annealing/ extensión a 60°C y 15 segundos a 95° para desnaturalización. Al final de la corrida se realizó una curva de melting para controlar la calidad de los amplicones obtenidos. El software empleado fue Bio-Rad iQ5™ versión 2.0.

Los datos fueron analizados haciendo el cálculo de $\Delta\Delta C_t$ normalizando los niveles de expresión de todos los genes respecto de los niveles de expresión de β -actina (R. Roberts et al., 2008). Los resultados fueron expresados como incremento relativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) respecto de los valores correspondientes a los animales controles: animales naive o tratados con PBS según el experimento.

Los primers empleados se diseñaron utilizando el Software Primer Express (Applied Biosystems, USA) y las secuencias correspondientes son las siguientes:

Gen	forward	reverse
β ctina	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
IL-6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
TNF α	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT
CXCL1	CTT GGT TCA GAA AAT TGT CCA AAA	CAG GTG CCA TCA GAG CAG TCT
CXCL2	CCCTCACAGGAAGAACCAAA	CACATCGGTACGATCCAGGC
CXCL10	GGAGTGAAGCCACGCACAC	TGATGGAGAGAGGCTCTCTGC

13.4 Perfiles de expresión génica pulmonares evaluados mediante microarreglos de cDNA (microarray)

Estos ensayos fueron realizados en el Instituto Pasteur de Lille en colaboración con el grupo del Dr. Jean Claude Sirard.

Para cada condición fueron empleados 4 animales, utilizando como referencia los animales no infectados del grupo control. El ARN total obtenido como describimos previamente fue concentrado utilizando el dispositivo para filtración YM30 Microcon (Millipore) mediante centrifugación a 14 000 g durante 60 minutos a 4 °C. La calidad del ARN fue chequeada con el bioanalizador Agilent 2100R (Agilent Technologies) empleando los chips RNANano y un valor de RIN de mas de 8 como criterio de aceptación. A continuación se realizó la transcripción reversa y marcado con digoxigenina a partir de 20 µg de ARN. El cDNA así obtenido fue empleado para la hibridación con los chips de microarray de genoma completo murino (" Mouse Genome Survey Microarrays" de Applied Biosystems). La reacción de revelado fue realizada empleando el Kit de detección quimioluminiscente RT (Applied Biosystem) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La lectura fue realizada mediante escaneo del chip empleando el equipo ABI700 de Applied Biosystem.

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó el programa Acemap desarrollado por nuestros colaboradores del grupo dirigido por el Dr. Arndt Benecke del Institut des Hautes Études Scientifiques de París. La calidad de los datos de microarray fue controlada de acuerdo a los procedimientos descritos por Noth y col. y Brysbaert y col. (Brysbaert, Pelay, Noth, & Benecke, 2010; Noth, Brysbaert, & Benecke, 2006). Los datos de las diferentes condiciones biológicas fueron comparados de a pares y los valores $\log_2 Q$ ($Q = \text{incremento relativo del ARNm} = \text{señal de condición en análisis/señal del mismo marcador en el control}$) (" $\log Q$ ") fueron determinados como promedios ponderados de valores individuales de $\log Q$ (Van Maele et al., 2010),(Endt et al.),(Weiss et al.). El método NeONORM fue usado para la comparación entre ensayos. Los valores de p fueron determinados mediante el T-test y la corrección pFDR.

De acuerdo a las anotaciones de la base de datos Gene Ontology (GO), cada gen fue asignado a un proceso biológico y se determinó la representación relativa de cada uno de los genes significativamente regulados. Los valores de p para las vías y procesos modulados fueron calculados utilizando una distribución binomial con corrección de Bonferroni para test múltiples.

13.5 Medida de expresión génica por TaqMan Low Density Array (TLDA).

En base a los resultados obtenidos en los experimentos de microarreglos de ADN, se seleccionó un set de 48 genes relacionados con la funcionalidad neutrofílica y la repuesta inmune innata, con los que generó un sistema de TLDA a demanda en un sistema 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Para su uso se utilizó cDNA obrtenido de acuerdo a los protocolos anteriormente descritos, operando el sistema de TLDA en las condiciones standard sugeridas por el fabricante. El análisis de resultados fue llevado a cabo empleando el software Real Time StatMiner software de Integromics. Los niveles de mRNA fueron determinados de la siguiente manera: (i) por comparación del ciclo umbral de la PCR (Ct) de los genes de interés y el promedio de Ct de los 5 genes utilizados como normalizadores (Actb, 18S, Dpp, Polr2j, Ube3b) se determinó el (Δ Ct) (ii) los valores de incremento relativo para los distintos genes fue calculado empleando el $\Delta\Delta$ Ct obtenido para cada tratamiento respecto del grupo control. En todos los experimentos el valor de Ct máximo aceptado fue de 33 ciclos. Los análisis de cluster jerárquico entre las distintas condiciones experimentales comparadas para cada gen fueron realizados empleando las opciones básicas del programa Real Time StatMiner.

Los genes escogidos fueron los siguientes: Gzma (Granzime A), Gzmb (Grandzime B), Gzmd (Grandzime D), Sftpd (surfactant associated protein D), Dcir1/Clec4a (C-type lectin domain family 4, member a2), Klrk1 (killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1 (NKG2D), Retn1a (resistin like alpha), Mgl1 (macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1), Lgals1 (lectin, galactose binding, soluble 1), Slpi (secretory leukocyte peptidase inhibitor), Inhbb (inhibin beta-B), Lcn2 (lipocalin 2), Clec4e (C-type lectin domain family 4, member

e), S100a9 (S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)), Ptx3 (pentraxin related gene), Cd274 (PD-1L inhibitory response), Slc7a11 (solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11), Noxo1 (NADPH oxidase organizer 1), Ncf1 (neutrophil cytosolic factor 1), Ltf (lactotransferrin), Fcgr2b (Fc receptor, IgG, low affinity IIb), Ptgs2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2), Areg (amphiregulin), Osm (oncostatin M), Ch25h (cholesterol 25-hydroxylase), Il1b (interleukin 1 beta), Tnf (tumor necrosis factor), Ifng (interferon gamma), Il6 (interleukin 6), Il1f9 (interleukin 1 family, member 9), Ptger4 (prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)), Cd14 (CD14 antigen), Tnfrsf9 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9), Slc26a4 (solute carrier family 26, member 4), Adm (adrenomedullin), Csf3 (colony stimulating factor 3 (granulocyte)), Cxcl2 (chemokine (C-X-C motif) ligand 2), Cxcl10 (chemokine (C-X-C motif) ligand 10), S100a8 (S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)), Hmox1 (heme oxygenase (decycling) 1), Trpm2 (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2), Slc7a2 (solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2), Zc3h12a (zinc finger CCCH type containing 12A), Batf (basic leucine zipper transcription factor, ATF-like).

14. Ensayos de Microdissección

Para estos ensayos los pulmones de los animales fueron embebidos en OCT y congelados en nitrógeno líquido, luego de lo cual fueron mantenidos en freezer de -80°C hasta su procesamiento. A partir de cada bloque así obtenido se realizaron cortes histológicos de 15 micrones empleando el Criostato Shandon Cryotome de THERMO los cuales se depositaron sobre membranas para microdissección (Membrane Slides PEN-Membrane 2,0 µm, Leica, Alemania).

Los cortes histológicos fueron teñidos en condiciones libres de RNAsa de la siguiente manera: Etanol 70% 30 segundos, hematoxilina férrica 30 segundos, dos lavados de 1 minuto con etanol 95% y etanol 100% respectivamente.

La disección del tejido fue realizada con el Sistema de Microdissección de la marca LEICA Modelo LMD6000 y las fracciones celulares definidas: bronquios bronquiolos y parénquima pulmonar fueron recolectadas en 30 µl de buffer lisis para la extracción de RNA de acuerdo a lo descrito en el punto 13.1.

15. Análisis estadístico

Los gráficos y el análisis estadístico fueron realizados con el programa GraphPad versión 5.00 (San Diego, California, USA). Para el análisis estadístico se realizaron ANOVA de una o dos vías seguidas del test de Bonferroni o Tukey para la evaluación de diferencias de medias.

Además se realizaron Test de Student pareados y no pareados de acuerdo a los datos a evaluar.



Capítulo 1

Respuesta de la mucosa respiratoria frente a la estimulación intranasal con agonistas TLR

INTRODUCCIÓN

Los receptores TLR son actores claves en la inducción de la respuesta inmune, lo cual los ha convertido en potenciales blancos para el diseño de estrategias de inmuno-intervención frente a diversos tipos de patologías (Basith, Manavalan, Lee, Kim, & Choi, 2011; Dunne, Marshall, & Mills, 2011; Gambuzza et al., 2011; Romagne, 2007; Zhu & Mohan, 2010). En el caso de las patologías infecciosas estos receptores permiten reconocer y diferenciar distintos tipos de microorganismos estableciendo respuestas inmunológicas apropiadas para cada uno de ellos (Kawai & Akira, 2007; Kopp & Medzhitov, 2003). Como parte de las mismas se encuentran los mecanismos efectores que brindan barreras de contención temprana y proveen señales de activación y direccionamiento de la respuesta adaptativa. A través de su funcionalidad sobre las células dendríticas y las células de la inmunidad adaptativa, los receptores TLR determinan las características de la respuesta. Así, su activación tiene un impacto directo en la magnitud y calidad de la inmunidad adaptativa modulando además el perfil y la duración de la misma (Kasturi et al., 2011; Pasare & Medzhitov, 2005a; Bali Pulendran & Ahmed, 2006). Estas características hacen que los agonistas de receptores TLR se presenten como potenciales adyuvantes en la construcción de formulaciones vacunales (Duthie, Windish, Fox, & Reed, 2011). Sin embargo, la utilidad de los agonistas disponibles depende del patógeno en estudio puesto que los distintos receptores desencadenan mecanismos efectores particulares de acuerdo al microorganismo que reconocen. Así, la selección de los agonistas a emplear requiere el estudio de las vías de reconocimiento que participan en la defensa frente al patógeno de elección o bien el conocimiento de los mecanismos inmunológicos relevantes y cómo éstos pueden ser inducidos.

Por su parte, la ruta de inmunización mucosal ha cobrado importancia en el último tiempo debido a su capacidad de generar mecanismos inmunológicos con características específicas que son redirigidos a la propia mucosa (C Czerkinsky

& Holmgren, 2010; Jan Holmgren & Czerkinsky, 2005). En el caso de los patógenos respiratorios la inmunización intranasal parece ser la vía más promisoría para generar estrategias profilácticas y terapéuticas efectivas por lo cual escogimos esta vía de administración para el desarrollo de nuestros estudios.

La administración intranasal de agonistas TLR ha sido evaluada en distintas patologías respiratorias mostrando que estos receptores dan origen a respuestas inmunes activas (Becker et al., 2006; Hammerbeck et al., 2007; Horak, 2011; Lembo et al., 2008; Oma et al., 2009). A lo largo de la mucosa respiratoria, dos poblaciones celulares tienen disposiciones estratégicas para detectar inicialmente la presencia microbiana a través de sus patrones moleculares: las células epiteliales de las vías de conducción aérea y los macrófagos alveolares. Como consecuencia del reconocimiento, ambas poblaciones se activan dando lugar a la expresión de mediadores solubles que permiten orquestar la respuesta inmune y ponen en marcha distintos mecanismos microbicidas (Gordon & Read, 2002; Hippenstiel et al., 2006). Así, las células macrófagicas participan en la defensa frente a patógenos como *S. pneumoniae*, *B. pertussis*, *L. pneumophila* o *Aspergillus spp* entre otros (Carbonetti et al., 2007; Dockrell et al., 2003), mientras que el epitelio es importante para el control patógenos bacterianos gram negativos como *P. aeruginosa*, el principal agente etiológico de las neumonías hospitalarias, o *L. pneumophila*, así como también para las infecciones virales (A. M. Hajjar et al., 2005; Leibundgut-Landmann, Weidner, Hilbi, & Oxenius, 2011; Shornick et al., 2008). Sin embargo, si bien está aceptada la participación de ambas poblaciones celulares en la detección de PAMPs y la inducción de la respuesta inmune, aún existen aspectos de cómo se estructura la respuesta de la mucosa respiratoria que no están aún completamente esclarecidos. Entre ellos podemos mencionar aquellos referidos a la expresión y funcionalidad de receptores TLR a lo largo del tracto respiratorio, un aspecto que resulta relevante para la comprensión de los eventos iniciales en la interacción patógeno-huésped y el diseño de estrategias profilácticas/terapéuticas. En este sentido, si bien existen algunas evidencias, aun no se conoce cómo son los perfiles de expresión de estos receptores en distintas porciones del tracto respiratorio y poblaciones celulares. Cabe recordar, que las células epiteliales presentan variaciones morfológicas y funcionales a medida que

pasamos de las porciones superiores de las vías aéreas hasta alcanzar el alvéolo. Así es posible que también existan diferencias en la expresión de receptores de reconocimiento microbiano o incluso que existan diferencias en las respuestas funcionales originadas en distintas regiones a partir de la activación de un mismo receptor TLR. De igual manera es posible que la regulación de la funcionalidad de estos receptores también presente variaciones. Cada uno de estos aspectos puede influenciar significativamente cómo se estructura la respuesta inmune en el tracto respiratorio y el conocimiento de los mismos puede resultar de utilidad en la elaboración racional de estrategias determinadas de acuerdo a la respuesta que desee obtenerse.

En el caso de la infección por *B. pertussis* el estudio de la literatura indica que TLR-4 es el principal receptor innato involucrado en la defensa del huésped (H. Banus et al., 2006; Higgins et al., 2003). De acuerdo a ello en este trabajo decidimos evaluar cómo la modulación de la respuesta inmune a través de la activación de este receptor resulta de utilidad en la búsqueda de nuevas estrategias profilácticas frente a *B. pertussis*. Para ello estudiamos la respuesta promovida por TLR-4 en comparación con aquella inducida por TLR-3 y TLR-5, los cuales emplean vías de señalización parcialmente compartidas con TLR-4. El estudio comparativo de las características de cada una de las respuestas y su correlación con el efecto de la activación de estos tres receptores sobre la infección por *B. pertussis* resulta de interés a fin de comprender cuáles son los mecanismos inmunológicos que son necesarios para la defensa del huésped. Puesto que los receptores escogidos participan además en la detección de distintos tipos de agentes infecciosos que afectan la mucosa respiratoria, este tipo de estudio resulta de utilidad para poder discriminar cuáles son las características específicas de la respuesta inmune necesarias para combatir a distintos agentes y cómo dichas respuestas pueden ser inducidas.

Los ensayos que se presentan en este capítulo se basan en ensayos de administración intranasal de LPS de *E. coli*, flagelina de *S. typhimurium* o Poly IC para promover la activación de TLR-4, TLR-5 y TLR-3 respectivamente. El análisis de la respuesta fue centrado en el tracto respiratorio inferior en donde se evaluaron dos fenómenos distinguidos de la respuesta innata: la inducción de la

expresión génica de citoquinas y quimoquinas y el reclutamiento leucocitario. Como parte de estos estudios se analizó no sólo la respuesta pulmonar global sino además la de macrófagos alveolares (MA) y las células epiteliales, discriminando entre aquellas provenientes de distintas regiones de las vías aéreas. Mediante estos ensayos esperamos verificar el potencial inmunoestimulador de cada uno de estos agonistas discriminando las respuestas establecidas a fin de comprender sus efectos al ser empleados en distintos esquemas de inmuno-intervención frente a la patología originada por *B. pertussis*.

RESULTADOS

Para evaluar cómo responde la mucosa la mucosa respiratoria a la activación local de TLR-3, TLR-4 y TLR-5, administramos por vía intranasal 1µg de flagelina, 1µg de LPS de *E. coli* o 50µg de Poly IC en animales Balb/c. Dichas dosis fueron escogidas de acuerdo a resultados previos del grupo de trabajo y a la bibliografía disponible al momento de iniciar los presentes estudios (Asahi-Ozaki et al., 2006; Honko, Sriranganathan, Lees, & Mizel, 2006; Ramos, Rumbo, & Sirard, 2004).

Para comenzar con la caracterización, se evaluó la activación transcripcional de un panel de marcadores de la inmunidad innata mediante PCR cuantitativa (qPCR). Particularmente se escogieron citoquinas y quimoquinas que pueden ser expresados por diversos tipos celulares presentes en la mucosa respiratoria: IL-6, CXCL1, CXCL2 y CXCL10. Como control fueron empleados animales sin tratar (naive) cuya respuesta fue empleada para el cálculo de los niveles de expresión relativos para cada marcador (Figura 1.1).

Como puede apreciarse en la Figura 1.1, todos los agonistas inducen la activación de la inmunidad innata a nivel pulmonar. Todos los tratamientos promovieron la expresión de cada uno de marcadores analizados a las 2h post-infección ($p < 0,05$). A las dosis empleadas flagelina parece ser el estímulo más intenso induciendo los niveles más altos de IL-6 y de las quimoquinas reclutadoras de neutrófilos CXCL1 y CXCL-2, con niveles de incremento relativo promedio que varían entre 145 y 800 veces de acuerdo al marcador

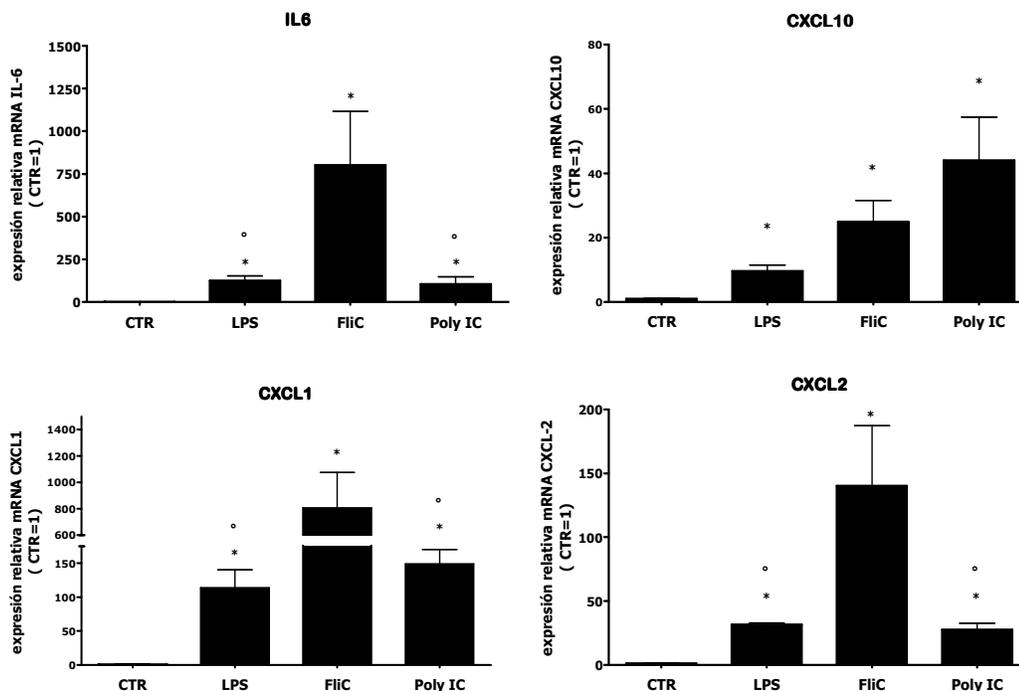


Figura 1.1: Niveles de expresión génica citoquinas y quimocinas en pulmón por estimulación intranasal con agonistas TLR.

Los resultados muestran los valores de incremento relativo promedio \pm SEM obtenidos a las 2 h post-estimulación para cada condición respecto del control (animales *naive*). Por cada condición fueron empleados tres animales. La figura muestra los resultados representativos de tres experimentos realizados. FltC: flagelina

Diferencias significativas $p < 0,05$, Test de Bonferroni * con respecto del control. ° respecto de flagelina.

A los tiempos estudiados los niveles de inducción de dichas moléculas resultan equivalentes en el caso de la señalización a través de TLR-3 y TLR-4, no existiendo diferencias estadísticas significativas entre ambos tratamientos. Por su parte, la expresión de CXCL10 presenta un comportamiento distinto a los demás marcadores. En este caso, Poly IC es el tratamiento que genera la respuesta más intensa, generando aumentos en los niveles de expresión promedio cercanas a las 44 veces respecto del control. Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las respuestas generadas por los tres agonistas TLR. Los resultados indican que si bien tanto LPS como flagelina y Poly IC estimulan la inmunidad innata a nivel pulmonar las respuestas desencadenadas presentan diferencias.

Como hemos mencionado, existe poca información sobre la respuesta *in vivo* de distintas regiones del tracto respiratorio a la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos. Con el fin de avanzar en la caracterización de la respuesta mucosal a nuestros tres agonistas, decidimos profundizar en estos aspectos evaluando en forma comparativa la respuesta promovida en distintas regiones del árbol respiratorio. Para ello empleamos el mismo diseño experimental que describimos anteriormente: ratones Balb/c recibieron por vía intranasal LPS, flagelina y Poly IC en las dosis previamente indicadas empleando animales sin tratar como control. La respuesta fue evaluada nuevamente por medida de la activación transcripcional a las 2h post-tratamiento de los marcadores innatos seleccionados. Sabiendo que todos los agonistas son capaces de estimular la inmunidad innata pulmonar, decidimos comparar esta respuesta con la originada en las vías de conducción aérea centrales del tracto respiratorio inferior.

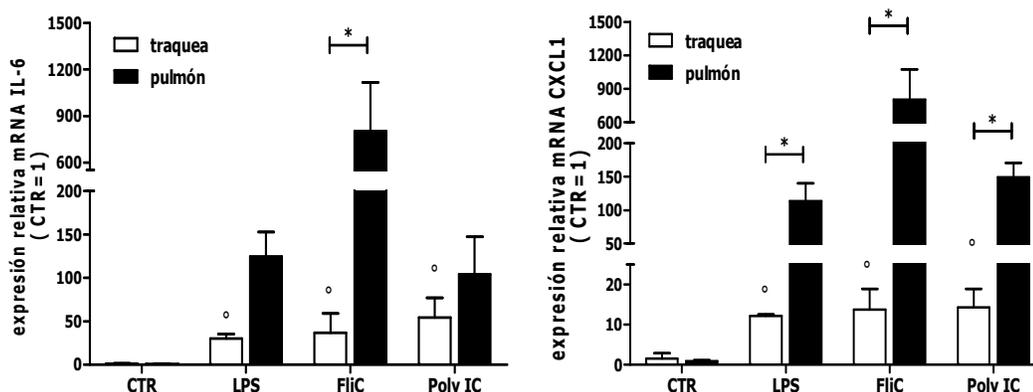


Figura 1.2: Niveles de expresión de IL-6 y CXCL1 en traquea y pulmón frente a la estimulación intranasal con agonistas TLR.

Los resultados muestran los valores de incremento relativo promedio \pm SEM para cada condición respecto del control (animales *naive*) en cada tejido. Por cada condición se emplearon tres animales. La figura es representativa de dos ensayos realizados. FlIC: flagelina. Diferencias significativas $p < 0.01$ Test de Bonferroni: ° respecto del control *naive* a nivel traqueal; * entre compartimentos para un mismo tratamiento.

Como muestra la Figura 1.2, las células traqueales responden a la estimulación *in vivo* con los tres agonistas TLR generando incrementos

estadísticamente significativos de la expresión de IL-6 y CXCL1 respecto del tratamiento control ($p < 0,05$). La quimoquina CXCL2 también fue determinada pero no pudieron encontrarse diferencias significativas respecto del control (datos no presentados). Por otra parte, los tres agonistas desencadenaron respuestas comparables en términos de los niveles de expresión inducidos para cada marcador. Para todos los agonistas IL-6 presentó un incremento relativo promedio de alrededor de 50 veces mientras que CXCL1 tuvo incremento menores cercanos a 15 veces en relación al control sin tratar.

La comparación de la respuesta traqueal con la pulmonar en base a los niveles de expresión encontrados para IL-6 y CXCL1 pone de manifiesto distintas diferencias (Figura 2.2). Por un lado, la magnitud de la respuesta traqueal siempre es menor que la pulmonar a pesar de que por la metodología de estimulación es probable que exista mayor biodisponibilidad de los agonistas en las regiones superiores del tracto respiratorio que en las inferiores. Por otro lado, mientras que a nivel traqueal la respuesta a los agonistas es equivalente en términos de la magnitud de inducción de CXCL1 e IL-6 a nivel pulmonar sí existen diferencias siendo flagelina el estímulo más intenso mientras que LPS y Poly IC muestran comportamientos similares con menores niveles de estimulación.

Habiendo encontrado diferencias regionales en la respuesta a los tres agonistas y siendo el pulmón un órgano con gran capacidad de estimulación se decidió evaluar la contribución de distintos compartimentos celulares/regionales a la respuesta global frente a LPS, flagelina y Poly IC. Como hemos mencionado, dentro del pulmón las células epiteliales y los MA son las células centinela de la inmunidad innata y poseen roles activos en la detección de compuestos microbianos y la inducción de los mecanismos de defensa de la mucosa respiratoria. Sin embargo, aunque existe información sobre la respuesta de los MA a los agonistas TLR, poco se sabe acerca de cómo es la respuesta *in vivo* del epitelio pulmonar a medida que se avanza desde los bronquios principales hacia los sacos alveolares. Con el fin de evaluar la respuesta de estos dos tipos celulares y determinar la capacidad de respuesta de distintos compartimentos pulmonares al estímulo con agonistas TLR, se realizaron ensayos *in vivo* y *ex vivo*. Para los ensayos *in vivo* continuamos con el mismo esquema experimental

empleado hasta ahora: estimulación intranasal de animales Balb/c con cada uno de los tres agonistas y evaluación de la respuesta a las 2h post-estimulación por medida de la activación transcripcional de quimoquinas y citoquinas por PCR cuantitativa. Con la idea de analizar la respuesta epitelial pulmonar, se realizaron ensayos de microdissección láser en los que se distinguieron y se obtuvieron tres grandes regiones pulmonares: vías aéreas grandes o bronquios, vías aéreas de menor calibre o bronquiolos y finalmente, el parénquima pulmonar. Mientras las primeras dos fracciones están enriquecidas en células epiteliales el parénquima pulmonar contiene tanto células presentes en el alveolo como los MA y los neumocitos tipo I y II como así también las células estromales y aquellos leucocitos residentes propios de la estructura pulmonar (Figura 1.3). Esta región fue definida de forma tal que no incluyan células de vías de conducción aéreas ni vasos sanguíneos de calibre intermedio.

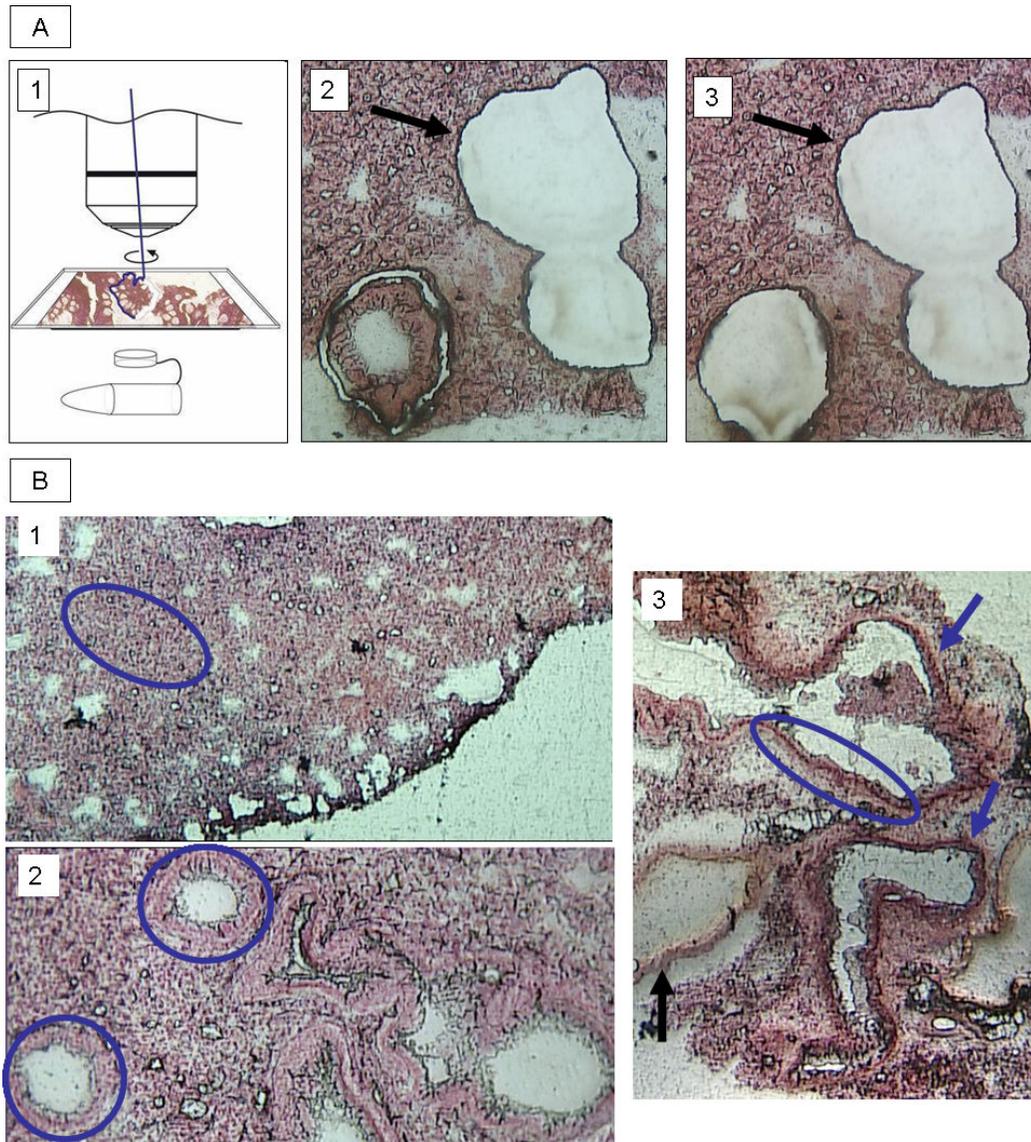


Figura 1.3: Obtención de fracciones celulares por microscopía de disección láser (MDL).

A) Proceso de obtención de muestra por MDL. 1) Esquema de disección y recolección de muestra. El láser incide sobre el preparado histológico siguiendo un recorrido determinado por el usuario. El corte tisular así obtenido es recogido en la tapa de un microtubo ubicado por debajo del preparado en un soporte ad-hoc. 2 y 3) Secuencia de microdisección láser de un bronquiolo en corte histológico de pulmón. 2) Puede observarse el corte producido por el recorrido del láser. 3) Región cortada ya desprendida. Las flechas negras en ambas imágenes señalan una región de tejido previamente disecada.

B) Definición de regiones pulmonares escogidas para microdisección láser. En azul se muestran las porciones colectadas. 1) Parénquima pulmonar, 2) Bronquiolos, 3) Epitelio bronquial. Las flechas azules señalan los bronquios y la flecha negra muestra un vaso sanguíneo.

A partir de cada una de estas fracciones celulares se evaluaron los perfiles de expresión para distintos genes a las 2h post-estimulación. Los valores de

incremento relativo fueron calculados respecto de los niveles de expresión encontrados en cada región para animales *naive*. En la figura 1.4 se presentan los resultados encontrados para el tratamiento intranasal con LPS.

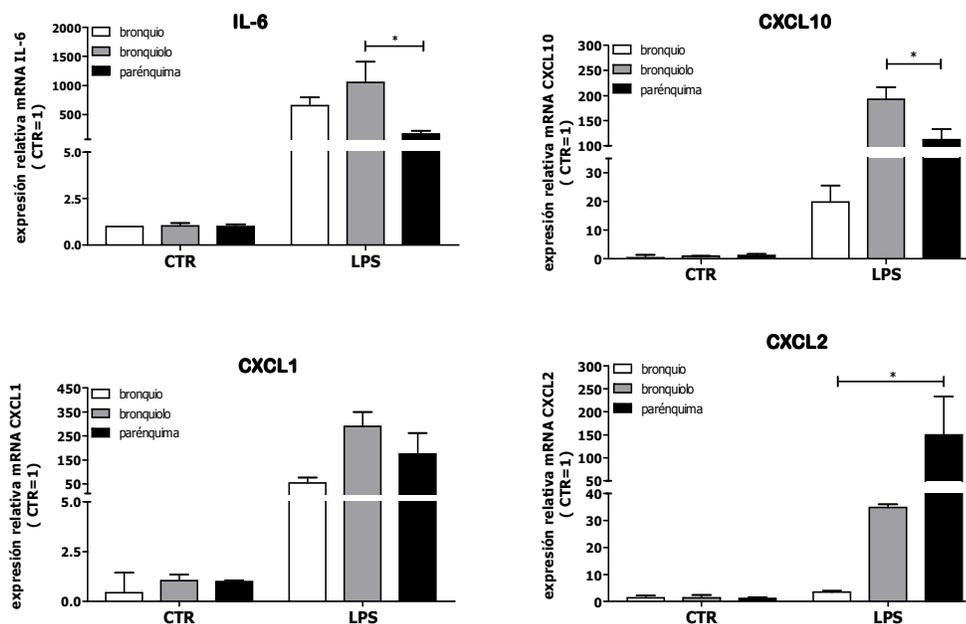


Figura 1.4: Compartimentalización de la respuesta pulmonar inducida por la activación de TLR-4.

Análisis por microscopía de disección láser y PCR cuantitativa de la respuesta pulmonar bronquial, bronquiolar y de parénquima a 2h post-estimulación intranasal de animales Balb/c con 1µg de LPS. Se representa el incremento relativo promedio \pm SEM de cada condición respecto del control (animales *naive*) de cada región (n=3). Diferencias significativas $p < 0.01$, Test de Bonferroni * entre compartimentos para un mismo tratamiento.

El análisis de los niveles de expresión para los 4 marcadores evaluados muestra que tanto los bronquios como bronquiolos y parénquima pulmonar responden al tratamiento intranasal con LPS. Sin embargo cada marcador muestra perfiles particulares de expresión. A excepción de CXCL2 todos los marcadores presentaron incrementos estadísticamente significativos respecto del control ($p < 0,01$) en todas las regiones. Por su parte, CXCL2 sólo presentó diferencias a nivel del bronquiol y el parénquima pulmonar ($p < 0,01$), presentando en este último caso los mayores niveles de expresión encontrados. Adicionalmente pudieron observarse otras diferencias. Las quimoquinas CXCL1 y

CXCL10 parecen tener un comportamiento similar presentando niveles de inducción en bronquiolo que superan entre 6 y 10 veces a los niveles encontrados en bronquio. El parénquima pulmonar también presenta una expresión considerable de ambos marcadores en respuesta al LPS con valores de inducción cercanos a 100 y 150 veces para CXCL10 y CXCL1 respectivamente. Por el contrario IL-6 parece tener un comportamiento diferente al de las quimoquinas analizadas. En este sentido, observamos que IL-6 fue inducida en niveles comparables en las tres regiones no existiendo diferencias entre bronquios y bronquiolos. Así, aunque no pudo evidenciarse un comportamiento único para todos los marcadores los resultados parecen indicar la existencia de diferencias de sensibilidad a las distintas regiones. Así, en términos generales los marcadores presentaron menores niveles de inducción en bronquios respecto de bronquiolos a excepción de IL-6.

Este mismo análisis fue realizado para flagelina y Poly IC. En la figura 1.5 se muestran los resultados comparativos para todos los agonistas empleados.

El análisis de los niveles de expresión para los 4 marcadores mostrado en la Figura 1.5 indica que tanto flagelina y Poly IC estimularon la respuesta de las distintas regiones pulmonares en forma análoga a lo observado para el LPS. De la misma manera, también en este caso parecen existir algunas diferencias en la inducción de los distintos marcadores. Mientras IL-6 y las quimoquinas CXCL1 y CXCL10 presentaron incrementos estadísticamente significativos en todas las regiones para los tres agonistas ($p < 0,01$), CXCL2 no fue expresada en la fracción bronquial pero sí en las restantes ($p < 0,01$) independientemente del agonista empleado.

Al evaluar la compartimentalización de la respuesta a los agonistas TLR empleados observamos que, a excepción de IL-6, las vías respiratorias mayores tienden a presentar para cada marcador niveles de inducción menores a encontrados en los bronquiolos o vías inferiores de menor calibre. En este sentido a nivel bronquiolar los niveles de expresión que superan entre 3 y 10 veces a los niveles encontrados en vías aéreas de mayor calibre dependiendo de la quimoquina y agonista analizado. Sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en estos casos

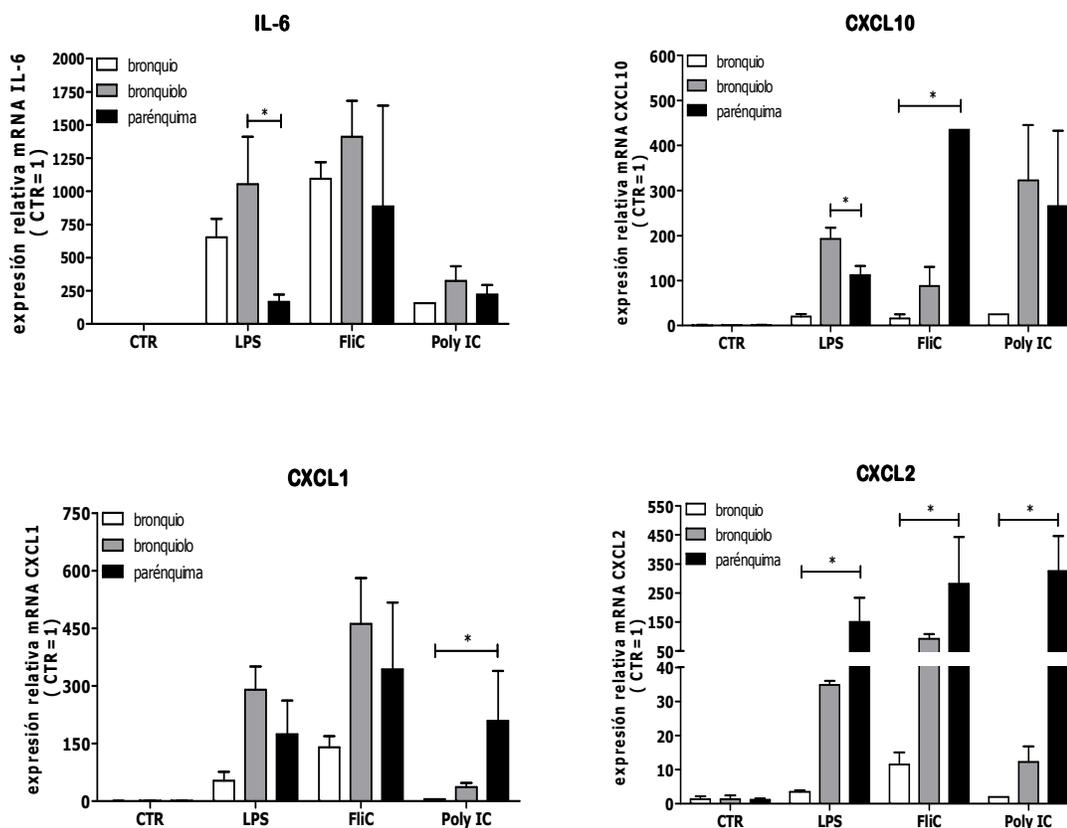


Figura 1.5: Compartimentalización de la respuesta pulmonar a los agonistas TLR.

Análisis por microscopía de disección láser y PCR cuantitativa de la respuesta pulmonar bronquial, bronquiolar y de parénquima a 2h post-estimulación intranasal de animales Balb/c con 1µg de LPS, 1µg de flagelina (FliC) o 50µg de Poly IC. Se representa el incremento relativo promedio ± SEM de cada condición respecto del control (animales naive) de cada región (n=3). Diferencias significativas p < 0.01, Test de Bonferroni * entre compartimentos para un mismo tratamiento.

Los resultados también sugieren la existencia de diferencias en la expresión de los marcadores a lo largo de las distintas regiones independientemente del agonista TLR. En términos generales las quimoquinas presentan niveles de incrementos mayores en bronquiolos y parénquima pulmonar. Por el contrario IL-6 es un marcador altamente inducible en todas las vías aéreas inclusive los bronquios con incrementos en los niveles de expresión superiores a 150 veces respecto del control para todos los agonistas y compartimentos. Por otra parte, la comparación entre los niveles de inducción para CXCL1 vs CXCL2 en cada región para cada uno de los agonistas sugiere

también la existencia de diferencias. A nivel del parénquima la producción de ambas quimoquinas parece ser equivalente. Por el contrario, CXCL1 fue inducido en ambas porciones de las vías aéreas mientras que CXCL2 sólo presentó incrementos estadísticamente significativos en el compartimento de bronquiolos. Este hallazgo fue independiente del agonista empleado. Asimismo, en el bronquiolo, en donde ambas quimoquinas fueron inducidas significativamente ($p < 0,01$), CXCL2 presentó incrementos máximos de 90 veces respecto del control mientras que los correspondientes a CXCL1 alcanzaron aproximadamente 460 veces.

Los datos presentados en la Figura 1.5 muestran que no hay un único patrón de comportamiento que pueda ser trazado para todos los marcadores dentro de las respuestas promovidas por los distintos agonistas en distintas regiones.

En resumen podemos decir que tanto LPS, flagelina y Poly IC son buenos estimuladores de la respuesta inmune local activando células de distintas regiones pulmonares al ser administrados por vía intranasal. La respuesta observada presenta algunas variaciones en los perfiles de marcadores inducidos para cada agonista de acuerdo a la región analizada. También pudo observarse cierta regionalización en la producción de los marcadores evaluados, siendo un ejemplo de ello las diferencias encontradas entre CXCL1 y CXCL2 y las variaciones en la expresión de IL-6 en respuesta a un mismo tratamiento.

Como hemos visto, cada uno de los marcadores innatos analizados puede tener distintas fuentes celulares, entre las cuales probablemente se encuentren los macrófagos alveolares. De acuerdo a ello se decidió analizar la respuesta de esta población celular a los distintos agonistas con el fin de completar el estudio de la contribución de distintos actores celulares a la respuesta pulmonar global. Con este objetivo se realizaron ensayos de estimulación *ex vivo* de las células obtenidas mediante lavado bronquioalveolar (BAL) de los pulmones de animales Balb/c *naive*. Cabe recordar que en condiciones de homeostáticas la mayor población presente en el espacio bronquioalveolar está constituida por los macrófagos alveolares. Para evaluar el perfil celular de la muestra así obtenida empleamos el análisis por citometría de flujo. Para ello las células fueron

marcadas con los siguientes marcadores de superficie: CD11b, CD11c, Ly6C y Ly6G. Los mismos fueron escogidos a fin de poder distinguir entre células neutrofílicas, células monocíticas y macrófagos alveolares. En la Figura 1.6 se presentan los dot-plot de tamaño y granularidad (FSC vs SSC) y la identificación de las poblaciones leucocitarias hallados en el espacio bronquioalveolar en condiciones no inflamatorias.

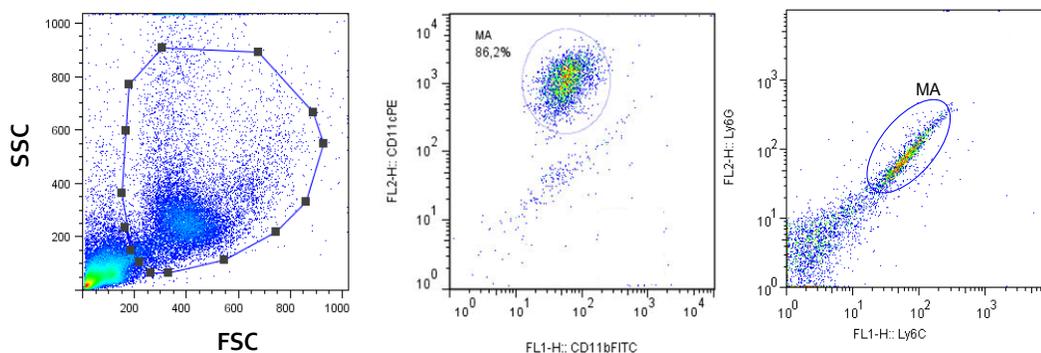


Figura 1.6: Identificación de poblaciones leucocitarias presentes en lavado bronquioalveolar por citometría de flujo.

El panel izquierdo muestra el perfil SSC vs FSC de las células que son obtenidas por BAL. Se indica además la región utilizada para el análisis de marcadores. Los gráficos a la derecha muestran los perfiles celulares encontrados, indicando la definición de macrófagos alveolares (MA) de acuerdo a su expresión de CD11c, CD11b, Ly6G y Ly6C.

El análisis del lavado bronquioalveolar de animales sin tratar nos permitió encontrar una única población leucocitaria de acuerdo a los marcadores empleados. Esta población fue caracterizada como CD11c+ CD11b^{neg} Ly6G^{neg} Ly6C^{neg} indicando que se corresponden con macrófagos alveolares. (Gonzalez-Juarrero, Shim, Kipnis, Junqueira-Kipnis, & Orme, 2003). Además, como puede apreciarse en el último panel de la Figura 1.6, esta población es autofluorescente una característica adicional que se emplea normalmente para distinguir a los macrófagos alveolares de otras poblaciones celulares (Vermaelen & Pauwels, 2004). Como puede observarse en el panel 2 de la figura 1.6, los macrófagos alveolares fueron la población mayoritaria en los animales *naïve*, representando aproximadamente el 80% de las células encontradas. Sin embargo también pudo observarse la presencia de células que son negativas para los 4 marcadores empleados indicando que su origen no es mieloide. Es posible que las mismas correspondan a células epiteliales que son desprendidas por daño mecánico

durante la realización del lavado aunque no se han empleado marcadores para discriminar su identidad.

Las células así obtenidas fueron estimuladas *in vitro* con cada uno de los agonistas. Las dosis empleadas fueron: 1µg/ml para LPS y flagelina y 50 µg/ml para Poly IC. A las 2h post-estimulación la respuesta fue cuantificada nuevamente por medida de la expresión génica tal como se viene discutiendo (Figura 1.7).

En este ensayo sólo dos marcadores fueron evaluados: CXCL10 e IL-6. Tal como se aprecia en la Figura 1.7 todos los tratamientos activaron significativamente las células obtenidas del espacio bronquioalveolar ($p < 0,01$).

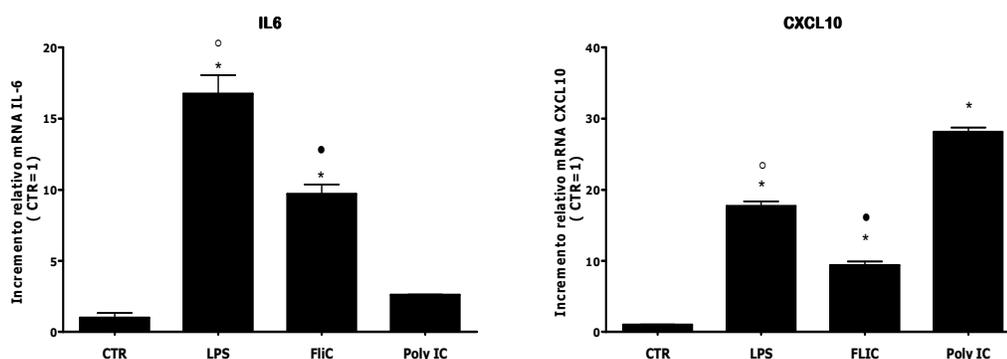


Figura 1.7: Niveles de expresión de IL6 y CXCL10 en macrófagos alveolares luego del tratamiento con agonistas TLR.

Las células obtenidas por BAL de animales Balb/c naive fueron estimuladas *in vitro* con 1µg/ml de LPS, 1µg/ml de flagelina (FLIC) o 50 µg/ml de Poly IC. A 2h post-estimulación fue medida la expresión génica de IL-6 y CXCL10 mediante PCR cuantitativa. Por cada condición se realizaron dos estimulaciones independientes. Los resultados muestran los valores de incremento relativo promedio \pm SEM de cada condición respecto del control no estimulado.

Diferencias significativas $p < 0.01$ Test de Bonferroni * respecto del control, ° respecto de flagelina y Poly IC. • respecto de Poly IC.

La comparación de la respuesta para cada agonista mostró diferencias estadísticamente significativas entre los mismos tanto para IL-6 como para CXCL10. Así, el LPS produce los mayores incrementos en la expresión de IL-6 con niveles de expresión que superan en aproximadamente 15 veces a los valores control. Por el contrario, Poly IC no estimula la producción de dicha citoquina aunque es el estímulo más potente para la expresión de CXCL10. Flagelina por su parte promueve la expresión de ambos marcadores con niveles

intermedios a los inducidos por LPS o Poly IC según el marcador. Aunque los macrófagos alveolares fueron la población mayoritaria en el BAL, no es posible descartar la contribución de las otras células presentes a los perfiles de respuesta observados (Figura 1.6). Si bien estos ensayos representan una buena aproximación de la respuesta de los MA a los agonistas TLR, la respuesta de estas células *in vivo* no necesariamente es la evidenciada en ensayos *in vitro*. Varios motivos, que van desde las dosis de agonistas que son sensadas *in vivo* dónde múltiples mecanismos están dispuestos para limitar la accesibilidad de estímulos exógenos al compartimento alveolar hasta el posible condicionamiento de la respuesta por la interacción con otras células, pueden dar origen a diferencias. Con la intención de analizar si los macrófagos alveolares mantienen la capacidad de responder a LPS, flagelina y Poly IC *in vivo* realizamos ensayos de estimulación intranasal con las dosis de agonistas empleadas originalmente: 1µg de LPS, 1µg de flagelina y 50 µg de Poly IC. A las 2h post-estimulación se obtuvieron las células presentes en el espacio bronquioalveolar mediante BAL y el perfil de expresión génica de IL-6, CXCL1 y CXCL2 fue evaluado para cada tratamiento. Como control fue obtenido el BAL de animales sin tratar (Figura 1.8).

Tal como se muestra en la Figura 1.8, la estimulación intranasal con cada uno de los agonistas TLR es capaz de activar las células presentes en el espacio bronquioalveolar luego de 2h post-estimulación ($p < 0,05$). Las respuestas encontradas señalan que todos los agonistas inducen la expresión de IL-6, CXCL1 y CXCL2. Sin embargo, las respuestas generadas por cada agonista presentan diferencias. Para todos los marcadores Poly IC resultó ser el estímulo menos intenso. Por su parte LPS y flagelina se comportaron de manera equivalente incrementando de manera notable la expresión de los tres marcadores evaluados con niveles promedio que van desde 750 veces para IL-6 hasta valores superiores a las 1500 veces para CXCL1.

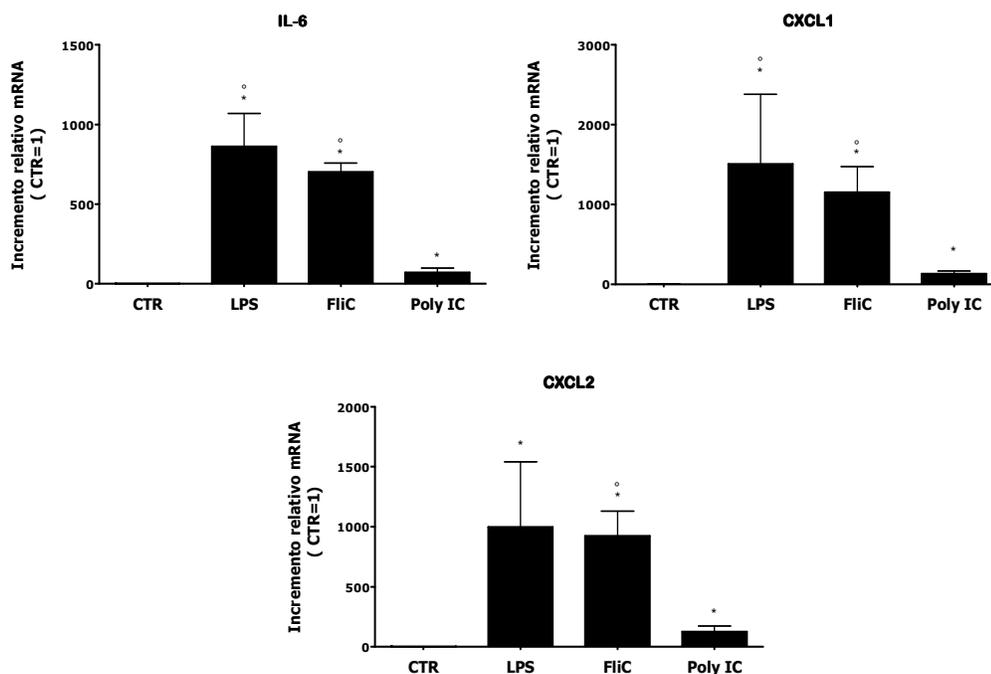
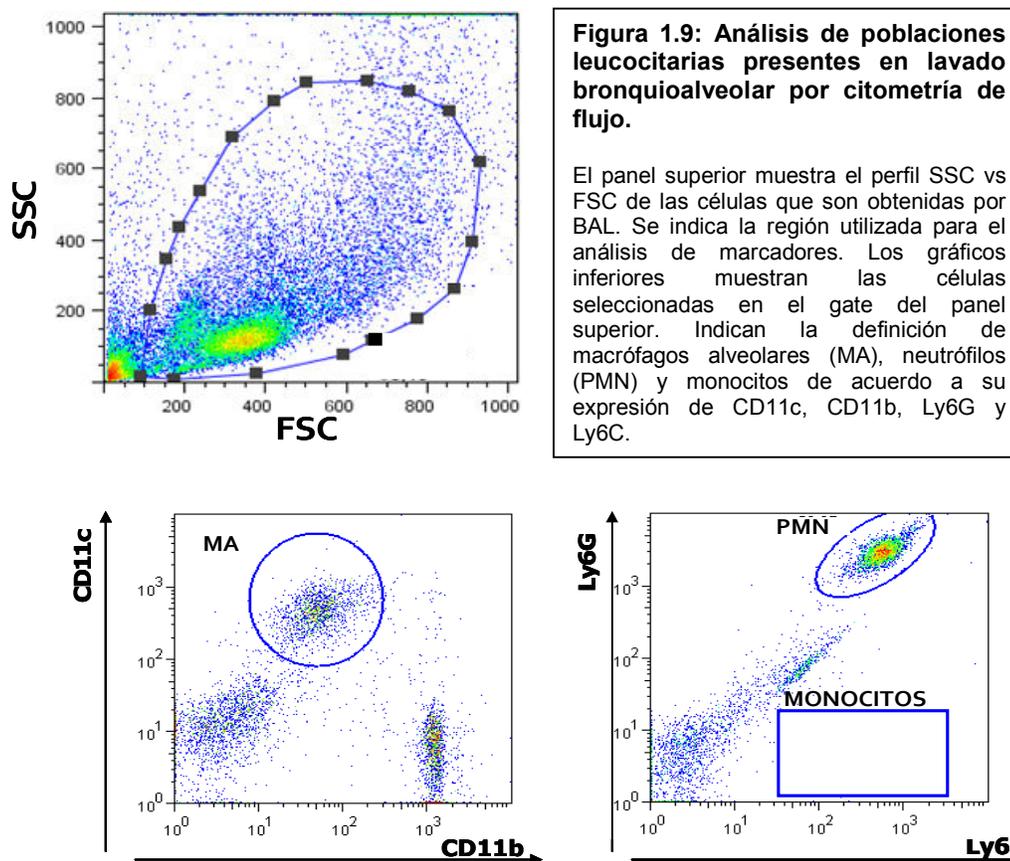


Figura 1.8: Respuesta de células presentes en espacio bronquioalveolar a la estimulación intranasal con agonistas TLR.

Animales Balb/c fueron estimulados con 1 μ g de LPS, 1 μ g de flagelina (FltC) y 50 μ g de Poly IC y la respuesta de las células obtenidas por BAL fue evaluada por la medida de la expresión génica de IL-6, CXCL1 y CXCL2 mediante qPCR. Los resultados muestran los valores de incremento relativo promedio \pm SEM de cada condición respecto del control sin tratar. Por cada tratamiento fueron empleados 3 animales. La figura muestra los resultados representativos de dos ensayos realizados. Diferencias significativas p < 0.05 Test de Bonferroni * respecto del control ° respecto de Poly IC.

Una de las características de la respuesta innata de la mucosa respiratoria es el reclutamiento leucocitario. Con el objeto de verificar si la respuesta transcripcional observada se debe a la presencia de poblaciones leucocitarias equivalentes a las presentes en el espacio bronquioalveolar de animales *naïve* o bien si existe alguna otra contribución celular se analizó por citometría de flujo el perfil celular de los BAL correspondientes a cada tratamiento. Los marcadores celulares empleados, fueron los mismos que los empleados previamente. En la Figura 1.9 se presentan a modo de ejemplo los dot-plot de tamaño y granularidad (FSC vs SSC) correspondientes al BAL y las definiciones de las poblaciones leucocitarias que pueden ser encontradas.



De acuerdo a la bibliografía existente los neutrófilos fueron definidos como células $CD11c^- CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^+$, los macrófagos, $CD11c^+ CD11b^- Ly6G^- Ly6C^-$ y los monocitos $CD11c^{neg} CD11b^+ Ly6G^{neg} Ly6C^+$ (Gonzalez-Juarrero et al., 2003; Lagasse & Weissman, 1996; Nagendra & Schlueter, 2004). Como mencionamos previamente, también pueden ser encontradas células que son negativas para estos 4 marcadores, correspondientes probablemente a células epiteliales.

De acuerdo a este análisis, todos los agonistas promovieron el reclutamiento leucocitario luego de 2 h posteriores a la administración intranasal de los mismos (Figura 1.10).

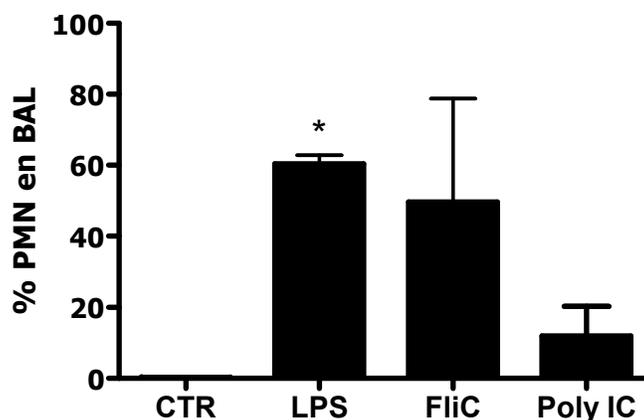


Figura 1.10: Reclutamiento leucocitario temprano al espacio bronquioalveolar en respuesta a la estimulación intranasal con agonistas TLR.

Los valores representan los niveles promedio de la proporción \pm SEM de neutrófilos en el espacio bronquioalveolar de ratones tratados con LPS, flagelina (FlIC) o Poly IC. Control: CTR. Para cada tratamiento el número de ratones empleados fue de 3. La figura es representativa de dos ensayos realizados.

Diferencias significativas $p < 0.1$ Test de Bonferroni * respecto del control sin tratar.

En todos los casos las células reclutadas fueron neutrófilos aunque en proporciones variables de acuerdo al agonista evaluado. El LPS fue el tratamiento que provocó el reclutamiento mayor de neutrófilos, los cuales representaron aproximadamente el 60% de las células encontradas en el espacio bronquioalveolar. Poly IC fue el tratamiento que provocó el menor reclutamiento neutrofilico, con cerca del 15% de las células presentes en BAL correspondientes a neutrófilos, mientras que flagelina presentó niveles intermedios. De acuerdo a estos resultados, la respuesta transcripcional observada en la Figura 1.8 no puede ser atribuida sólo a los macrófagos alveolares sino que probablemente tenga una contribución neutrofilica dada la capacidad de estas células de producir múltiples marcadores inflamatorios. De hecho parece haber un paralelismo entre los niveles de repuesta para cada tratamiento y el reclutamiento neutrofilico: Poly IC, el agonista que presenta menor proporción de neutrófilos en el espacio bronquioalveolar a las 2h post-estimulación es el tratamiento menos intenso en la producción de IL-6, CXCL1 y CXCL2. Por su parte, LPS y flagelina con un reclutamiento comparable de esta población también presentan niveles equivalentes de inducción de dichos marcadores.

Dado que los agonistas generaron el reclutamiento leucocitario temprano se decidió completar el estudio del comportamiento de cada uno de ellos en referencia a este fenómeno. Para ello, se administraron por vía intranasal 1 µg de LPS, 1µg de flagelina y 50µg de Poly IC y el reclutamiento de monocitos, neutrófilos y la macrófagos alveolares fue evaluada por citometría de flujo a las 24h post-estimulación tanto a nivel del espacio alveolar como del parénquima pulmonar. En la Figura 1.11 se muestra el reclutamiento leucocitario al espacio bronquioalveolar para cada tratamiento.

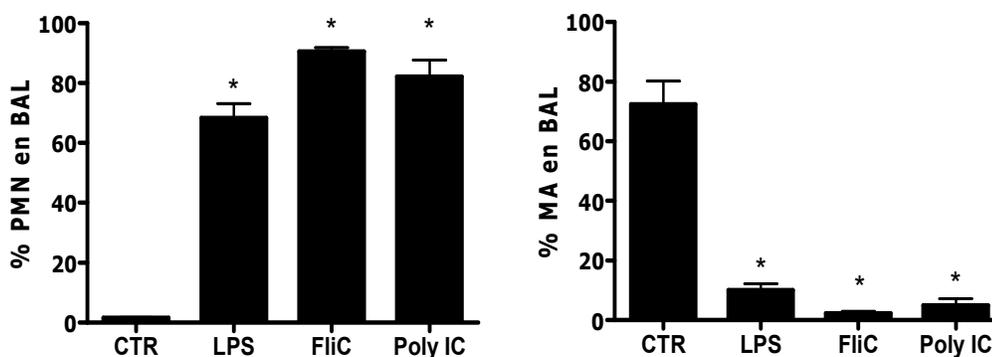


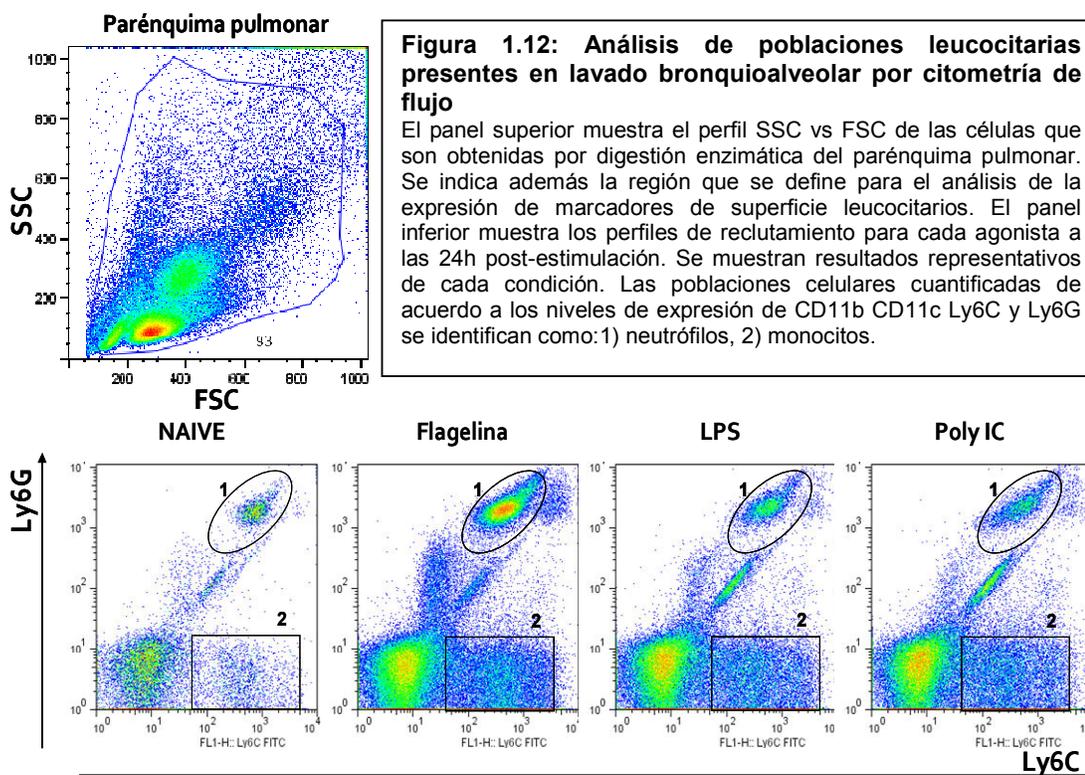
Figura 1.11: Poblaciones leucocitarias reclutadas al espacio bronquioalveolar en respuesta a la estimulación intranasal de agonistas TLR.

El reclutamiento leucocitario fue evaluado a las 24h de la estimulación intranasal de animales Balb/c con LPS, flagelina (FliC) y Poly IC mediante citometría de flujo del BAL. Los valores representan los niveles promedio de la proporción \pm SEM de dicha población para cada tratamiento (n=3). Las figuras son representativas de 3 experimentos realizados. Diferencias significativas $p < 0.1$ test de Bonferroni * respecto del control sin tratar.

En animales *naïve*, tal como es referido en la literatura, la población mayoritaria corresponde a los MA ($CD11c^+ CD11b^- Ly6G^- Ly6C^-$, Figura 1.6). Estas células representan aproximadamente el 80% de las células encontradas en el lavado bronquioalveolar (Figura 1.11 panel izquierdo). En los animales estimulados por su parte, dos poblaciones leucocitarias principales fueron encontradas a las 24h de recibido el estímulo: los macrófagos alveolares y los neutrófilos ($CD11c^- CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^+$, Figura 1.9). Este comportamiento también fue observado tempranamente (2h post-estimulación Figura 1.10) y se ve intensificado a las 24h. Así, los neutrófilos representan aproximadamente el 80%

de las células halladas para flagelina y Poly IC. En el caso del LPS aproximadamente el 70% de las células del BAL correspondieron a neutrófilos en forma similar al comportamiento observado a las 2h post-estimulación (Figura 1.10). A las 24h además todos los agonistas parecen tener el mismo comportamiento, a diferencia de lo observado tempranamente en donde el LPS es el único tratamiento que produce un incremento estadísticamente significativo de la presencia neutrofílica (Figura 1.10).

Para finalizar la caracterización de la respuesta de la mucosa a LPS, flagelina y Poly IC, analizamos el reclutamiento de células al parénquima pulmonar a las 24h post-estimulación. En la Figura 1.12 se indica el perfil celular correspondiente a este compartimento.



Tal como se observa el perfil celular del parénquima presenta mayor complejidad que el del espacio bronquioalveolar siendo posible apreciar diversas poblaciones celulares. Como se muestra en la Figura 1.12, todos los tratamientos con agonistas TLR promueve la llegada de diversas poblaciones leucitarias al parénquima pulmonar entre las que se distinguieron neutrófilos y monocitos entre

otras poblaciones que no pudieron ser identificadas con los marcadores empleados. El análisis comparativo de las poblaciones reclutadas al pulmón para cada tratamiento se muestra en la Figura 1.13.

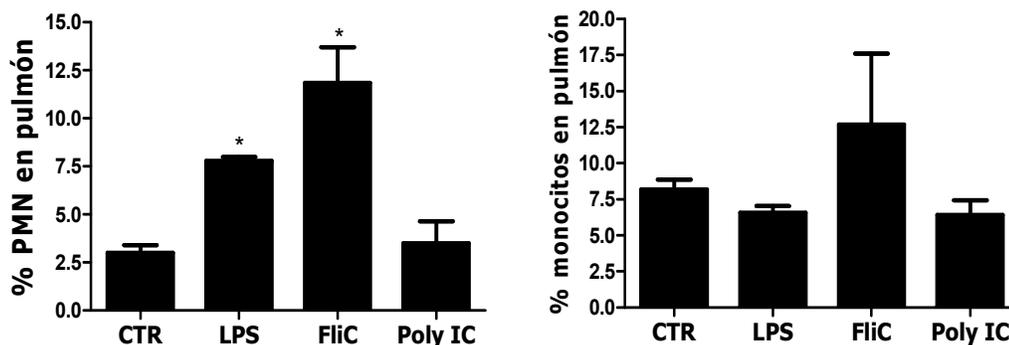


Figura 1.13: Reclutamiento leucocitario pulmonar inducido por la estimulación intranasal de agonistas TLR.

La presencia de neutrófilos y monocitos a nivel pulmonar 24h post-estimulación intranasal de animales Balb/C con LPS, flagelina y Poly IC fue evaluada en las condiciones descritas en la Figura 1.10. Los valores representan los niveles promedio de la proporción \pm SEM de cada población para los distintos tratamientos. Por cada condición se emplearon 3 animales. La figura muestra los resultados representativos de dos ensayos realizados.

*Diferencias significativas respecto del control $p < 0.05$ Test T

En forma similar a lo encontrado en el BAL, de las poblaciones leucocitarias que pudieron ser definidas con los marcadores empleados se observó el reclutamiento de neutrófilos al parénquima pulmonar. Tanto el tratamiento con LPS como con flagelina produjeron un reclutamiento significativo ($p < 0,05$). Por su parte Poly IC no mostró un aumento en la proporción de neutrófilos pulmonares lo que resulta contradictorio con el perfil observado en el lavado bronquioalveolar. Ninguno de los agonistas mostró un incremento significativo de monocitos a las 24h post-estimulación.

DISCUSION

A lo largo de este capítulo hemos analizado el potencial inmunoestimulador de LPS, flagelina y Poly IC al ser administrados por vía intranasal. El objetivo del trabajo experimental aquí presentado fue el de caracterizar las respuestas desencadenadas por TLR-4, TLR-5 y TLR-3 respectivamente con el fin de distinguir las particularidades de los fenómenos inducidos por cada agonista previo a su empleo en el marco de la infección por *B. pertussis*. En cada caso la caracterización fue realizada por determinación de la activación de la expresión temprana de marcadores pro-inflamatorios a nivel génico y del reclutamiento leucocitario, dos fenómenos característicos de la respuesta innata.

Para evaluar la respuesta a LPS, flagelina y Poly IC comenzamos por analizar la respuesta transcripcional pulmonar de un panel de marcadores de activación de la respuesta innata. Entre ellos se analizó la expresión de IL-6. Esta es una citoquina multifuncional que se expresa como parte de la inmunidad innata y su producción puede ser inducida en respuesta a la activación de diversos TLR (Jin et al., 2011; M. Yamamoto et al., 2004). IL-6 participa en múltiples aspectos de la respuesta inmune, desde la producción de reactantes de fase aguda que acontece rápidamente durante los procesos inflamatorios, pasando por la regulación del reclutamiento leucocitario y la transición a la respuesta adaptativa en donde participa en su inducción, direccionamiento y regulación (Jones, 2005). Entre las quimoquinas, fueron analizadas CXCL1 y CXCL2, las cuales funcionan como quimioattractantes de neutrófilos, las primeras células en arribar al pulmón en respuesta a los procesos pro-inflamatorios. A fin de escoger un marcador que sirva de indicador de la inducción de las vías TRIF dependientes, y consecuentemente de la actividad de Poly IC, se seleccionó IFN β , uno de los interferones tipo 1 que es clásicamente inducido por estas vías de señalización. Sin embargo, no fue posible detectar su expresión en los ensayos realizados a pesar del empleo de distintos diseños de primers por lo que en su lugar se decidió en su lugar evaluar la expresión de CXCL10. Esta quimoquina, reclutadora de linfocitos y células NK claves en las respuestas anti-virales, es inducida en respuesta a la activación de TLR-3 debido a la presencia de sitios de respuesta a

interferón o ISRE en su región promotora (Lu, Masic, Liu, & Zhou, 2011). Estas secuencias permiten la interacción con distintos factores de transcripción de la familia IRF, entre ellos IRF-3 cuya activación es inducida en respuesta a la señalización a través de TLR-3. La transcripción de este gen también está regulada por la presencia de sitios de unión a NFκB en su promotor por lo cual este marcador también debería verse activado en respuesta a los otros dos agonistas seleccionados: LPS y flagelina (X. Lu, Masic, Liu, & Zhou, 2011). Estos estudios permitieron confirmar que las dosis de trabajo escogidas para cada uno de los agonistas son suficientes para generar una activación contundente de la inmunidad innata (Figura 1.1). Todos los tratamientos produjeron considerables incrementos de IL-6, CXCL1, CXCL2 y CXCL10 con valores variables de acuerdo al agonista y al marcador. Flagelina fue el agonista que produjo los mayores niveles de inducción de todos los marcadores a excepción de CXCL10. Para esta citoquina, Poly IC fue el tratamiento que generó la respuesta más intensa aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto de flagelina o LPS. Las diferencias encontradas entre los distintos agonistas para cada marcador podrían estar señalando diferencias en la contribución de las vías IRF/NFκB a la expresión de cada uno de estos marcadores al tiempo evaluado en este ensayo. Así IL-6, CXCL1 y CXCL2 fueron mayormente inducidos por agonistas que emplean la señalización MyD-88 y promueven la activación de NFκB. Por el contrario CXCL10 presentó mayores niveles en respuesta a la estimulación con el agonista que emplea la vía TRIF y desencadena la activación de los factores reguladores de interferón.

Sabiendo que todos los tratamientos fueron efectivos, se decidió profundizar el estudio analizando el impacto de la estimulación *in vivo* de cada agonista sobre distintas regiones del tracto respiratorio. Comenzamos por realizar una primera distinción entre vías aéreas centrales, en particular la respuesta traqueal, respecto de la respuesta pulmonar previamente determinada. Luego analizamos cómo distintas zonas del pulmón participan en el reconocimiento de agonistas TLR y contribuyen a la respuesta global. Así, distinguimos entre vías aéreas y parénquima pulmonar diferenciando la contribución de células epiteliales de bronquios y bronquiolos y la respuesta de MA y células presentes en espacio alveolar (Figuras 1.2 y Figuras 1.4 a 1.8).

El análisis de la literatura indica que existen pocos estudios donde se evalúe la compartimentalización de la respuesta de la mucosa respiratoria a estímulos microbianos individuales. Existen algunos trabajos que se focalizan en la respuesta pulmonar *in vivo*, distinguiendo la contribución de las células hematopoyéticas respecto de las células estructurales, entre ellas las epiteliales (Cheng, Han, Chen, Sherrill, et al., 2007; Janot et al., 2009), aunque casi no existen estudios *in vivo* analizando la contribución de células epiteliales de distintas regiones de las vías aéreas pulmonares. Por el contrario, la mayoría de los trabajos reflejan las respuestas de líneas celulares o cultivos primarios *in vitro* (Armstrong et al., 2004; Muir et al., 2004; Parilla, Hughes, Lierl, Wong, & Page, 2006) y prácticamente no existen ensayos comparativos. Sin embargo, este tipo de análisis resulta de utilidad para evaluar no sólo cuál es la participación de distintas regiones en la detección de estímulos innatos sino también la existencia de diferencias funcionales entre las regiones analizando la respuesta de cada una de ellas frente a un mismo agonista innato. Estos aspectos aún no están clarificados y su comprensión facilitaría el entendimiento acerca de cómo acontece el reconocimiento microbiano a lo largo del tracto respiratorio y cómo cada parte contribuye a la inducción y estructuración de la respuesta innata en la mucosa respiratoria. Además, el creciente interés sobre el empleo de agonistas de la inmunidad innata, en particular de los agonistas TLR, como agentes inmunomoduladores tanto en el tratamiento de desórdenes inmunológicos como en el desarrollo de vacunas mucosales convierte este tipo de estudios en herramientas para el diseño de estrategias dirigidas pudiendo decidir qué región debe ser estimulada de acuerdo a la respuesta que quiera ser obtenida.

Como hemos indicado, en nuestros estudios comenzamos por realizar una primer distinción entre vías aéreas centrales, en particular la respuesta traqueal, respecto de la respuesta pulmonar. Tanto LPS, como flagelina y Poly IC fueron capaces de estimular la respuesta traqueal indicando la expresión de los respectivos receptores en esta porción de las vías aéreas. Resultados análogos fueron encontrados por otros autores en sistemas de estimulación *in vitro* de células de distintas especies (S. B. Neff et al., 2006; Tseng, Do, Widdicombe, & Machen, 2006). De acuerdo a ellos, las células traqueales de rata responden a la estimulación con LPS produciendo marcadores pro-inflamatorios, a la vez que

líneas de epitelio traqueal humano responden a la estimulación con flagelina de *P. aeruginosa* (S. B. Neff et al., 2006; Tseng et al., 2006).

Por su parte, la comparación de la respuesta encontrada a nivel traqueal con la respuesta pulmonar mostró la existencia de diferencias en la sensibilidad a los tres agonistas a lo largo del tracto respiratorio. Específicamente, mientras LPS, flagelina y Poly IC generan una respuesta transcripcional intensa a nivel pulmonar (Figura 1.1) la estimulación traqueal es significativamente menor ($p < 0,01$) (Figura 1.2). Hallazgos similares fueron observados a lo largo de las vías aéreas pulmonares encontrando menores niveles de inducción a nivel del bronquio respecto de los bronquiolos para las quimoquinas evaluadas (Figura 1.4 y 1.5).

Estos hallazgos parecen sugerir la existencia de mecanismos que permiten regular de manera diferencial la funcionalidad de los receptores TLR de acuerdo al grado de exposición microbiana a la que está sometida la región en que se expresan. Tal como hemos dicho, mientras las porciones superiores del tracto respiratorio están en relación estrecha con la flora comensal de las fauces y con los agentes microbianos que ingresan con el aire inspirado, la carga microbiana va disminuyendo a medida que avanzamos hacia el tracto respiratorio inferior gracias al accionar de distintas barreras constitutivas que contribuyen al mantenimiento de la esterilidad en las regiones en las que ocurre el intercambio gaseoso. Así, resulta razonable que existan mecanismos que permitan controlar el grado de activación TLR en aquellas regiones que están en permanente contacto con agentes microbianos, de manera de evitar la activación de procesos inflamatorios potencialmente deletéreos cuando estos no son necesarios. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con otras mucosas como por ejemplo en la mucosa gastrointestinal, en el caso de la mucosa respiratoria esta idea intuitiva tiene aún pocas evidencias formales, siendo los ensayos presentados en este trabajo uno de los pocos realizados *in vivo* que apoyan esta hipótesis.

Los resultados de nuestros ensayos indicarían que las diferencias de sensibilidad observadas no son inherentes a TLR-4, sino que parecen ser un mecanismo más abarcativo, que opera *in vivo* para regular la respuesta de

distintos TLRs puesto que diferencias similares de respuesta entre la traquea y el pulmón fueron encontradas también para la activación de TLR-3 y TLR-5.

Para continuar con la caracterización de la respuesta a los agonistas evaluamos la capacidad de activación de distintas regiones pulmonares. Estos estudios mostraron que tanto LPS, como flagelina y Poly IC fueron capaces de estimular las vías aéreas pulmonares, bronquios y bronquiolos, así también como las células del parénquima pulmonar. El análisis comparativo de las respuestas promovidas por cada agonista en cada región no mostró un único patrón de comportamiento que pueda ser trazado para todos los marcadores. Esto sugiere que no existirían diferencias claras en la sensibilidad de cada región a LPS, flagelina o Poly IC. Por otro lado, esto insinúa la existencia de diferencias en los perfiles de respuesta para cada agonista. Sin embargo, en este análisis no se han encontrado diferencias que sean estadísticamente significativas entre los tratamientos, en forma contraria a lo observado en el pulmón total (Figura 1.1). En este sentido, los tres agonistas parecen tener un comportamiento equivalente cuando se compara la respuesta de IL-6, CXCL1, CXCL2 y CXCL10 a nivel del parénquima pulmonar. Por el contrario, en las vías respiratorias, Poly IC presenta los niveles menores de inducción de IL-6, CXCL1 y CXCL2 mientras que es equivalente a LPS y flagelina en la producción de CXCL10 tal como se encontró en pulmón total (Figura 1.1). No se puede descartar una diferencia de cinética de respuesta frente a cada agonista por lo que estos estudios deberán ser profundizados para llegar a una caracterización más completa.

En estos ensayos pudimos observar que las células epiteliales de las vías aéreas pulmonares participan de la respuesta a los tres agonistas empleados. Estos resultados están en concordancia con lo observado en otros trabajos señalando la expresión de receptores TLR desde TLR-1 a 6 y TLR-9 en líneas celulares bronquiales (Mayer et al., 2007). Otros autores han mostrado la participación del epitelio en la respuesta pulmonar a flagelina y LPS. De acuerdo a ellos, la activación de NFκB a nivel epitelial y la consecuente inducción de eventos pro-inflamatorios es responsable de la injuria pulmonar causada tanto por la estimulación local como sistémica de LPS en modelos murinos (Cheng, Han, Chen, P, et al., 2007). Por su parte, el reclutamiento neutrofilico que se observa

en respuesta a la estimulación intranasal con flagelina parecería estar mediado la activación de TLR-5 en el epitelio de vías aéreas (Janot et al., 2009). Junto con estas evidencias, nuestros ensayos indican que las vías aéreas pulmonares son capaces de responder a la estimulación *in vivo* a agonistas de TLR-3, TLR-4 y TLR-5 participando activamente de la respuesta innata pulmonar.

Por su parte, la comparación de la respuesta a cada uno de los agonistas a nivel de las vías aéreas pareciera sugerir que las diferencias de sensibilidad a lo largo del tracto respiratorio inferior no sería exclusiva de la comparación vías aéreas centrales vs vías aéreas pulmonares. Dentro de las vías pulmonares también parecieran existir algunas diferencias. En comparación con los bronquiolos, los bronquios mostraron niveles menores de expresión de CXCL1 y CXCL10 aunque no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, este perfil no es mantenido por IL-6, cuya inducción a nivel bronquial y bronquiolar fue similar.

Los ensayos realizados estuvieron destinados a evaluar el potencial inmunoestimulador de los agonistas por lo que no hemos profundizado en los mecanismos moleculares que podrían dar explicación a las diferencias de sensibilidad observadas en distintas regiones. Si bien en otros epitelios mucosales, sobre todo el intestinal, han sido observadas distintas formas de regulación, menos se conoce acerca de aquellos que participan en las vías aéreas (Gribar, Richardson, Sodhi, & Hackam, 2008). Algunos trabajos han sugerido que uno de posibles mecanismos es determinado por una menor densidad de expresión de receptores en superficie. Esto ha sido descrito para TLR-2, cuya baja expresión en líneas epiteliales bronquiales marca la baja sensibilidad de estas células a la estimulación con bacterias gram positivas (Mayer et al., 2007). Este podría ser un mecanismo que explique las diferencias encontradas en este trabajo sugiriendo que la expresión de TLR-3, TLR-4 y TLR-5 probablemente sea menor en la traquea en comparación con otras regiones del tracto respiratorio.

Una forma alternativa descrita en la literatura parece estar dada por la regulación diferencial de la expresión de co-receptores de receptores TLR. Así, la variación en los niveles de expresión de CD36, el co-receptor de TLR2 parece

determinar la respuesta de tal receptor a distintos agonistas (Mayer et al., 2007). En nuestros ensayos esta forma de regulación podría explicar las diferencias encontradas en la respuesta a TLR-4 cuya señalización requiere la expresión de CD14 y MD2 (Kawai & Akira, 2010). Sin embargo, otro mecanismo debe estar operando a nivel de TLR-3 y TLR-5 puesto que para estos receptores aún no se ha descrito la existencia de co-receptores.

En forma adicional, los estudios de la respuesta a la administración intranasal de agonistas TLR también evidenciaron la existencia de cierta regionalización en la expresión de los marcadores evaluados. Este fue el caso de CXCL2 cuya expresión a lo largo de las vías aéreas presenta diferencias independientemente del agonista TLR que sea administrado (Figura 1.5). En este sentido observamos que ninguno de los tratamientos provocó incremento significativos de esta quimioquina ni en traquea ni en bronquio. Por el contrario la producción de CXCL2 en respuesta a detección de agonistas TLR parece incrementarse a medida que se avanza hacia los sacos alveolares: su expresión pudo detectarse tanto en bronquiolos como en parénquima pulmonar. El significado biológico de estas diferencias así como también las diferencias entre las dos quimioquinas reclutadoras de neutrófilos (CXCL1 y CXCL2) se desconoce.

Nuestros estudios también señalaron que no sólo las células epiteliales participan de la respuesta pulmonar a los agonistas TLR empleados. Tanto el parénquima como las células presentes en el espacio bronquioalveolar, entre ellas los MA, fueron activadas por la estimulación con LPS, flagelina y Poly IC (Figuras 1.5 y 1.7). Estas células forman la primera línea de defensa del compartimento alveolar y son actores claves en los eventos de inducción de la respuesta innata de la mucosa respiratoria (Gordon & Read, 2002).

En este trabajo, mediante ensayos de estimulación *in vitro* de las células obtenidas por BAL de animales *naive* comprobamos que las células alveolares son capaces de responder al LPS, flagelina y Poly IC (Figura 1.7). Estos resultados se corresponden con los resultados encontrados por otros autores indicando que los MA se activan en respuesta a los mencionados agonistas (Chaung, Chen, Hsieh, & Chung, 2010; Raoust et al., 2009). Sin embargo, a pesar de estas evidencias y de que el análisis por citometría de flujo indicó que los MA

fueron la población mayoritaria, en nuestros estudios no puede descartarse la contribución de alguna otra población celular a los perfiles de los marcadores evaluados. Es posible que las células epiteliales sean desprendidas durante el proceso de obtención de BAL y tanto los neumocitos como otras células epiteliales expresan receptores TLR (Armstrong et al., 2004). Por su parte, en los ensayos de estimulación *in vivo* de las células presentes en el espacio bronquioalveolar también pudo encontrarse una activación transcripcional en respuesta a los tres agonistas evaluados (Figura 1.8). Esta respuesta podría tener la contribución de distintas poblaciones celulares como lo indica la presencia de neutrófilos (Figura 1.10). Estos hallazgos indican que no es posible comparar en forma directa los resultados obtenidos de estimulación *ex vivo* de las células del espacio bronquioalveolar provenientes de animales *naïve* (Figura 1.7) con los obtenidos por estimulación *in vivo* de estas células (Figura 1.8) puesto que en el formato de ensayo realizados los perfiles celulares hallados son distintos. Además, la existencia de reclutamiento leucocitario, incluso a las 2h post-estimulación, refleja además la expresión a nivel de proteína de mediadores solubles, entre los cuales probablemente se encuentren los cuantificados en los distintos ensayos realizados en este trabajo.

En términos generales los resultados encontrados indican que distintas regiones y actores celulares del tracto respiratorio inferior intervienen en la detección de los agonistas TLR empleados. Es probable que cada una de ellas participe de manera activa en la interacción patógeno-huésped, la inducción de la respuesta innata y la organización de la defensa mucosal.

Por otra parte, el análisis global comparativo de la respuesta encontrada para cada tratamiento señala que, aunque no se encontraron diferencias claves en la capacidad inmunoestimuladora de los tres agonistas, parecen existir variaciones en los perfiles de respuesta. Esto podría estar de acuerdo con el empleo de vías de señalización por los distintos receptores que sólo están parcialmente solapadas. Así, a nivel pulmonar el tratamiento con flagelina constituyó el estímulo más potente para la producción de IL-6, CXCL1 y CXCL2 mientras que LPS y Poly IC presentaron un comportamiento equivalente entre ellos (Figura 1.1). La estimulación de células en BAL de animales *naïve*,

principalmente MA, también mostró diferencias significativas entre los tratamientos, como así también la estimulación *in vivo* de las células presentes en espacio bronquioalveolar en las que Poly IC parece ser el estímulo más débil.

El análisis del reclutamiento leucocitario mostró que todos los agonistas son capaces de reclutar neutrófilos desde tiempos muy tempranos (2h post-estimulación). Esta propiedad se mantiene durante las primeras 24h post-estimulación momento en el cual los neutrófilos se encontraron presentes tanto en parénquima pulmonar como en el espacio alveolar. La comparación entre los agonistas sugiere que LPS y flagelina presentan capacidades equivalentes de promover la quimiotaxis neutrofílica, aunque a tiempos tempranos pudiera existir alguna diferencia. Poly IC también indujo el reclutamiento neutrofílico aunque la cinética del proceso pareciera ser diferente respecto de lo observado para flagelina y LPS. Esto está en concordancia con las cinéticas y perfiles de expresión de quimioattractantes de neutrófilos inducidos por cada agonista y discutidos previamente. Así, si bien a las 24h post-tratamiento la proporción de neutrófilos en el espacio bronquioalveolar es equivalente para los tres agonistas los niveles observados a las 2h son menores para Poly IC respecto de LPS y flagelina (Figuras 1.10 y 1.11).

En los últimos años se ha descrito que tanto flagelina como Poly IC no sólo funcionan como agonistas de receptores TLR sino también de otros receptores innatos. En el caso de flagelina se ha encontrado el receptor Ipaf, perteneciente a la familia de los NLRs mientras que para Poly IC existen los receptores RIG-1 y MDA-5, de la familia de los RIGs (H. Kato et al., 2006; Miao, Andersen-Nissen, Warren, & Aderem, 2007). Sin embargo, estos tres receptores, a diferencia de los receptores TLR, están localizados a nivel citoplasmático. En nuestros ensayos, la forma en que se administraron los agonistas, en la cual no se utilizaron componentes liposolubles que permitieran la accesibilidad de los mismos al citoplasma, permite suponer que la respuesta observada en cada uno de los casos es debida a la activación TLR dada la mayor exposición de estos receptores a los estímulos empleados.

En resumen, en este capítulo comprobamos que tanto de LPS como flagelina y Poly IC promueven una buena activación de la respuesta innata en la

mucosa respiratoria al ser administrados por vía intranasal. Esta condición hace posible su utilización como agentes adyuvantes en el marco de la infección por *B. pertussis* lo que será evaluado en los capítulos siguientes de esta tesis. En forma adicional encontramos la existencia de algunas diferencias entre las respuestas de TLR-3, TLR-4 y TLR-5. Esta información será empleada a lo largo de los capítulos siguientes a fin de buscar una correlación entre la eficacia de distintas estrategias de inmuno-intervención basadas en la administración de LPS, flagelina y Poly IC en el marco de la infección originada por *B. pertussis*.



Capítulo 2

Estudio de los eventos tempranos de la infección por *Bordetella pertussis*: relevancia de TLR-4 en la interacción huésped-patógeno

INTRODUCCION

En el presente capítulo nos vamos a focalizar en la interacción temprana patógeno-huésped que tiene lugar en la mucosa respiratoria en el marco de la infección por *B. pertussis*.

Como hemos mencionado en la introducción, a diferencia de lo que ocurre para otros patógenos respiratorios, en el caso de *B. pertussis* el conocimiento sobre la relación entre el reconocimiento patogénico y la inducción de la respuesta inmune y la defensa del huésped es limitado. Algunos trabajos han indicado que el huésped es capaz de reconocer algunos factores de virulencia bacterianos como la adenilato ciclasa o la toxina pertussis a través de receptores de reconocimiento de patógenos (Dunne et al., 2010; Magalhaes et al., 2005; Nasso et al., 2009). Sin embargo, la literatura indica que TLR-4 es el receptor con mayor impacto en la determinación del curso de la infección (H. Banus et al., 2006).

El análisis comparativo de la infección en animales TLR-4 competentes (C3H/HeN) y TLR-4 deficientes (C3H/HeJ) muestra que estos últimos son más susceptibles a la infección, presentando deficiencias en el control de la carga bacteriana y mayor daño histopatológico a nivel pulmonar (Higgins et al., 2003). Sin embargo, la información aportada por éste y otros trabajos (H. Banus et al., 2006) centran la mayor parte de su análisis en tiempos tardíos post-infección (3, 7, 14 y 21 días). En dichas condiciones las diferencias encontradas entre ambas cepas murinas son consecuencia de una sumatoria de eventos que, desde el inicio de la infección, están diferencialmente condicionados por la inducción a través de distintas vías de reconocimiento patogénico. A su vez esta activación diferencial determina la aparición de cinéticas de colonización distintas, dificultando la comparación de las respuestas establecidas en ambas cepas murinas y la determinación de los mecanismos mediante los cuales la

funcionalidad de TLR-4 condiciona la respuesta establecida. Así, aunque estos trabajos han señalado la importancia de TLR-4 en la defensa del huésped frente a *B. pertussis*, no han caracterizado la manera en que dicho receptor participa en los primeros estadios de la infección y la forma en que su activación condiciona el direccionamiento de la respuesta adaptativa apropiada frente a este patógeno.

A fin de evaluar la potencialidad del empleo de agonistas de TLR-4 como adyuvantes mucosales para inmunointervención frente a por *B. pertussis*, resulta de interés conocer cuál es la contribución de dicho receptor en la inducción de la respuesta inmune del huésped. Para la formulación de estrategias de inmunización con antígenos no replicativos que mimeticen la infección natural resulta relevante el estudio de los tiempos tempranos de la infección.

El objetivo de este capítulo es analizar cuál es la participación de TLR-4 en el reconocimiento patogénico y su contribución en el establecimiento de la respuesta innata inicial durante la infección por *B. pertussis*. Con este fin estudiaremos el impacto de la deficiencia en la señalización a través de TLR4 sobre la generación de mecanismos de defensa durante las primeras horas de la infección. De igual modo, nos proponemos evaluar aquellos mecanismos TLR-4 dependientes que en nuestro contexto experimental permiten el control de la infección en las instancias iniciales de la misma, en donde la respuesta adaptativa aún no se ha desarrollado.

RESULTADOS

Los estudios que se presentan en este capítulo fueron realizados empleando el modelo murino de infección intranasal. Como hemos indicado previamente, dicho modelo es habitualmente utilizado para la caracterización de los mecanismos fisiopatológicos y de respuesta inmunológica en el marco de la infección/inmunización frente a *B. pertussis*. Con el fin de evaluar el rol de TLR-4, los ensayos fueron realizados en forma comparativa en dos cepas murinas: los animales C3H/HeJ, deficientes en la señalización vía TLR-4 y la cepa control TLR-4 competente C3H/HeN, con la cual comparte la base genética.

Por su parte, la cepa de bacteriana escogida fue la cepa de referencia Tohama 8132. Esta cepa es empleada en las vacunas y la mayor parte del conocimiento existente sobre *B. pertussis* proviene de estudios realizados sobre dicha cepa. Asimismo, la cepa de referencia Tohama 8132 es la única de la que se dispone en la actualidad el secuenciamiento completo del genoma.

Para caracterizar la respuesta innata frente a *B. pertussis* se decidió evaluar los cambios en la respuesta transcripcional a nivel pulmonar inducidos por la infección. De acuerdo a ello se realizaron estudios de dosis respuesta para escoger la dosis infectiva apropiada, analizando los niveles de expresión génica de distintos marcadores de la inmunidad innata (Tnf- α , IL-1 β , IL6, CXCL2 y CCL20) mediante ensayos de PCR cuantitativa (qPCR). De acuerdo a estos resultados se decidió emplear una dosis infectiva de 10^8 ufc, correspondiente a una dosis subletal en todos los ensayos que vamos a presentar en este capítulo.

Rol de TLR-4 en el control de la carga bacteriana durante la infección por *B. pertussis*

Con el objetivo de evaluar el rol de TLR-4 en la generación de la respuesta anti-pertussis se comenzó por el análisis comparativo de la cinética de colonización bacteriana en ratones C3H/HeN y C3H/HeJ. Para ello, los animales fueron desafiados por inoculación intranasal con 10^8 ufc de la cepa indicada de *B. pertussis*. El seguimiento del curso de la infección fue realizado mediante recuento bacteriano (UFC) en homogenatos de pulmón a 0, 24, 48, 96 horas y 8 días post- infección (Figura 2.1).

Como puede observarse en la Figura 2.1, existen diferencias en el comportamiento frente a la infección entre ambas cepas murinas desde tiempos tempranos post-infección. Mientras que los animales C3H/HeN son capaces de disminuir la carga bacteriana a nivel pulmonar en el lapso de tiempo estudiado, los animales C3H/HeJ muestran niveles persistentes de colonización. Así desde las 24h post-infección se establecen cinéticas de colonización diferenciales entre ambas cepas, siendo el recuento bacteriano en el animal TLR-4 deficiente estadísticamente superior al del animal TLR-4 competente desde las 48h post-infección ($p < 0.01$). Estos hallazgos señalan la existencia de fenómenos TLR-4

dependientes que contribuyen a la defensa temprana del huésped frente a la infección por *Bordetella pertussis*

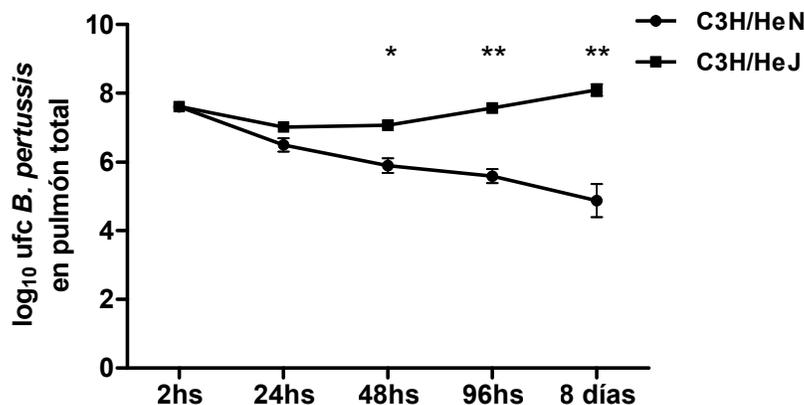


Figura 2.1: Influencia de TLR4 en el curso de la infección por *B. pertussis*.

Las cepas murinas C3H/HeN y C3H/HeJ fueron infectadas intranasalmente con 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) de *B. pertussis*. La colonización bacteriana fue evaluada por recuento en placa de las UFC presentes en los homogenato pulmonares a distintos tiempos post-infección. Por cada cepa y condición temporal fueron empleados 5 animales. Se representan los valores promedio y el desvío Standard del Log₁₀ de las UFC en pulmón total \pm SEM. Se muestran resultados de un experimento típico, el cual fue repetido tres veces obteniéndose en todos los casos resultados comparables.

* diferencias significativas entre cepas por el test de Bonferroni. *p < 0.01, **p < 0.001

Caracterización del perfil transcripcional pulmonar en cepas TLR-4 competentes y TLR-4 deficientes mediante ensayos de microarreglos de ADN

La invasión microbiana trae aparejados diversos cambios en la fisiología del huésped los cuales se encuentran finamente regulados y son orquestados en forma coordinada con el fin de limitar la patología y reestablecer la homeostasis. Uno de los niveles de control es la regulación de la expresión génica, un aspecto fundamental para los procesos inflamatorios y de respuesta inmunológica.

De acuerdo a ello, se decidió emplear la evaluación de la respuesta transcripcional con el fin de caracterizar los elementos de la respuesta innata que participan en el control temprano de la infección por *B. pertussis* y su dependencia de TLR-4. Con este objetivo fue empleada la técnica de microarreglos de cDNA. Esta metodología consiste en la hibridación del material biológico (cDNA) obtenido

de la muestra de elección con sondas específicas de oligonucleótidos para los productos génicos de interés las cuales son dispuestas en posiciones fijas sobre una plataforma sólida o chip. Mediante esta técnica es posible evaluar en forma simultánea la expresión de múltiples productos génicos en una misma muestra biológica, lo cual permite obtener una imagen global de la respuesta generada por el tratamiento de elección. Es por ello que los microarreglos de cDNA han sido ampliamente empleados para caracterizar la respuesta inmune frente a diversos agentes etiológicos de patologías tanto pulmonares como extra-pulmonares como así también para la caracterización de respuestas de poblaciones de células inmunes aisladas entre muchas otras aplicaciones (S. E. Evans, Tuvim, et al., 2010; Hochegger et al., 2007; C. C. Lewis et al., 2008; J. L. a Pennings, Kimman, & Janssen, 2008).

En nuestro diseño experimental, se evaluó la modulación del perfil transcripcional del genoma murino completo a nivel pulmonar generado por la interacción con *B. pertussis* a 2h y 24h post-infección. Con el fin de caracterizar la dependencia de TLR-4 de dicha respuesta, los estudios transcripcionales fueron realizados en forma comparativa en las cepas murinas C3H/HeN y C3H/HeJ empleando el modelo de infección intranasal. Para estos estudios 4 animales por cepa y condición temporal fueron infectados con 10^8 ufc de *B. pertussis* empleándose como grupos control animales de ambas cepas tratados con PBS estéril. La respuesta de cada animal fue evaluada en forma independiente empleándose un chip por cada uno de ellos.

Estos estudios fueron realizados en Francia en el Institut Pasteur de Lille en el marco de la colaboración existente con el grupo del Dr. Jean Claude Sirard, mientras que el análisis y procesamiento bioinformático de los datos obtenidos fue realizado por el grupo del Dr. Arndt Benecke en el Institut des Hautes Études Scientifiques. Este trabajo colaborativo fue realizado en el marco del proyecto SavinMucoPath-INCO financiado por la Comunidad Europea en el cual los distintos grupos de trabajo formaron parte.

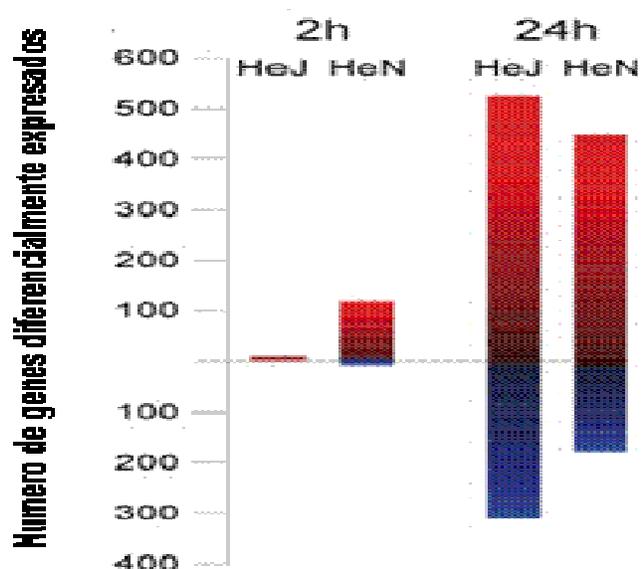
El análisis del perfil de expresión para las condiciones control no mostró diferencias significativas entre ambas cepas murinas. Esto indica que los perfiles hallados a distintos tiempos post-infección reflejan las modificaciones inducidas por la infección y no se deben a diferencias pre-establecidas entre los animales

TLR-4 competentes y TLR-4 deficientes. El resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de microarreglos de cDNA se muestra en la Figura 2.2.

Figura 2.2: Respuesta transcripcional pulmonar promovida por la infección por *B. pertussis*. Impacto de la deficiencia en TLR-4.

Se representa el número de genes diferencialmente expresados a distintos tiempos post-infección para las cepas murinas C3H/HeN y CeH/HeJ respecto del control PBS ($p < 0.05$). Para cada condición se emplearon cuatro animales y un ensayo de microarreglos de cDNA por animal.

Rojo: genes inducidos. Azul: genes reprimidos



La infección por *B. pertussis* desencadena en el huésped una respuesta transcripcional activa en ambas cepas murinas (Figura 2.2). Sin embargo, las respuestas encontradas presentan diferencias. Los animales C3H/HeN responden a la presencia de *B. pertussis* tempranamente. A las 2 horas post-infección, 142 genes son modulados diferencialmente respecto del control PBS. Esta respuesta está dominada por procesos de activación transcripcional con 136 genes inducidos y sólo 6 genes reprimidos. Esta preponderancia de la activación transcripcional esta en concordancia con el perfil de respuesta desencadenado por la activación de TLR-4 observado por otros autores (Burch et al., 2006).

Contrariamente a lo que ocurre en el animal C3H/HeN, aún después de 2h de infección los animales C3H/HeJ no parecen ser capaces de detectar la presencia del agente patogénico, a pesar de presentar cargas bacterianas mayores (Figura 2.1). Así lo indica la casi inexistente respuesta transcripcional: sólo 12 genes diferencialmente expresados frente a los 142 presentes en el animal TLR-4 competente. Estos resultados señalan a TLR-4 como un receptor fundamental para el reconocimiento de *B. pertussis*.

Como se aprecia en la Figura 2.2, la respuesta establecida frente a la infección se intensifica a las 24h, involucrando en el animal C3H/HeN 687 genes diferencialmente expresados en comparación con los 142 genes encontrados a

las 2h. Esta respuesta comprende, no sólo el incremento en el número de genes inducidos, que representan el 72% de los genes diferencialmente modulados, sino también el número de genes reprimidos. Adicionalmente, los genes inducidos presentan mayores niveles de variación respecto de los animales control en comparación a lo observado para los genes reprimidos. Así, mientras los primeros pueden alcanzar incrementos de hasta 200 veces, los genes reprimidos presentan variaciones máximas cercanas a las 6 veces, presentando el 80 % de los mismos variaciones menores a 3 veces respecto del control. Estos resultados indican que la respuesta transcripcional frente a *B. pertussis* a las 24h post-infección sigue mostrando un predominio de los fenómenos de expresión génica en forma análoga a lo observado a las 2h.

Por su parte, el animal C3H/HeJ es capaz de establecer una respuesta frente a *B. pertussis* a las 24h post-infección, a diferencia de lo observado a las 2h (Figura 2.2). La actividad transcripcional encontrada en el animal C3H/HeJ a las 24hs incluye 918 genes frente a los 687 encontrados en el animal TLR-4 competente. El perfil de la respuesta de la cepa TLR-4 deficiente también es inductor, con 556 genes inducidos y 362 reprimidos y con niveles de disminución de la expresión menores a los niveles de inducción. Sin embargo, una mayor proporción de genes modulados se corresponden con genes reprimidos: 39% de los genes encontrados a las 24h en comparación con el 28% en el caso del C3H/HeN.

Los resultados obtenidos indican que a pesar de la existencia de distintas vías de reconocimiento capaces de detectar la presencia de *B. pertussis* en el tracto respiratorio, TLR-4 es un receptor clave para el reconocimiento inicial de este patógeno y la inducción de la respuesta del huésped. Por su parte, la presencia de respuesta transcripcional en el animal C3H/HeJ a las 24h señala la existencia de vías de reconocimiento alternativas que permiten detectar la infección. Sin embargo, estas vías no parecen ser operativas en los estadios iniciales de la infección y sólo permiten la detección del patógeno a tiempos más tardíos, posteriores a las 2hs de originada la infección.

Como segunda instancia de análisis de las respuestas transcripcionales observadas, evaluamos en forma comparativa la respuesta encontrada a las 2h y 24h post-infección en los animales TLR-4 competentes. La Figura 2.3 presenta el

resultado del análisis en términos del número de genes específicos de cada condición, así como el número de genes compartidos.

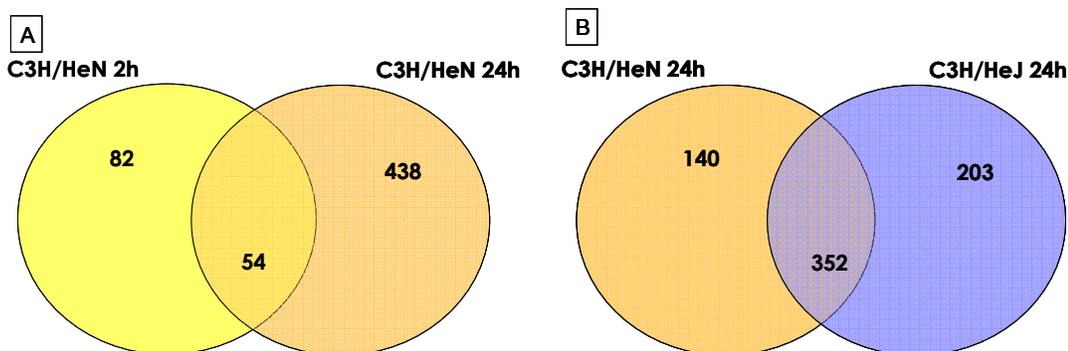


Figura 2.3: Elementos comunes en la respuesta transcripcional de las cepas C3H/HeN y C3H/HeJ frente a *B. pertussis*. Diagramas de Venn de los genes involucrados a distintos tiempos.

A. Respuesta frente a la infección en el animal TLR-4 competente a las 2h y 24h post-infección señalando el número de genes inducidos correspondientes a cada condición. **B.** comparación entre las respuestas establecidas a las 24h en animales TLR-4 competentes vs TLR-4 deficientes indicando el número de genes inducidos comunes y específicos de cada condición. En ambos casos los genes corresponden a aquellos que fueron diferencialmente expresados respecto de la condición control con $p < 0.05$ en los estudios de microarreglos de cDNA.

Como puede observarse, la respuesta transcripcional a las 2 horas está formada en gran parte por genes que responden a un programa de inducción transientes, puesto que no son encontrados en el perfil transcripcional del animal C3H/HeN correspondiente a las 24h post-infección. Aproximadamente el 58% de los genes involucrados en la respuesta transcripcional a las 2h presentan dicho comportamiento. Entre este grupo de genes se encuentran los genes asociados a distintos procesos. Por un lado, aquellos que codifican para proteínas que participan en procesos de transducción de señales, ya sean reguladores transcripcionales o actores intermedios de las vías de señalización proinflamatorias. Entre los primeros podemos mencionar a *Nfkb1a* y *Nfkb2*, que corresponden a la cadena α de I κ B y la subunidad p100 de NF κ B respectivamente, o *Batf* (Basic leucine zipper transcription factor ATF-like). Entre los segundos, *Map3k8* que forma parte de la señalización de receptores TLR/IL-1 y de TNF α y está asociado a procesos inflamatorios (George D, Salmeron A. 2009) por su función reguladora sobre NF κ B/I κ B y *Birc3*.

Varios genes asociados a procesos pro-inflamatorios también presentaron este comportamiento cinético. Entre ellos podemos mencionar aquellos que codifican para citoquinas claves de la respuesta inmune como TNF α , IL-6 e IL-1 α ; genes involucrados en la adhesión, migración y activación leucocitaria como Selectina y quimoquinas tales como CXCL2, CCL17, CCL20 y CCL22 y genes para calgranulina B, CD83 entre otros. Muchos de los genes pro-inflamatorios mencionados se encuentran su vez dentro del grupo de genes que presentaron mayores niveles de inducción a las 2h post-infección en el animal C3H/HeN con incrementos relativos de entre 4 y 32 veces respecto del control.

Entre los genes que presentaron mayores niveles de inducción también se encuentran genes de citoquinas y quimoquinas, que son modulados tempranamente y que continúan inducidos a las 24h post-infección (respuesta común, panel B Figura 2.3). Otros mediadores inflamatorios también fueron encontrados entre los genes que presentaron mayores niveles de inducción. Entre ellos uno de los genes con mayor incremento relativo en ambas condiciones temporales fue Saa3, un mediador inflamatorio. Esta molécula es una de las isoformas del amiloide sérico y su expresión a nivel pulmonar ha sido descrita en el marco de otras afecciones pulmonares agudas entre ellas las infecciones respiratorias bacterianas (Evans, Scott, et al., 2010; Schurr et al., 2005). Entre los genes comunes a las 2 y 24h post-infección también se encontraron genes de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, como Lipocalina 2, pentraxina 3 y Clec4d, y genes de enzimas que participan en la reorganización de la matriz extracelular, aunque en ambos casos los niveles de inducción fueron menores que para las quimoquinas y citoquinas.

El análisis de la respuesta a las 24hs post-infección en el animal C3H/HeN indica que la mayor parte de la misma está conformada por genes que no se encuentran modulados a las 2h post-infección, tal como se aprecia en el diagrama izquierdo de la Figura 2.3. Así, el 87% de la respuesta observada a las 24h corresponde a genes que son modulados entre las 2h y 24h post-infección. De este grupo, 438 genes fueron inducidos y 195 reprimidos. La comparación con la respuesta establecida por el animal C3H/HeJ (Figura 2.3) muestra que gran parte de la respuesta es compartida: de la totalidad de los genes modulados significativamente existen 462 genes comunes a ambas cepas de los cuales 352 fueron inducidos y 110 reprimidos. Esta respuesta común representa el 50% de la

respuesta observada en el animal C3H/HeJ indicando que si bien existen vías alternativas capaces de detectar la presencia de *B. pertussis* y dar origen a la respuesta inmune en el animal C3H/HeJ, ésta presenta diferencias cuantitativas (número de genes) y cualitativas (diferencias cinéticas, tal como se representa en la Figura 2.2) respecto de la establecida en presencia de TLR-4. Si estas vías de reconocimiento son operativas realmente en el marco de la infección por *B. pertussis* y actúan a tiempos posteriores a la activación de TLR-4 o si representan eventos de compensación ante la ausencia de funcionalidad de este TLR-4 no ha sido discriminado en el presente trabajo.

Reforzando la existencia de diferencias cinéticas en la respuesta frente a la infección por *B. pertussis* en animales TLR-4 competentes y TLR-4 deficientes, pudimos encontrar que dentro de los 352 genes comunes aproximadamente un 15% están representados por genes que cuya expresión es inducida tempranamente (a las 2h) en el animal C3H/HeN y mantenida a las 24h post-infección. En el mismo sentido, cerca del 14% del total de los genes exclusivos del perfil transcripcional del animal C3H/HeJ a las 24h post-infección son genes que presentan una activación temprana transiente en los animales C3H/HeN puesto que ya no están diferencialmente modulados a las 24h (genes exclusivos de las 2h). El resto de los genes propios de la respuesta del animal C3H/HeJ resultaron más difícil de caracterizar pues incluyen genes asociados a procesos diversos.

A fin de analizar globalmente las vías de señalización y procesos involucrados en la respuesta transcripcional evaluada, usamos la clasificación empleada en la base de datos de GeneOntology (www.geneontology.org), una herramienta de amplio uso dentro de la comunidad científica para realizar análisis bioinformáticos. Este sistema está formado por un consorcio de entidades que tiene por finalidad proveer información unificada, que describa la identidad de un gen con una nomenclatura consensuada y los atributos de su producto para distintas especies. Sobre cada gen puede obtenerse información respecto a la localización subcelular, la función molecular y el proceso biológico al cual puede ser asociado su producto de acuerdo a la especie seleccionada. Además, esta base de datos provee herramientas de cálculo que permiten determinar si un proceso biológico está significativamente modulado asignándole un valor de

probabilidad (p). Dicho valor es calculado en relación al número de genes que están modulados en un contexto experimental de interés, respecto al número de genes que serían seleccionados si el proceso de selección se realizase totalmente al azar. Cuanto menor es el valor de p asignado, menor es la probabilidad de que dicho proceso se encuentre activo por motivos aleatorios.

En la Figura 2.4 puede verse el resumen de los procesos biológicos modulados por la infección para cada cepa murina y condición temporal.

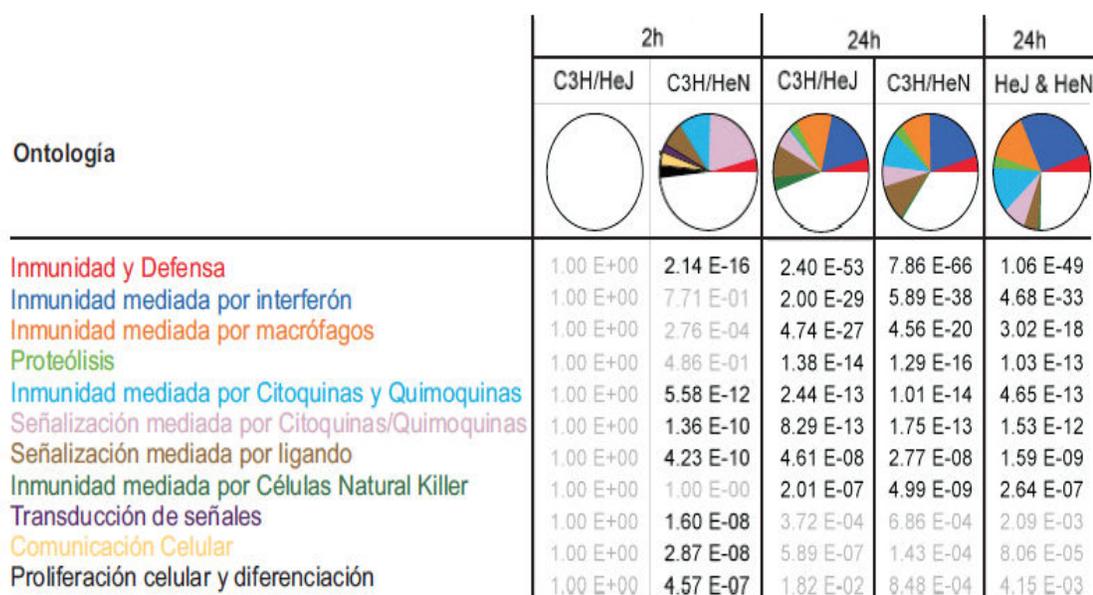


Figura 2.4: Procesos biológicos activados en las primeras 24h de la infección por *B. pertussis*.

La Figura indica los procesos modulados en la infección por *B. pertussis* de acuerdo a la clasificación de Gene Ontology. Cada categoría es representada en un color determinado. La proporción de genes pertenecientes a cada categoría se indica respetando el color asignado en las graficas de tortas correspondientes a cada columna. Los valores de p para cada categoría se calculan comparando el número de genes significativamente modulados por la infección y el número de genes que podrían encontrarse si la selección de genes se realizase al azar para cada proceso y condición experimental.

A las 2 horas post-infección, la respuesta frente a *B. pertussis* está caracterizada por la activación de eventos relacionados con la respuesta inmune. Entre ellos se encontraron la inmunidad y defensa (rojo), la señalización (rosa) y la inmunidad (turquesa) mediados por citoquinas y quimoquinas, procesos de interacción ligando-receptor (marrón) y la señalización subsiguiente, la

comunicación célula-célula y eventos de proliferación y diferenciación celular. Como puede apreciarse todos estos procesos relacionados con la defensa del huésped se encuentran significativamente modulados por la infección en los animales C3H/HeN desde tiempos tempranos tal como lo indican los valores de p asignados por el análisis a las 2h post-infección. Por el contrario, ninguno de estos procesos, es inducido tempranamente en los animales C3H/HeJ. Esto concuerda con la baja respuesta transcripcional encontrada a las 2h post-infección en esta cepa murina: sólo 12 genes modulados diferencialmente respecto del control. Este análisis vuelve a resaltar la relevancia de TLR-4 en la detección temprana de *B. pertussis* poniendo de manifiesto la importancia de este receptor en la inducción de la defensa del hospedador.

A las 24h la respuesta sigue siendo gobernada por procesos relacionados con la respuesta inmune, pero a diferencia de lo que ocurre a las 2h post-infección no sólo el animal C3H/HeN presenta una respuesta activa sino que el animal CeH/HeJ también es capaz de dar origen a procesos relacionados con la defensa del hospedador. Así, estos animales muestran a 24h la activación de procesos que fueron inducidos tempranamente en los C3H/HeN como la inmunidad mediada por quimoquinas y citoquinas y los eventos de señalización, los cuales continúan activos a las 24h, en concordancia con las diferencias cinéticas que pudieron apreciarse en el análisis comparativo de la respuesta entre ambas cepas a partir de la Figura 2.3.

La respuesta a las 24h también incluye la activación de procesos que son modulados entre las 2h y 24h post-infección (aquellos que no fueron encontrados a las 2h en el animal C3H/HeN). Así, en ambas cepas murinas se ponen de manifiesto procesos como la inmunidad mediada por actores moleculares como el interferón y por actores celulares que intervienen tanto en la inducción como en la puesta en marcha de los mecanismos efectores de la respuesta innata, tales como la inmunidad mediada por macrófagos y por células NK.

La Figura 2.4 también muestra un gráfico asociado a cada condición experimental que representa el número de genes vinculado a un proceso biológico particular dentro de la totalidad de genes que fueron modulados en cada condición. Esto permite analizar en forma comparativa cual es la contribución relativa de los distintos procesos biológicos a la respuesta total encontrada cada

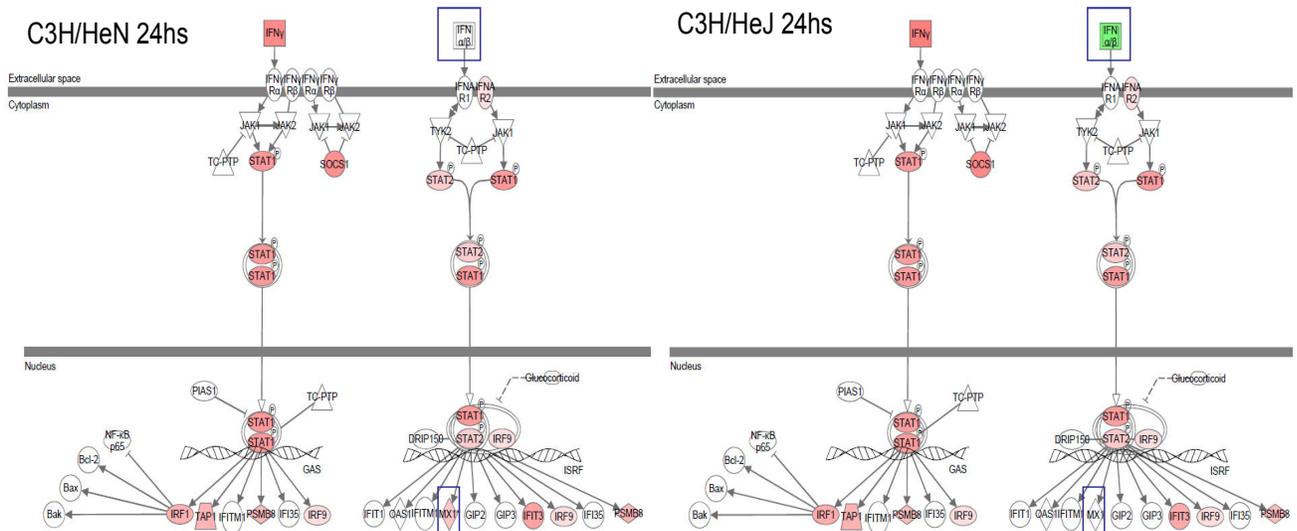
condición experimental (cepa murina y tiempo post-infección) lo cual facilita la visualización de similitudes y diferencias entre los comportamientos de ambas cepas. En base a este análisis puede observarse que, en la respuesta a las 2h post-infección, el proceso de señalización mediada por ligando es uno de los procesos con mayor contribución, representando cerca del 12% del total de los genes diferencialmente expresados en el animal C3H/HeN. Sin embargo, los procesos con mayor impacto son aquellos mediados por quimoquinas y citoquinas, involucrando aproximadamente el 35% de los genes totales encontrados a las 2 h post-infección (animales C3H/HeN). Los genes que codifican para tales mediadores fueron, a su vez, los que presentaron los mayores niveles de inducción entre los genes diferencialmente expresados a las 2h, con valores de incremento relativo entre 4 y 32 veces respecto de los animales no infectados. En el grupo de las citoquinas fueron fuertemente inducidas IL-1 β , IL-6 y TNF- α , moléculas que han sido involucradas en la defensa pulmonar frente a diversas infecciones respiratorias incluida la ocasionada por *B. pertussis* (Wolfe et al., 2007; X. Zhang, Goel, et al., 2011; X. Zhang, Hester, et al., 2011). Por su parte, varias quimoquinas fueron inducidas a las 2h post-infección en el animal C3H/HeN. Entre ellas se destacan CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL4 y CXCL10, quienes presentaron los mayores niveles de expresión con valores de entre 5 y 35 veces superiores al control.

Respecto a los procesos que se encontraron activos a las 24h post-infección, los gráficos de proporciones señalan que la inmunidad mediada por interferón es el más destacable en ambas cepas murinas. Como hemos señalado anteriormente, IFN γ es una citoquina con una participación activa en la inmunidad temprana frente a *B. pertussis* manteniendo la infección acotada al tracto respiratorio y evitando su diseminación (Mahon et al., 1997). En relación a ello, la Figura 2.4 indica que la inmunidad mediada por interferón es la categoría que involucra un mayor número de genes modulados en ambas cepas murinas a las 24h post-infección representando aproximadamente el 20% de la totalidad de genes modulados. Adicionalmente, el análisis de los 352 genes comunes que son inducidos a las 24h post-infección (Figura 2.3) muestra que muchos de los mismos están asociados a la inmunidad mediada por interferón, siendo éste el proceso mayormente representado entre aquellos comunes a animales TLR-4 competentes y TLR-4 deficientes (Figura 2.4 última columna).

Si bien los procesos biológicos que se encuentran activos a las 24 h post-infección en ausencia de señalización TLR-4 parecen ser equivalentes a los encontrados en los animales TLR-4 competentes, un análisis detallado indica que existen variaciones tanto en el número de genes asociados a un proceso dado como en sus niveles de expresión. Más aún, dentro de una categoría dada, no todos los genes que se encuentran diferencialmente expresados en un contexto lo están también en el otro. La Figura 2.5 representa un ejemplo de lo descripto.

En el caso de la vía de señalización del interferón, como se señaló anteriormente, las diferencias no parecen ser mayores en presencia y ausencia de funcionalidad TLR-4 y están basadas en la modulación factores asociados a la protección frente a infecciones virales como es los interferones tipo 1 y factor 1 de resistencia a mixovirus (MX1). Entre los genes relacionados a esta categoría, que fueron inducidos por ambas cepas murinas, se pudieron encontrar varios genes entre ellos los que codifican para GTPasa-1 inducida por interferón (ligp1), proteína 44 inducida por interferón (ifi44), GTPasa inducida por interferón gama (lgtp), gen 202B activado por interferón (ifit 202b), gen 204 activado por interferón (ifit204) entre otros y las quimoquinas CXCL9, CXCL10, CXCL11, que aumentan sus niveles de expresión a las 24h respecto de lo observado en el animal C3H/HeN a las 2h.

Vía de señalización de IFN γ observada a las 24hs post-infección



Vías del complemento

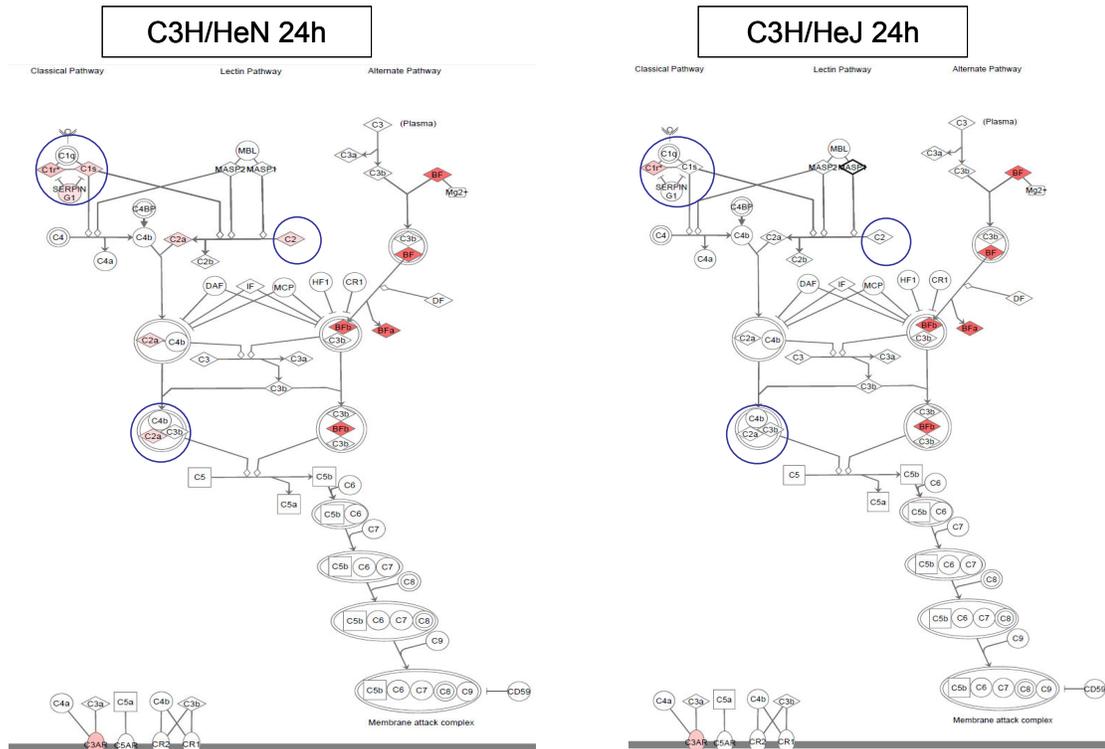


Figura 5a: Análisis comparativos de genes involucrados en las vías del complemento y del interferón a las 24 h post-infección en animales C3H/HeN y C3H/HeJ.

En color aparecen los genes diferencialmente modulados. En rojo aparecen los genes inducidos, en verde los reprimidos. La intensidad del color refleja la magnitud de la expresión para cada gen. Se indican en azul las diferencias entre cepas más importantes para cada proceso. Las Figuras fueron obtenidas mediante el software Ingenuity Pathways Analysis

Respuesta de fase aguda

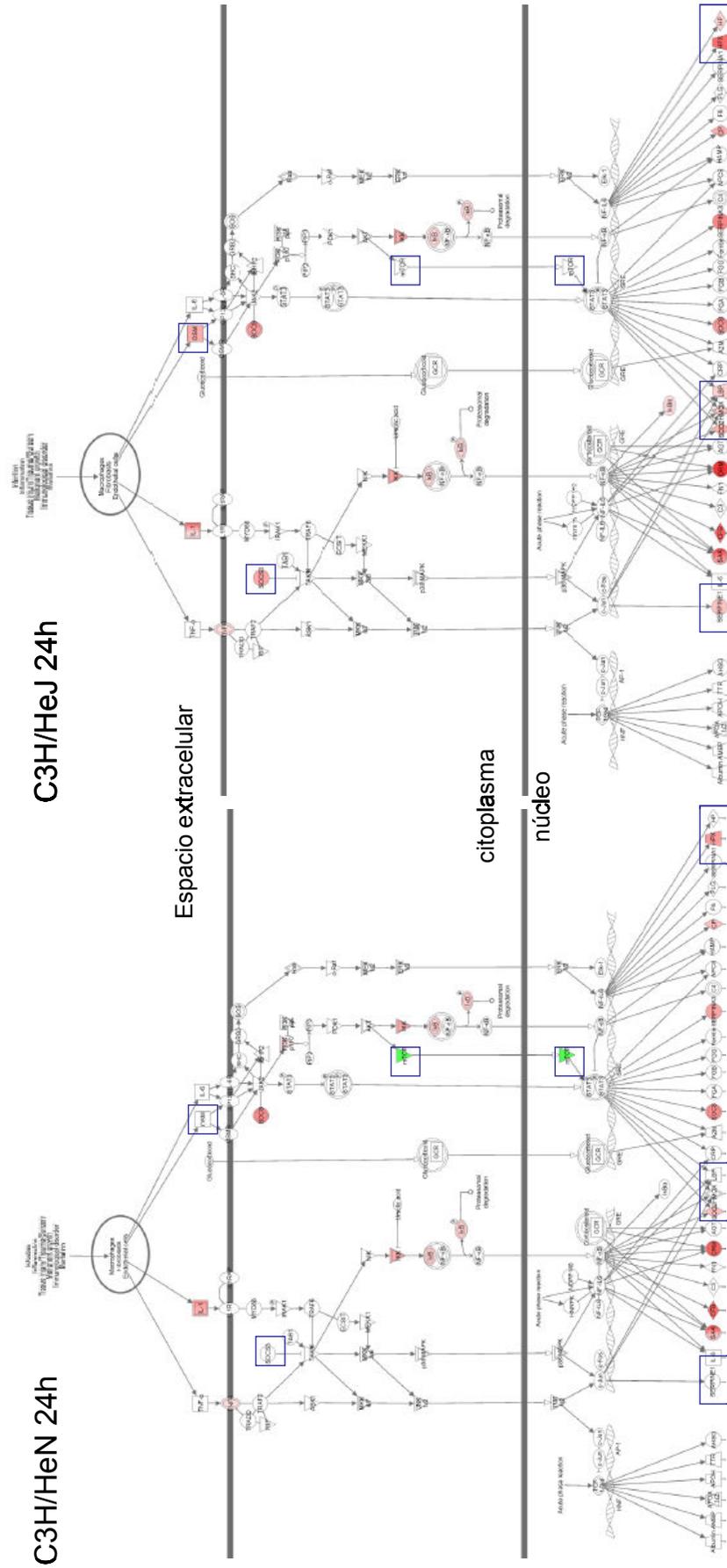


Figura 5b: Análisis comparativos de genes involucrados en la respuesta de fase aguda a las 24 h post-infección en animales C3H/HeN y C3H/HeJ.

En color aparecen los genes diferencialmente modulados. En rojo aparecen los genes inducidos, en verde los reprimidos. La intensidad del color refleja la magnitud de la expresión para cada gen. Se indican en azul las diferencias entre cepas más importantes para cada proceso. Las Figuras fueron obtenidas mediante el software Ingenuity Pathways Analysis

Respecto de la respuesta de fase aguda, la ausencia de señalización TLR-4 resulta en la expresión de un mayor número de genes diferencialmente modulados, varios de los cuales son moléculas efectoras de esta vía. También pueden apreciarse diferencias en los niveles de expresión, como lo muestra la mayor intensidad de coloración para el orosomucoide (*orm*) en el animal C3H/HeJ. Esta molécula es considerada un inmunomodulador natural con funciones anti-inflamatorias principalmente anti-neutrófilicas y anti-complemento (J. P. Williams et al., 1997). Otro ejemplo que muestra la existencia de variaciones en la respuesta observada a las 24h entre animales TLR-4 competentes y deficientes es la vía del complemento. Mientras la vía alternativa parece estar conservada, un menor número de actores moleculares están involucrados en la vía de activación clásica, la cual parece tener mayor relevancia en el control de la infección por *B. pertussis*. Sin embargo, estas diferencias son observadas dentro del primer día de infección y no es posible asegurar que estas se mantengan cuando la respuesta humoral se establece y esta vía cobra relevancia en los mecanismos de defensa anti-pertussis.

Los ejemplos elegidos muestran que aún ante procesos que parecen estar activos tanto en animales C3H/HeN como C3H/HeJ, la falta de señalización TLR-4 dependiente condiciona la cinética de establecimiento de la respuesta innata anti-pertussis así como también los aspectos cualitativos de la misma, los cuales varían de acuerdo al proceso biológico que se esté evaluando.

En resumen, el análisis de la respuesta transcripcional presentado hasta aquí indica que TLR-4 es fundamental para el reconocimiento temprano de *B. pertussis* y el establecimiento de una respuesta innata con una cinética apropiada y características que permitan controlar la infección. En el animal C3H/HeJ la ausencia de funcionalidad TLR-4 hace que la infección sólo sea detectada después de 2 h de la presencia de *B. pertussis* en las vías aéreas, a pesar de las dosis infectivas empleadas. Esto indica que otras vías de reconocimiento pueden activarse en presencia de *B. pertussis* aunque su participación sólo ocurre en forma más tardía, y conduce al establecimiento de una respuesta inmune con características que no permiten el control de la carga bacteriana pulmonar como acontece en el animal C3H/HeN (Figura 2.1).

Como hemos observado, una de las principales diferencias entre el comportamiento frente a la infección entre los animales C3H/HeN y C3H/HeJ radica en la cinética de reconocimiento patogénico y el establecimiento de la respuesta inmune. Con el fin de profundizar en la caracterización de la respuesta TLR-4 dependiente frente *B. pertussis* se decidió ahondar en el estudio comparativo de la cinética de establecimiento de la respuesta en ambas cepas murinas. Puesto que a las 2h la respuesta transcripcional del animal C3H/HeJ fue muy baja y a las 24h la respuesta observada en ambas cepas probablemente sea el resultado de las activación de distintas vías de reconocimiento (no sólo de TLR-4 en el caso del animal C3H/HeN), como así también de la señalización de sus moléculas efectoras, se decidió incorporar una condición temporal intermedia. El punto escogido fueron las 6h post-infección con el fin de discriminar cuál es la capacidad de ambas cepas de responder frente a la infección y tratar de determinar cuál es la contribución de TLR-4 analizando la existencia de diferencias/similitudes en las respuestas observadas.

Con estos objetivos, se procedió a la evaluación de los niveles de expresión pulmonares de un grupo de genes representativos de los ensayos de microarreglos de cDNA a las 2, 6 y 24h post-infección. Los genes escogidos son marcadores de respuesta innata clásicos: citoquinas, quimoquinas y moléculas relacionadas con la defensa del hospedador, que presentaban diferencias en la cinética de expresión entre ambas cepas.

Para estos ensayos fue empleada la técnica TLDA (TaqmanLowDensityArray) que consiste en el empleo de qPCR con sondas TaqMan previamente validadas en un formato cerrado de 348 posiciones. Este sistema permite el análisis de múltiples marcadores en diferentes condiciones biológicas. Como control se emplearon animales tratados con PBS (Figura 2.6).

El análisis de cluster de los perfiles de expresión génica pulmonar para ambas cepas y tiempos post-infección presentados en el panel A de la Figura 2.6 confirma las diferencias encontradas previamente en los ensayos de microarreglos de cDNA. La ausencia de señalización a través de TLR-4 hace que el animal C3H/HeJ presente severas limitaciones en la inducción temprana de una respuesta innata anti-pertussis. Así, aún después de transcurridas 2h del ingreso de *B. pertussis*, los ratones C3H/HeJ se comportan como los animales no

infectados, como indica la agrupación de estas dos condiciones en un mismo cluster. La respuesta es iniciada en forma tardía, pudiendo observarse que a las 6h post-infección en el animal TLR-4 deficiente resulta equivalente a la establecida a las 2h por el animal C3H/HeN.

Por su parte, la comparación de la respuesta detectada a distintos tiempos post-infección en los animales TLR-4 competentes muestra que la respuesta transcripcional es máxima a las 6h post-infección, en donde prácticamente todos los marcadores detectados presentan niveles de inducción superiores a las 2h y 24h como lo indica la mayor intensidad de coloración para los mismos en dicha condición (Figura 2.6a). Varios de los marcadores pro-inflamatorios analizados presentan valores máximos de incremento a las 6h post-infección, como es el caso de IL-1 β , las quimoquinas CXCL2 y CXCL10, lipocalina2 y calgranulina B o el factor estimulador de la proliferación granulocítica Csf3 entre otros. A las 24h post-infección la respuesta disminuye y se vuelve comparable entre ambas cepas murinas. Nuevamente, los resultados muestran la relevancia de TLR-4 en los estadios tempranos de la infección por *B. pertussis*.

La Figura 2.6b muestra la cinética de expresión obtenida por TLDA para algunos de los genes que fueron significativamente modulados en ambas cepas murinas. Genes con distintos perfiles de expresión fueron analizados: genes de activación temprana, cuyo máxima inducción es a las 2h como los ya mencionados Ptx3, Tnf- α o Cox-2, genes con inducción más tardía, con máximos a 6 horas como CXCL10 y oncostatina (Osm) y genes cuya máxima expresión es a las 24h post-infección como IFN γ . Independientemente del perfil de expresión presentado por cada marcador en todos los casos los animales TLR-4 deficientes mostraron niveles de expresión inferiores a los animales TLR-4 competentes.

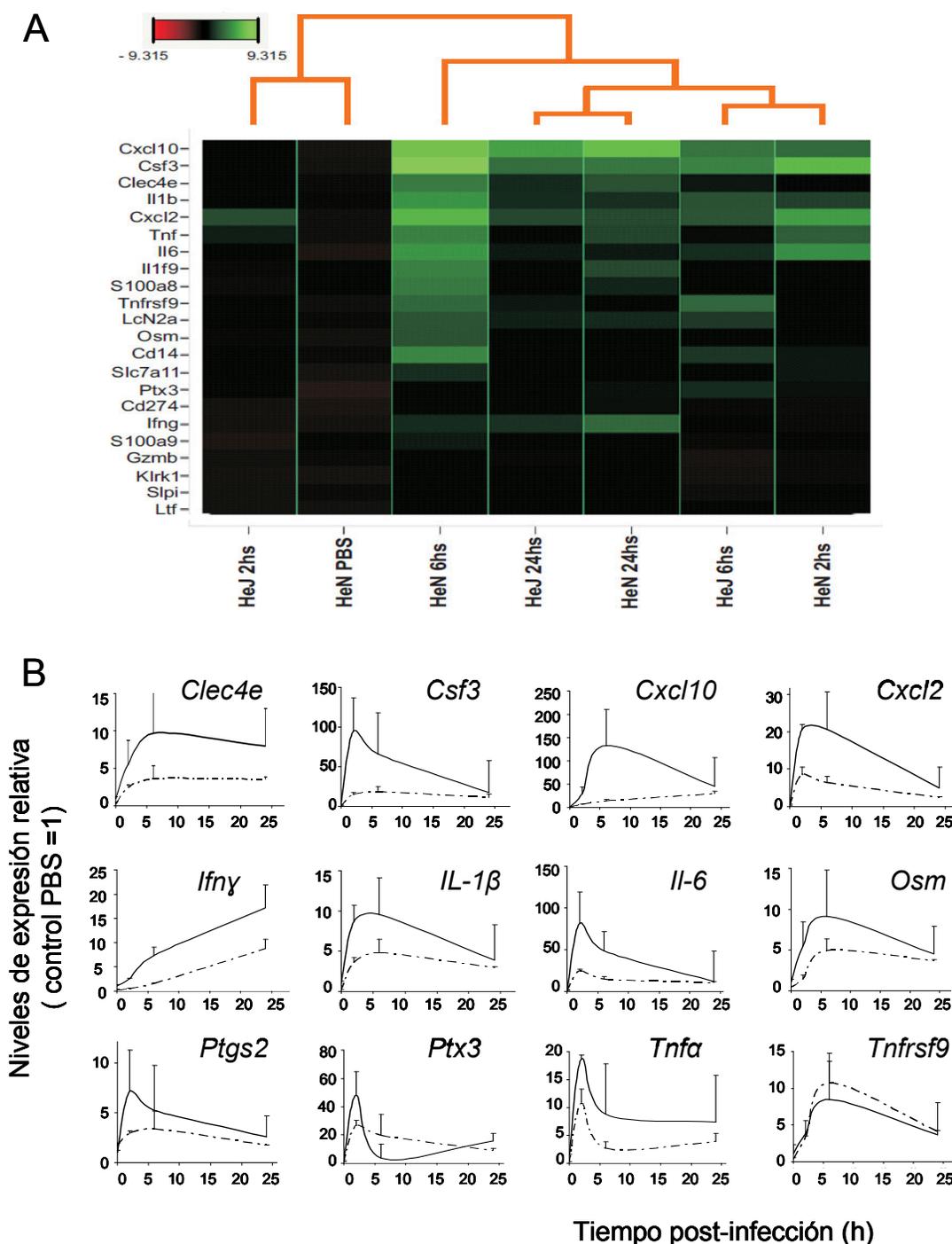


Figura 6: Cinética de expresión génica pulmonar en animales C3H/HeN y C3H/HeJ infectados por *B. pertussis* evaluada por TLDA.

Se evaluó la expresión génica de un set de marcadores de respuesta innata. Los datos obtenidos fueron normalizados empleando 4 genes housekeeping. Los incrementos relativos se calcularon con respecto a los valores promedio para cada gen encontrados en animales no infectados C3H/HeJ. Para cada condición se emplearon 3 animales. En el panel A se incluye el análisis de cluster de los perfiles de expresión génica para cada cepa murina a distintos tiempos post-infección. En verde aparecen los genes inducidos y en rojo los reprimidos. La expresión relativa está dada por la intensidad de color en base log₂.

En el panel B se muestra la cinética de expresión para distintos genes inducidos durante la infección: ratones C3H/HeN línea entera, ratones C3H/HeJ línea punteada. Se representan los valores promedios y la desviación estándar del incremento relativo. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

TLR-4 y respuesta neutrofílica en la infección por *B. pertussis*

TLR-4 y la expresión génica de quimioattractantes leucocitarios durante la infección por *B. pertussis*

Tal como está descrito en la literatura, la activación de los receptores TLR en la mucosa respiratoria es capaz de promover el reclutamiento de neutrófilos mediante la activación del factor de transcripción NFκB y la consecuente expresión de los genes de quimoquinas. Conforme con esta información, el análisis de los perfiles de expresión génica pulmonar en respuesta a la infección por *B. pertussis* señala que uno de los procesos biológicos mayormente afectados en los animales TLR-4 deficientes es la inmunidad mediada por quimoquinas (Figura 3). La Figura 7 muestra las diferencias detectadas en la comparación de los resultados obtenidos en los animales C3H/HeN frente a los animales C3H/HeJ a las 2h y 24h post-infección.

	C3H/HeN		C3H/HeJ		quimioattractor de
	2hs	24hs	2hs	24hs	
CXCL1	4,87	3,08	2,85	3,58	neutrófilos
CXCL2	5,1	ND	ND	ND	neutrófilos
CXCL5	3,88	3,49	ND	3,53	neutrófilos
CXCL9	ND	6,11	ND	5,5	células Th1 y NK
CXCL10	3,85	5,68	ND	5,47	células Th1 y NK
CXCL11	2,46	6,75	ND	6,5	células Th1 y NK
CXCL12	ND	1,46	ND	1,9	diversas
CXCL13	ND	3,13	ND	3,78	células B a órganos linfoides secundarios
CXCL16	ND	1,19	ND	1,23	células T y NKT
CCL2	2,46	2,94	ND	2,3	monocitos, LT activados y NK
CCL3	3,01	2,94	ND	3,16	monocitos, LT y CD
CCL4	3,92	3,54	ND	3,16	monocitos, LT y CD
CCL7	3,41	4,05	ND	4,19	monocitos, LT activados, NK y eosinófilos
CCL8	ND	2,57	ND	2,48	monocitos, LT activados, NK y eosinófilos
CCL9	ND	1,55	ND	2	diversas
CCL17	2,11	ND	ND	ND	células Th2
CCL19	ND	1,89	ND	1,9	LT y LB
CCL20	2,93	ND	ND	ND	LT y LB activados, iDC
CCL22	2,11	ND	ND	ND	células Th2

Figura 2.7: Comparación de los niveles de expresión de genes de quimoquinas durante las primeras horas de la infección por *B. pertussis* en animales C3H/HeN y C3H/HeJ.

En la tabla se presentan los niveles de expresión observados en los ensayos de microarreglos de cDNA para cada gen en cada cepa murina a distintos tiempos post-infección. Los valores indicados representan el logaritmo en base 2 del incremento relativo de ARN mensajero respecto del grupo control (PBS). En todos los casos estos genes fueron seleccionados como diferencialmente expresados con $p < 0.05$. ND: expresión diferencial no significativa.

El comportamiento de este cluster de genes presenta las características del perfil transcripcional global, con un déficit temprano de expresión en ausencia de funcionalidad TLR-4. A las 24h post-infección la expresión de estos genes se vuelve comparable en ambas cepas.

En forma similar a lo que ocurre frente a otras infecciones pulmonares de etiología bacteriana, el animal TLR-4 competente responde a la infección por *B. pertussis* con una fuerte inducción de quimioattractantes de esta población celular. Así, los genes que codifican para CXCL1, CXCL2 y CXCL5 son los que presentan los mayores niveles de inducción a las 2h post-infección. A las 24h estos actores moleculares siguen up-regulados pero con niveles menores a los observados a las 2h. CXCL9, CXCL10 y CXCL11 son las que presentan mayores niveles de inducción. Estas citoquinas son inducidas por IFN γ y son reclutadoras de linfocitos T y células NK. El animal C3H/HeJ por su parte, presenta un déficit en la producción temprana de los reclutadores de neutrófilos. Sin embargo estas deficiencias parecen desaparecer a las 24h post-infección a pesar de que CXCL2 no se encuentra entre las quimoquinas inducidas (Figura 2.7 línea 2). Estos hallazgos concuerdan con la existencia de sitios de unión a NF κ B en la región promotora de los genes que codifican para estas tres citoquinas (Pahl, 1999) y sugieren que la señalización por TLR-4 es necesaria para que la quimiotaxis de neutrófilos tenga lugar en forma adecuada (Mizgerd, Lupa, & Spieker, 2004).

El rol de TLR-4 en reclutamiento leucocitario a las vías aéreas durante la infección por *B. pertussis*.

Con el fin de confirmar la necesidad de la activación de TLR4 para la llegada de neutrófilos al foco infeccioso en el marco de la infección por *B. pertussis*, se realizó un estudio de la cinética de reclutamiento de poblaciones leucocitarias al espacio bronquioalveolar durante las primeras 24 horas de la infección. Para ello se comenzó por identificar las poblaciones leucocitarias que son obtenidas por BAL en animales infectados y no infectados, mediante citometría de flujo. Los marcadores celulares empleados fueron CD11b, CD11c, Gr1 y Ly6G, los cuales como hemos visto en el Capítulo 1 permiten discriminar distintas poblaciones leucocitarias (MA, neutrófilos y monocitos principalmente).

La identificación de las poblaciones encontradas en el BAL se muestra en la Figura 8.

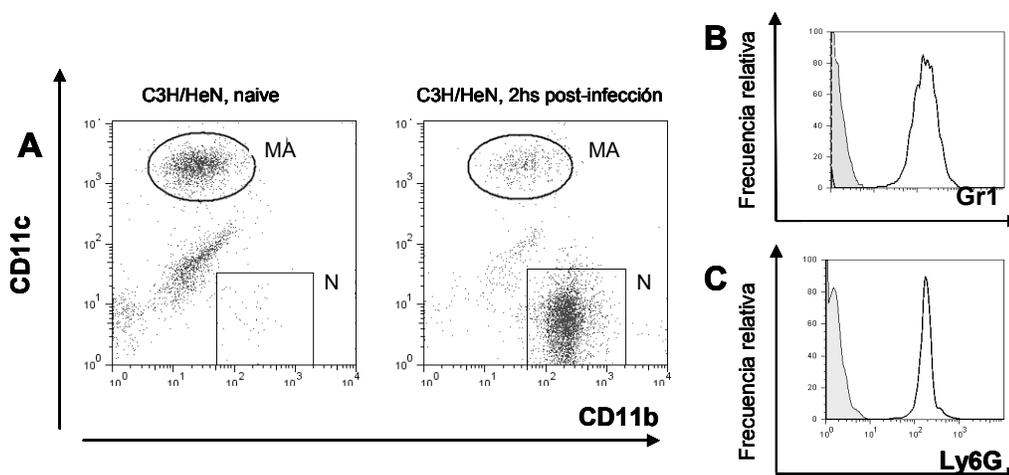


Figura 2.8: Identificación de poblaciones celulares presentes en el espacio alveolar durante la infección por *B. pertussis*

En el panel A se muestran las poblaciones identificadas mediante citometría de flujo en el espacio bronquioalveolar en animales C3H/HeN no infectados (naive) y en animales infectados a 2hs post-infección. Los marcadores de superficie empleados fueron CD11c y CD11b y los gráficos representan los dot-plot obtenidos. En cada uno se presentan las poblaciones identificadas: macrófagos alveolares (MA): CD11c⁺ CD11b⁻ y neutrófilos (N): CD11c⁻ CD11b⁺.

Los paneles B y C muestran los histogramas de los niveles de expresión de Gr1 y Ly6G respectivamente para las células CD11c⁻ CD11b⁺ (N) señaladas en el panel A. Los controles de isotipo para ambos marcadores se muestran en gris.

Como puede observarse en la Figura 2.8a en ausencia de infección la población mayoritaria encontrada en el espacio alveolar fueron los macrófagos alveolares (CD11c⁺ CD11b⁻, Gr1⁻ Ly6G⁻), en concordancia con lo que reporta la literatura. En presencia de *B. pertussis*, los neutrófilos (Figura 2.8 paneles a, b y c), parecen ser la única población leucocitaria que es reclutada al espacio bronquioalveolar a las 2h post-infección (Figura 2.8a). Este perfil es encontrado tanto en animales C3H/HeN como C3H/HeJ y se mantiene durante las primeras 24h de la infección por *B. pertussis*. Por su parte, no se apreciaron cambios en la población de MA durante la ventana temporal analizada (no mostrado).

Con este análisis inicial, se procedió al estudio comparativo de la cinética de reclutamiento neutrofílico en animales C3H/HeN y C3H/HeJ. Para ello los ratones fueron infectados intranasalmente con 10⁸ ufc de *B. pertussis* y las

poblaciones reclutadas fueron obtenidas a 2, 6 y 24h post-infección mediante BAL y analizadas por citometría de flujo.

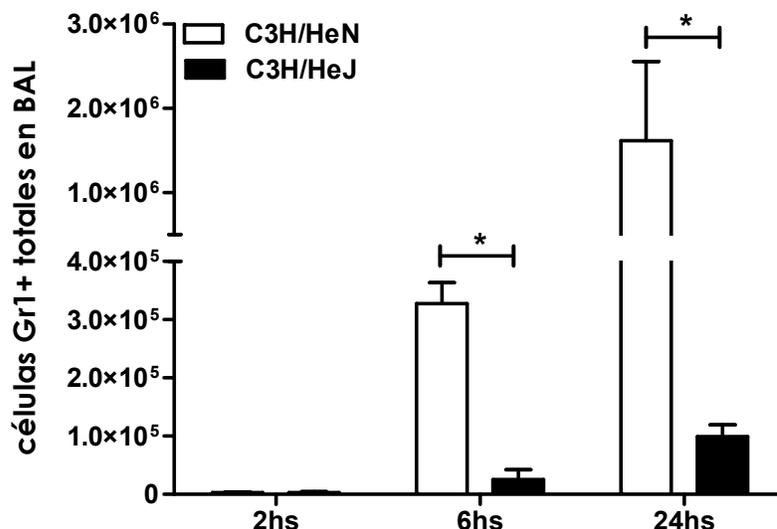


Figura 2.9: Reclutamiento leucocitario durante la infección por *B. pertussis* en animales C3H/HeN y C3H/HeJ.

Las células reclutadas al espacio bronquioalveolar en respuesta a la infección por *B. pertussis* fueron obtenidas por lavado bronquioalveolar (BAL) a distintos tiempos post-infección y analizadas por citometría de flujo. Se muestran resultados representativos de tres experimentos realizados con 3 animales por cada condición.

* diferencias significativas entre cepas $p < 0.05$, Test de Bonferroni.

Confirmando los resultados del análisis transcripcional, encontramos que los animales C3H/HeN promueven el reclutamiento de neutrófilos desde el inicio de la infección por *B. pertussis* siendo estadísticamente significativo a partir de las 6 h post-infección. Por el contrario, en los animales C3H/HeJ la presencia de dichas células en el espacio bronquioalveolar recién es detectada a las 6h aunque es significativamente menor a lo que ocurre en el animal TLR4 competente. Estas diferencias en el reclutamiento neutrofílico parecen mantenerse durante las primeras 24h de infección.

Las diferencias cinéticas y cuantitativas halladas entre las dos cepas murinas muestran que la señalización vía TLR-4 es clave en la determinación tanto de la cantidad de neutrófilos que llegan al espacio bronquioalveolar como de la velocidad en que lo hacen. Este fenómeno ocurre a pesar de que la activación

de otras vías de reconocimiento también es capaz de promover el reclutamiento en el animal C3H/HeJ.

Funcionalidad neutrofílica en la infección

Con el fin de evaluar la funcionalidad de la población neutrofílica que llega al espacio bronquioalveolar en respuesta a la infección y su relación con la señalización TLR4, decidimos analizar si existe una asociación física entre esta población celular y el agente patogénico. Para ello se realizaron ensayos de infección en animales C3H/HeN y C3H/HeJ con *B. pertussis* previamente marcada con CFSE y la presencia de células CFSE+ fue determinada mediante citometría de flujo a las 6 y 24h post-infección. Se realizaron ensayos de recuento en placa de la suspensión bacteriana con y sin marcado con CFSE a fin de verificar que el proceso de tinción no alterara la viabilidad bacteriana.

Si bien las células obtenidas por BAL fueron extensivamente lavadas con el fin de limitar la presencia de bacterias que estuvieran adheridas a la superficie celular no podemos excluir la contribución de este fenómeno en los resultados hallados. En este sentido, preferimos hablar de asociación física entre el patógeno y las células del huésped y no puramente de fenómenos de fagocitosis bacteriana.

La Figura 2.10a muestra, a modo de ejemplo, la definición de poblaciones leucocitarias realizada en estos ensayos y los niveles de CFSE encontrados en la población neutrofílica respecto del tratamiento control: células neutrofílicas obtenidas por lavado bronquioalveolar en animales infectados con la bacteria sin marcar. En la Figura 2.10b se muestran los resultados cuantitativos para ambas cepas murinas a distintos tiempos post-infección.

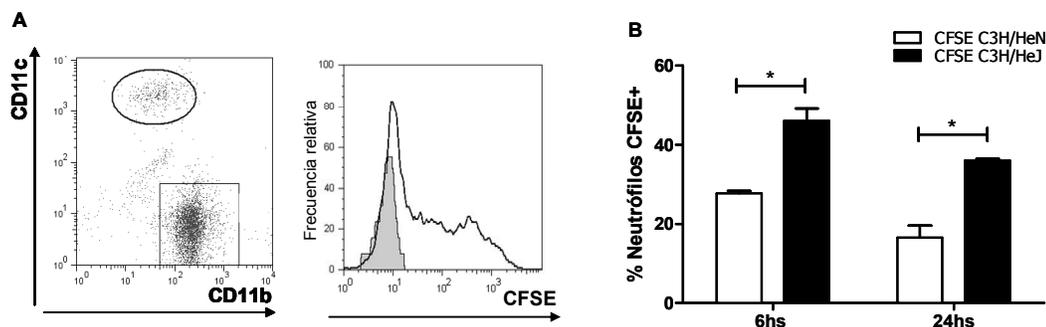


Figura 2.10: Detección de *B. pertussis* en las poblaciones leucocitarias presentes en el espacio bronquioalveolar: asociación *B. pertussis*- neutrófilos.

Animales C3H/HeN y C3H/HeJ fueron infectados con *B. pertussis* marcada con CFSE. A las 6 y 24h post-infección se obtuvieron por BAL las poblaciones leucocitarias y la asociación entre los neutrófilos y la bacteria fue evaluada por presencia de células CFSE+ mediante citometría de flujo.

A. Definición de las poblaciones celulares mediante el empleo de los marcadores de CD11c y CD11b. El panel derecho muestra los histogramas para CFSE de las células neutrófilicas: en blanco los resultados para animales infectados con bacteria marcada; en gris los resultados de animales infectados con bacteria sin marcar.

B. Porcentaje de neutrófilos CFSE+ detectados para cada cepa murina a 6 y 24h post-infección. Los resultados presentados son representativos de 2 experimentos realizados en forma independiente, empleando 3 animales por condición.

* diferencias significativas $p < 0.01$, Test de Bonferroni

Los resultados presentados en la Figura 2.10b muestran la existencia de asociación entre *B. pertussis* y los neutrófilos que arriban al espacio bronquioalveolar en respuesta a la infección. Esta interacción puede apreciarse desde tiempos tempranos (6h) manteniéndose durante las primeras 24h de la infección. Asimismo dicha interacción parece ser independiente de la señalización de TLR-4 puesto que tanto en animales C3H/HeN como C3H/HeJ fueron encontrados neutrófilos CFSE+. Por otras parte, tanto a 6h como a 24h post-infección los animales C3H/HeJ presentaron un porcentaje estadísticamente superior de neutrófilos CFSE+ respecto de los animales C3H/HeN. Es posible que esto se deba al mayor relación bacterias/ neutrófilos presentes en el espacio bronquioalveolar para el animal C3H/HeJ respecto del C3H/HeN.

De acuerdo a estos resultados, se decidió profundizar el estudio de la participación de los neutrófilos en la defensa temprana del huésped. Con este fin se comenzó por determinar los niveles de expresión del gen 16S de *B. pertussis* en distintas poblaciones leucocitarias halladas en el espacio bronquioalveolar a

las 6 y 24h post-infección para ambas cepas murinas. Para ello el BAL obtenido en cada una de las condiciones mencionadas fue sometido al tratamiento con perlas magnéticas conjugadas al anticuerpo anti-Gr1 a fines obtener una fracción celular enriquecida en neutrófilos. Mediante este procedimiento se obtuvieron distintas fracciones celulares: la fracción retenida por la acción de las perlas magnéticas que se denominó Gr1+ y la fracción no retenida, fracción Gr1 negativa. El lavado bronquioalveolar sin procesar fue empleado como control (BAL). Los perfiles celulares de las fracciones obtenidas para cada cepa murina y tiempo post-infección fueron determinados por citometría de flujo con el fin de evaluar la separación celular conseguida por el tratamiento (Figura 2.11).

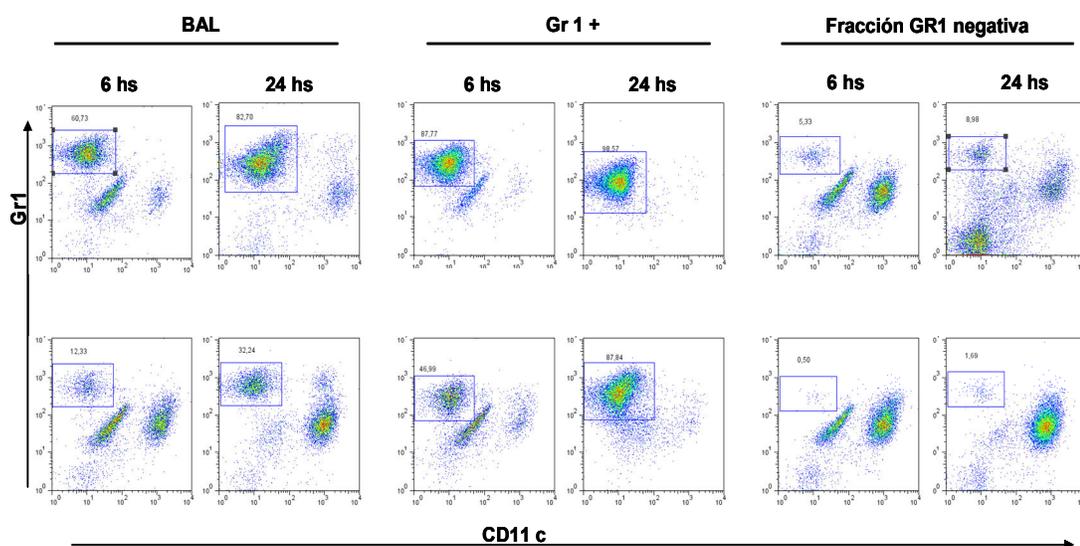


Figura 11: Separación inmuno-magnética de poblaciones leucocitarias presentes en BAL empleando perlas-anti Gr1: pureza de las fracciones obtenidas determinada por citometría de flujo.

Los perfiles de las fracciones celulares obtenidas de animales C3H/HeN y C3H/HeJ a las 6 y 24h post-infección fueron analizados por citometría de flujo en condiciones similares a las usadas en la Figura 9. Cada dot-plot indica la definición de la población neutrofílica de acuerdo a los niveles de expresión de los marcadores CD11c y Gr1 y el porcentaje que representa de las células totales. El panel superior muestra los perfiles para las fracciones de los animales C3H/HeN y el inferior los correspondientes a los animales C3H/HeJ. Los gráficos presentados son representativos de los perfiles obtenidos para 3 animales por cepa y condición temporal.

Como puede observarse, el tratamiento del lavado bronquioalveolar permite obtener un enriquecimiento significativo de la población Gr1 en la fracción que queda retenida por las perlas magnéticas (Figura 2.11 fracción Gr1+ vs BAL). La eficacia del tratamiento depende de la distribución de poblaciones encontradas

en la muestra original, consiguiéndose mejores niveles de enriquecimiento a partir de las muestras obtenidas a las 24h post-infección en ambas cepas murinas puesto que la población mayoritaria en estas muestras está representada por los neutrófilos. Así, entre el 88% y el 98% de las células presentes en la fracción Gr1+ a las 24h post-infección corresponden a células neutrofílicas en el caso de los animales C3H/HeJ y C3H/HeN respectivamente. A las 6h post-infección también pudo obtenerse un enriquecimiento significativo de la población neutrofílica en la fracción correspondiente, pero los niveles de pureza obtenidos fueron menores.

Los resultados indican cada fracción obtenida por el procedimiento de separación inmuno-magnética incluye más de una población leucocitaria siendo las células neutrofílicas la población predominante en la fracción Gr1+ para cada cepa murina y condición temporal.

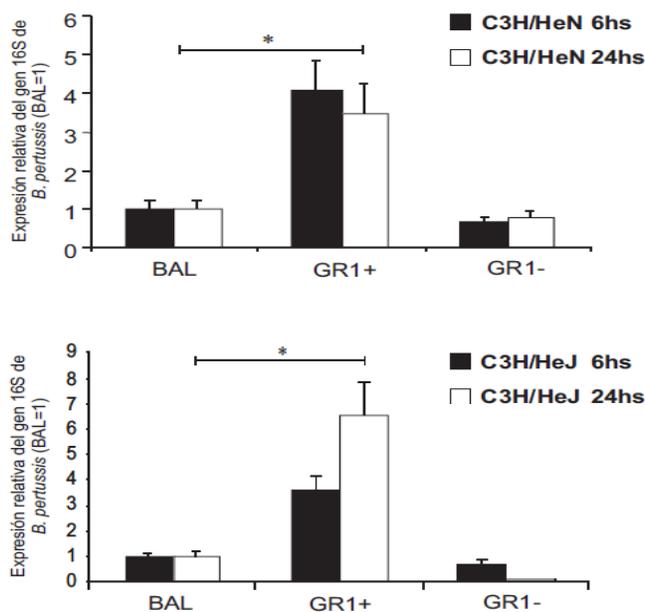
Sobre cada una de las fracciones celulares así obtenidas se determinaron los niveles de expresión del gen 16S de *B. pertussis* mediante PCR cuantitativa (Figura 2.12).

Figura 2.12: Determinación de la expresión génica de 16S de *B. pertussis* en poblaciones leucocitarias presentes el espacio bronquioalveolar durante las primeras 24h de la infección.

Los niveles de expresión del gen 16 S de *B. pertussis* fueron determinados por PCR cuantitativa en fracciones celulares obtenidas del lavado bronquioalveolar de animales C3H/HeN y C3H/HeJ a distintos tiempos post-infección. Los datos fueron normalizados con la expresión del gen de β -actina para en cada fracción. El incremento relativo del gen 16S fue calculado frente a los niveles de expresión encontrados en el lavado bronquioalveolar total (BAL) que dio origen a cada fracción.

Panel superior: resultados para los animales C3H/HeN. Panel inferior: resultados para los animales C3H/HeJ. En todos los casos se representan los niveles promedio de los incrementos relativos \pm SEM. En cada condición fueron empleados tres animales.

* diferencias significativas $p < 0.05$, Test de Bonferroni.



En concordancia con los resultados presentados en la Figura 2.10, la fracción Gr1+ mostró incrementos estadísticamente significativos en la expresión del gen 16S de *B. pertussis* respecto de los niveles encontrados en el lavado bronquioalveolar total (control). Esto fue observado a las 6 y 24h post-infección tanto en animales TLR-4 competentes como deficientes, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las cepas en ninguna de las condiciones temporales evaluadas. Por el contrario, en la fracción Gr1 negativa, que está formada mayoritariamente por macrófagos alveolares no se detectó la expresión significativa de este gen.

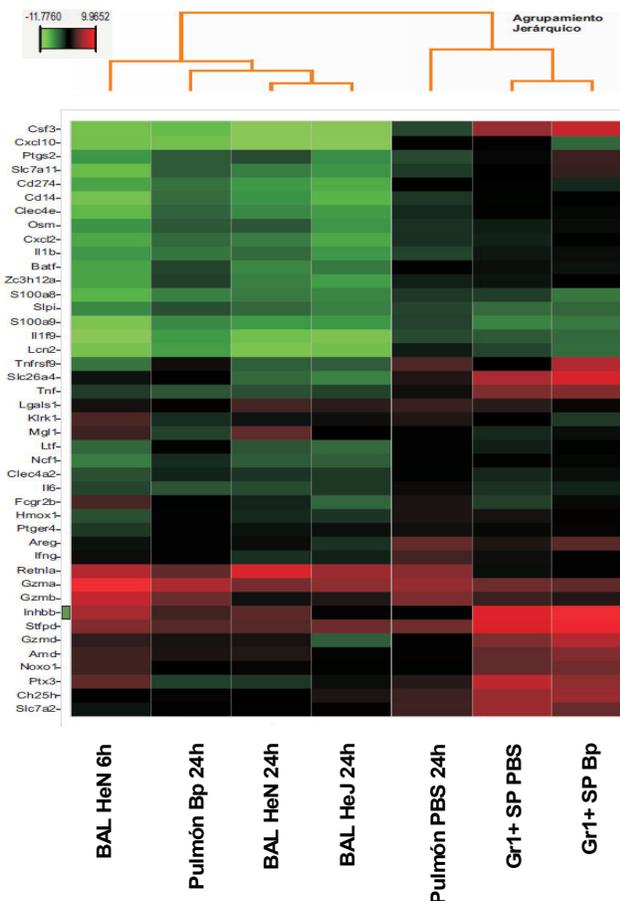
Nuevamente estos resultados confirman la existencia de asociación física entre los neutrófilos que son reclutadas al espacio bronquioalveolar y *B. pertussis*. Esto indica que este proceso no requiere de la funcionalidad de TLR-4 para ser activo.

A continuación, con el fin de caracterizar la funcionalidad de los neutrófilos en las primeras horas de la infección por *B. pertussis* y su dependencia de TLR-4 se analizaron los perfiles transcripcionales de diversos genes relacionados con la respuesta inmune en la fracción celular Gr1⁺ (Figura 2.13). Las células fueron obtenidas de manera análoga a lo descrito previamente a partir de distintas muestras: BAL, pulmón y sangre periférica de animales C3H/HeN y C3H/HeJ infectados y sin infectar (grupo control). El análisis transcripcional se realizó mediante la técnica de TLDA.

El análisis de cluster permite evidenciar distintos aspectos de la respuesta a la infección por *B. pertussis*. Por un lado, el huésped desencadena una respuesta confinada al aparato respiratorio. Así, las células de sangre periférica presentan un perfil transcripcional equivalente en presencia (Gr1+ SP Bp) y ausencia de infección (Gr1+ SP PBS), que a su vez, es análogo al de las células Gr1+ provenientes de pulmón de animales no infectados (Pulmón PBS). Además estas tres condiciones son agrupadas en un cluster independiente (cluster derecho Figura 2.13) de las muestras provenientes del árbol respiratorio de animales infectados (cluster izquierdo Figura 2.13) remarcando que el huésped establece una respuesta a la infección por *B. pertussis* fundamentalmente a nivel local.

Figura 2.13: Perfil transcripcional de la población Gr1+ en animales TRL-4 deficientes y TLR-4 competentes durante la infección por B. pertussis.

Los perfiles transcripcionales de la fracción Gr1+ obtenida del lavado bronquioalveolar (BAL), pulmón y de sangre periférica (Gr1 SP) de animales C3H/HeN (HeN) y C3H/HeJ (HeJ) fueron evaluados mediante TLDA. La expresión relativa se calculó empleando el pulmón total de un animal naive como referencia. La expresión relativa es mostrada en escala en base Log₂. En rojo, se indican los genes inducidos y en verde los reprimidos. La escala de expresión se muestra en la Figura.



En segundo término podemos decir que la respuesta a la infección involucra la activación transcripcional de las células Gr1+ que arriban al foco inflamatorio como consecuencia de la presencia patogénica. Asimismo, la activación celular es similar entre los distintos compartimentos, como indica la presencia en un mismo cluster del perfil determinado para las células del parénquima pulmonar y BAL de los animales infectados. Adicionalmente, varios de los genes que fueron inducidos en el marco de la infección a nivel pulmonar (Figura 2.5) también se encontraron inducidos en las células Gr1+ (Figura 2.13) indicando que esta población contribuye al perfil transcripcional pulmonar hallado a las 24h post-infección. Entre ellos podemos mencionar a lipocalina2, calgranulina B, oncostatina, Csf3 y las quimoquinas CXCL2 y CXCL10 entre otros.

Por último, las activación neutrofílica parece ser independiente de TLR-4 dadas las similitudes en el perfil transcripcional observado para células Gr1+ provenientes de animales C3H/HeN y C3H/HeJ (Figura 2.13 columnas 3 y 4).

Acorde con esto, la literatura indica que esta población leucocitaria puede ser activada por varios mecanismos además del reconocimiento patogénico directo.

Los resultados mostrados hasta aquí señalan que una de las características de la respuesta del huésped ante la infección por *B. pertussis* es el reclutamiento rápido, dentro de las primeras 24h post-infección, de neutrófilos al foco infeccioso (Figura 2.9). Este reclutamiento es dependiente de la señalización vía TLR-4, como indican las diferencias en la magnitud y cinética de reclutamiento encontradas entre animales C3H/HeN y C3H/HeJ. Una vez en el sitio de infección los neutrófilos activados son capaces de interactuar directamente con el agente patogénico tal como fue mostrado en las Figuras 2.10 y 2.12. Si bien para el evento de reclutamiento el reconocimiento de *B. pertussis* a través de TLR-4 resulta clave, la activación celular parece ocurrir por vías alternativas puesto que los neutrófilos de animales TLR-4 deficientes muestran un perfil de activación equivalente a los de animales TLR-4 competentes.

Rol de los neutrófilos en el control de la infección por *B. pertussis*

Por último, con el fin de evaluar la funcionalidad de los neutrófilos en el control de la carga bacteriana decidimos realizar ensayos de infección en animales C3H/HeN y C3H/HeJ en los que esta población fue depletada. La depleción fue realizada mediante la administración de un anticuerpo anti-Gr1 y la eficacia del tratamiento fue controlada mediante citometría de flujo.

Para estos estudios se realizaron en forma paralela ensayos de infección de animales depletados en la población Gr1 y de animales sin tratar como condición control. La evaluación de la colonización bacteriana en los pulmones de los ratones infectados se realizó a distintos tiempos post infección mediante recuento en placa de las unidades formadoras de colonias (Figura 2.13).

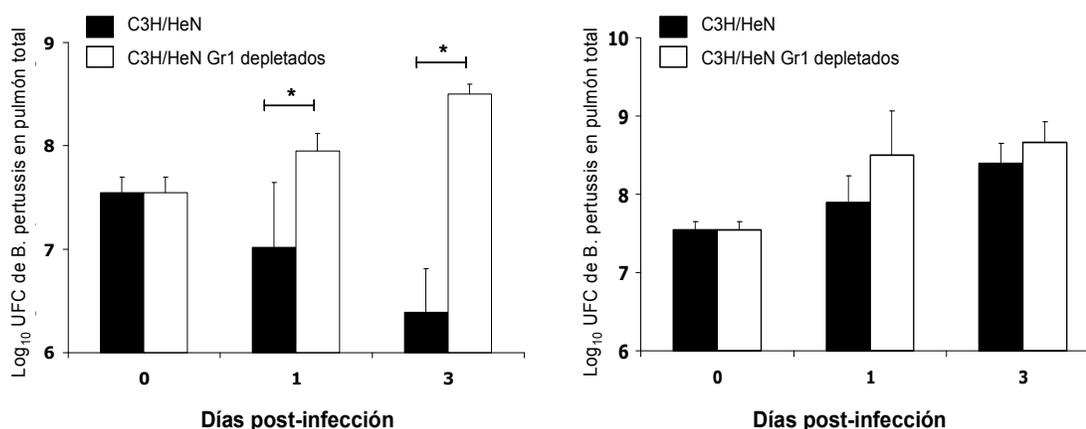


Figura 2.14: Efecto de la depleción de neutrófilos sobre el control de la infección por *B. pertussis* en animales C3H/HeN y C3H/HeJ.

Los resultados indican el valor promedio de UFC recuperadas en pulmón a distintos tiempos por infección. Se emplearon cinco animales por condición. Se muestran resultados representativos de dos ensayos independientes.

* diferencias significativas entre cepas $p < 0.05$, Test de Tukey

Como puede apreciarse en el panel izquierdo de la Figura 2.14, los animales C3H/HeN depletados en la población Gr1+ no son capaces de disminuir la carga bacteriana a nivel pulmonar a diferencia de lo que ocurre en los animales control. El efecto de la depleción se manifiesta tempranamente encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) desde las 24h post-infección, lo cual señala la relevancia de esta población leucocitaria en el control temprano de la infección. El efecto observado se magnifica dentro de los primeros 3 días de la infección existiendo a las 72h diferencias de aproximadamente dos órdenes de magnitud en la carga bacteriana pulmonar entre los animales depletados y los controles.

Interesantemente, en los animales C3H/HeJ no se observaron diferencias entre los animales depletados y los no depletados pese a haber detectado el reclutamiento de la población neutrofílica durante la infección (Figura 2.9). Este resultado podría adjudicarse a la cinética y magnitud del reclutamiento de la población Gr1 en esta cepa murina. Así, es posible suponer que si bien a las 24h los neutrófilos tienen un perfil de activación equivalente en presencia y ausencia de señalización por TLR4, la cantidad de células que arriban no son capaces de

establecer mecanismos bactericidas cuantitativamente significativos, por lo cual la depleción no tiene un efecto significativo en la colonización.

DISCUSION

En este capítulo nos focalizamos en la descripción de los resultados obtenidos en diversos estudios destinados a caracterizar la relevancia de la respuesta innata y en particular de la respuesta temprana mediada por TLR4, en la defensa del huésped contra *B. pertussis*. La bibliografía hasta ahora difundida señala a TLR-4 como uno de los principales receptores que participan en la defensa del huésped frente a esta infección. Sin embargo, el conocimiento sobre las características de la respuesta temprana desencadenada por TLR-4 y su contribución al control de la infección es muy escaso. Los estudios realizados se centran fundamentalmente a tiempos tardíos de la infección en donde los fenómenos que se observan resultan ser consecuencia de una sucesión de eventos de respuesta, en donde la impronta del estadio temprano no puede ser evaluada. Es por ello que en el presente trabajo centramos nuestros estudios en las primeras 24h de la infección por *B. pertussis*, con la intención de analizar cómo es la participación de TLR-4 en el establecimiento de la defensa del huésped. Este diseño permite discriminar cuál es la respuesta que depende en forma directa de dicho receptor y cuál es su participación en el control de la infección. Esta información resulta de interés para determinar si la selección de agonistas de TLR-4 puede ser una alternativa de utilidad a fin de diseñar formulaciones vacunales que permitan mimetizar el proceso infeccioso, lo cual en el caso de *B. pertussis* posiblemente mejore la eficiencia de las mismas.

El estudio de estos aspectos fue abordado en el presente trabajo utilizando el modelo de infección en ratones TLR4 competentes y TLR-4 deficientes y distintas herramientas de alto rendimiento para evaluar perfiles de respuesta. Este diseño experimental nos permitió determinar que, a pesar de la capacidad de la mucosa respiratoria de emplear diversas vías para detectar la presencia de agentes patogénicos, la señalización vía TLR-4 resulta absolutamente necesaria no sólo para la detección temprana de *B. pertussis* sino también para la inducción

de mecanismos eficientes que permitan controlar la infección. Así hemos observado que a las 2h post-infección la respuesta transcripcional encontrada es casi totalmente dependiente de TLR-4. La misma se encuentra dominada por procesos de activación transcripcional, en concordancia con los perfiles de respuestas desencadenadas por la activación de TLR-4 encontrada por otros autores (Burch et al., 2006). El perfil de respuesta temprana es fundamentalmente pro-inflamatorio y se encuentra gobernado por genes relacionados con procesos de respuesta inmune y defensa. Así, entre los genes con mayores niveles de inducción se encontraron aquellos que codifican para citoquinas claves de la inmunidad innata como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α y genes de quimoquinas reclutadoras de diversas poblaciones leucocitarias, entre ellas los neutrófilos (Figura 2.7). Como parte de esta respuesta también fueron inducidos otros marcadores asociados a inflamación como la isoforma 3 del amiloide sérico (Saa3), una proteína de fase aguda que participa en distintos mecanismos de defensa en la mucosa respiratoria (S. E. Evans, Scott, et al., 2010; Mullan et al., 2006; C. Shah, Hari-Dass, & Raynes, 2006), el gen 1 de respuesta inmune (Irg1), el co-receptor de TLR-4 (CD14), receptores de reconocimiento innato como lipocalina 2, pentraxina 3, TLR-2 y algunos receptores de lectinas tipo C, entre otros. Adicionalmente fueron inducidos genes de factores de regulación transcripcional y de moléculas que participan en las cascadas de transducción de señales desencadenadas por la activación de distintos receptores, tal como fue mencionado anteriormente.

La respuesta encontrada a las 2h posteriores a la infección por *B. pertussis* es comparable a la respuesta transcripcional establecida a nivel pulmonar como consecuencia de la exposición del árbol respiratorio al LPS (Jeyaseelan, Chu, Young, & Worthen, 2004). A 2h posteriores al tratamiento con LPS la respuesta detectada en este trabajo presenta también un perfil de activación transcripcional donde predomina la inducción de genes de quimoquinas, citoquinas, marcadores pro-inflamatorios y moléculas involucradas en los fenómenos de interacción ligando-receptor y la señalización asociada (Jeyaseelan et al., 2004). Así dicha similitud junto con las diferencias encontradas en la respuesta frente a la infección en los animales C3H/HeN y C3H/HeJ muestra que el reconocimiento inicial de *B. pertussis* está fuertemente condicionado por la capacidad de detectar el LPS a través de TLR-4.

El análisis de la respuesta a las 24h indica la existencia de vías de reconocimiento alternativo, puesto que el animal C3H/HeJ presenta una respuesta transcripcional activa. Sin embargo, dichas vías no participan del reconocimiento temprano de *B. pertussis*, como indica la mínima respuesta transcripcional observada a las 2h post-infección en esta cepa murina (Figura 2.2 y análisis de cluster en la Figura 2.6). Así, la incapacidad de detectar la presencia de *B. pertussis* a través de TLR-4 condiciona la cinética de inducción de la respuesta del huésped: sólo a las 6 horas post-infección el animal TLR-4 deficiente muestra una respuesta equiparable a la respuesta inicial (2h post-infección) observada en el animal TLR-4 competente, como indican los resultados de los estudios comparativos de la respuesta transcripcional a 2h, 6h y 24h post-infección en animales C3H/HeN y C3H/HeJ (Figura 2.6).

A las 24h post-infección las diferencias encontradas entre ambas cepas murinas se ven atenuadas encontrándose en cada caso un aumento significativo en el número de genes diferencialmente modulados con predominio de genes inducidos (Figura 2.2). Asimismo, el análisis de los procesos biológicos activos a las 24h indica que los mismos procesos son activados por la infección en ambas cepas murinas (Figura 2.4). Sin embargo, el análisis detallado de los genes involucrados en cada una de las respuestas indica que el 50% de la respuesta transcripcional del animal C3H/HeJ es compartida con la del animal C3H/HeN. Adicionalmente el análisis comparativo de los genes inducidos por ambas cepas (Figura 2.3) indica que aún a 24h post-infección puede percibirse en el animal C3H/HeJ un retraso en la cinética de expresión de algunos de los genes pro-inflamatorios. Asimismo, el análisis comparativo de los genes involucrados en distintos procesos biológicos señala la existencia de diferencias tanto en el número de genes que participan de un proceso dado como en la identidad de los mismos y sus niveles de expresión (Figuras 2.4 y 2.5).

Los cambios transcripcionales inducidos a nivel pulmonar a las 24h posteriores a la infección por *B. pertussis* también han sido estudiados en otros trabajos (S. Banus, Pennings, et al., 2007). Los resultados encontrados en los mismos señalan que la respuesta tiene un predominio de los procesos de activación transcripcional en donde el 64% de los genes diferencialmente expresados respecto de los animales sin infectar (controles) fueron inducidos. Además los mismos presentaron niveles de variación superiores a la variación

observada para los genes reprimidos. Por su parte, la respuesta encontrada se caracterizó por la inducción de procesos de respuesta inmune con activación de genes de citoquinas y quimoquinas, genes pro-inflamatorios, genes de respuesta de fase aguda, genes de la cascada de complemento, genes asociados a la presentación antigénica y genes relacionados al ciclo celular. Estos resultados son análogos a los encontrados en nuestros estudios a pesar de la existencia de diferencias entre los respectivos diseños experimentales. Estas diferencias incluyen las cepas murinas empleadas (C3H/HeN vs C3H/DISnA), las dosis infectivas (10^8 UFC vs 2×10^7 UFC), la metodología de infección (intranasal vs aerosol) así como la plataforma de microarray empleada y el sistema de detección de la hibridación.

Adicionalmente, la comparación de la respuesta transcripcional establecida frente a la infección por el animal TLR-4 competente con las respuestas desarrolladas frente a otras patologías pulmonares indica la existencia de algunas similitudes (C. C. Lewis et al., 2008; J. L. a Pennings et al., 2008). Parte de la respuesta observada frente a *B. pertussis* también es establecida frente a otros patógenos respiratorios bacterianos como *M. tuberculosis*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* e incluso frente a patógenos virales como el virus de influenza. El análisis de los perfiles transcripcionales pulmonares establecidos en cada caso junto con los datos obtenidos por nosotros en el marco de la infección por *B. pertussis* indica la inducción compartida de ciertos genes relacionados con la respuesta inmune. Entre ellos, las principales similitudes se encuentran en la inducción de genes de citoquinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, Tnf- α , Csf3), quimoquinas CC (CCL2, CCL4, CCL7, CCL8, CCL17, CCL19, CCL20 y CCL22), quimoquinas CXC- (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL9 y CXCL10). Muchos de los genes inducidos por interferón detectados en la respuesta frente a *B. pertussis* también pueden ser encontrados en los modelos mencionados (CXCL9, CXCL10, proteínas de unión a guanilato 1 y 2 (GBP1 y GBP2), IFIT1, IFIT2, y algunos genes del inmunoproteasoma). Adicionalmente también pueden ser mencionadas los genes involucrados en las vías de señalización inmunológicas, aunque los niveles de inducción de estos genes son menores tanto en nuestro ensayo como en el caso de los distintos patógenos mencionados. Entre este grupo de genes podemos nombrar a genes que codifican para moléculas asociadas a la señalización de NF κ B (NFKB2, NFKBIB, NFKBIE, IKBKE, REL, RELB, TNFAIP3)

o la señalización asociada a interferón (IRF-1, IRF7, IFNAR2, Stat2) entre otras. Las similitudes indicadas señalan que al menos parte de la respuesta transcripcional observada frente a *B. pertussis* es independiente del patógeno en cuestión y corresponde al mecanismo de respuesta pulmonar frente a diversas injurias microbianas

El análisis de los resultados obtenidos en los estudios presentados en este capítulo pone de manifiesto además la relevancia de la cinética escogida a fin de discriminar la contribución de TLR-4 en el establecimiento de la respuesta del huésped frente a la infección por *B. pertussis*. Así, mientras a las 24h las respuestas encontradas entre ambas cepas murinas fueron comparables el estudio de la respuesta a las 2h y 6h post-infección fue clave para determinar la importancia de dicho receptor. Este perfil, en donde la ausencia de TLR-4 condiciona fuertemente la inducción inicial de la respuesta inmune frente a la presencia patogénica, también ha sido observado en otras infecciones respiratorias causadas por bacterias gram negativas (Schurr 2004). En conjunto estas observaciones remarcan la importancia del estudio de las primeras horas de la interacción huésped patógeno a fin de determinar la dependencia de la detección patogénica de un receptor de reconocimiento dado. La cinética escogida nos permitió además determinar cuáles de los eventos de la respuesta inmune innata establecida frente a *B. pertussis* son afectados por la funcionalidad de TLR-4. Esto permitió profundizar el conocimiento sobre los mecanismos mediante los cuales dicho receptor contribuye a la defensa ante este patógeno respiratorio.

La expresión de distintos mediadores cuya contribución al control de la infección por *B. pertussis* ha sido descrita por otros autores ha sido observada en este trabajo. Las citoquinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 han sido implicados en la defensa anti-pertussis. La deficiencia en TNF- α o en el receptor de IL-1 conduce en ambos casos a un aumento en la letalidad frente a la infección, con incapacidad de controlar las cargas bacterianas en el tracto respiratorio dando origen a una enfermedad atípica con diseminación bacteriana (Wolfe et al., 2007; X. Zhang, Hester, et al., 2011). Por su parte, IL-6 parece regular varios aspectos de la respuesta inmune frente a *B. pertussis* como la generación de anticuerpos y los mecanismos de clearance asociados, la acumulación de leucocitos en el foco

infeccioso y la producción de citoquinas asociadas a una respuesta adaptativa Th1 que participa de la eliminación bacteriana (X. Zhang, Goel, et al., 2011). Las citoquinas IL-1 β e IL-6 participan además en el desarrollo de la respuesta adaptativa Th17 la cual contribuye a la defensa mucosal frente infecciones bacterianas incluida la originada por *B. pertussis* (Dunne et al., 2010; X. Zhang, Hester, et al., 2011) Nuestros estudios señalaron que la expresión de los genes para estas tres citoquinas está condicionada por la funcionalidad de TLR-4. Así los animales CeH/HeJ presentaron deficiencias tanto en la cinética de inducción de estos tres marcadores como en los niveles de expresión encontrados durante las primeras 24h de la infección (Figura 2.6). Esto podría contribuir a las deficiencias observadas en el control de la carga bacteriana que presentan estos animales (Figura 2.1). Sin embargo, de acuerdo a lo reportado en los trabajos mencionados, la ausencia de TNF- α e IL-6 sólo genera deficiencias en el control bacteriano luego del día 14 post-infección, indicando que en nuestras condiciones experimentales otros factores que dependen de la funcionalidad de TLR-4 deben contribuir al déficit temprano en la eliminación de *B. pertussis*. A pesar de ello, el condicionamiento de la expresión de estas tres citoquinas podría contribuir a las diferencias observadas a tiempos más tardíos post-infección por otros autores, dada la relación de cada una de ellas con el desarrollo de la respuesta adaptativa anti-pertussis (Higgins et al., 2003).

Por otra parte, otros procesos biológicos modulados por la infección y relevantes para la defensa anti-pertussis parecen ser independientes de la funcionalidad de TLR-4. Este es el caso de la inmunidad mediada por interferón, un proceso que fue activado en forma comparable tanto en animales C3H/HeN como C3H/HeJ, siendo el proceso con mayor representación en el análisis de la respuesta común a ambas cepas (Figura 2.4 y 2.5). Es probable que esto se relacione con la inducción de este proceso a tiempos posteriores a las 2h post-infección, en donde otras vías de reconocimiento capaces de detectar la presencia de *B. pertussis* son operativas. Estos hallazgos indican que a pesar de la relevancia que tiene el IFN γ en la defensa temprana frente a dicho patógeno (Barbic et al., 1997; Mahon et al., 1997), la funcionalidad de TLR-4 debe condicionar otros mecanismos de contención de *B. pertussis* que determinen la susceptibilidad del animal C3H/HeJ a la infección.

Los estudios realizados en este trabajo indican que el reclutamiento neutrofílico y los mecanismos de eliminación bacteriana a ellos asociados son un importante mecanismo efector TLR-4 dependiente asociado al control temprano de la infección por *B. pertussis*. Otros autores han analizado la dependencia de TLR-4 del reclutamiento leucocitario, pero a diferencia de nuestros análisis se han centrado en tiempos posteriores a las 72h post-infección. En forma similar a lo observado por nosotros, el animal TLR-4 deficiente presenta menores niveles de leucocitos en pulmón, incluyendo los neutrófilos, durante la primer semana post-infección (Higgins et al., 2003). Luego de este punto, mientras el animal TLR-4 competente es capaz de establecer mecanismos de eliminación bacteriana que llevan a la resolución de la respuesta inflamatoria, el animal TLR-4 deficiente sigue presentando cargas bacterianas elevadas que continúan promoviendo un reclutamiento leucocitario activo. Esto señala que a tiempos tardíos durante la infección las respuestas establecidas por ambas cepas no son directamente comparables en términos de su dependencia de TLR-4, puesto que cada animal se encuentra en situaciones distintas determinadas por los eventos diferencialmente inducidos en el animal TLR-4 competente respecto del TLR-4 deficiente.

De acuerdo a nuestros estudios los neutrófilos son los primeros leucocitos en arribar al foco infeccioso en donde presentan un perfil transcripcional activo y pueden ser asociados al agente patogénico durante las primeras 24h de la infección. Esto sugiere la participación de esta población leucocitaria en los mecanismos de contención temprana de *B. pertussis* y fue observado también por otros autores (R Vandebriel, 2003). Los ensayos de depleción de neutrófilos realizados en este trabajo permitieron confirmar la importancia de estas células para el clearance de *B. pertussis* en los estadios iniciales de la infección de manera análoga a lo encontrado en otras infecciones respiratorias de origen bacteriano (Craig, Mai, Cai, & Jeyaseelan, 2009).

Como hemos mencionado anteriormente, los mecanismos efectores que participan en la eliminación de *B. pertussis* aún no están claramente establecidos. Otros autores han estudiado la contribución de la población neutrofílica en la infección. Dichos trabajos encontraron una contribución activa de esta población en la eliminación de *B. pertussis* en presencia de anticuerpos opsonizantes (Andreasen & Carbonetti, 2009; Kirimanjeswara et al., 2005). Tanto en dichos

estudios como en los nuestros, se realizaron ensayos de depleción neutrofílica empleando el mismo anticuerpo depletante para evaluar el rol de dicha población leucocitaria. Sin embargo, aspectos del diseño experimental pueden explicar las diferencias con nuestros hallazgos, en donde los neutrófilos son relevantes aún en ausencia de anticuerpos específicos anti-*B. pertussis*. Uno de los factores corresponde a la ventana temporal en que la participación de esta población es analizada en uno y otro caso. En este sentido, mientras nosotros estudiamos la contribución temprana los estudios realizados por Carbonetti (2009) son realizados a día 4 y día 7 post-infección. Por otra parte, las cepas murinas y las dosis infectivas empleadas también presentan diferencias, pudiendo ser éste uno de los principales motivos de las diferencias encontradas con dichos trabajos. En nuestras condiciones experimentales la mayor carga bacteriana inoculada (10^8 ufc vs 5×10^6 ufc) parece exceder la capacidad de las células residentes del pulmón de contener la infección. Como consecuencia, se produce un reclutamiento neutrofílico significativo dentro de las primeras 24h post-infección al foco infeccioso donde estas células contribuyen a la eliminación bacteriana durante las primeras 72h de la infección. Esta capacidad de dar lugar a barreras sucesivas de defensa en relación al estímulo y la injuria percibidas parece ser una de las características de la forma en que se estructura la respuesta inmune en la mucosa respiratoria. Hallazgos análogos en modelos de infección frente a otros patógenos apoyan esta hipótesis (Marriott & Dockrell, 2007).

En resumen, el trabajo presentado refleja la relevancia de la activación de la inmunidad innata para el establecimiento de los mecanismos de defensa de la mucosa respiratoria frente al patógeno humano *B. pertussis*. En el contexto de esta infección, si bien la mucosa respiratoria dispone de varios receptores de reconocimiento de patógeno capaces de mediar la defensa antibacteriana, TLR-4 resulta fundamental para determinar la activación temprana de la respuesta inmune, generando una respuesta con características específicas capaces de contribuir al control de la infección.

Teniendo en cuenta que es deseable un paralelismo entre la respuesta inmune generada por la infección natural y la generada luego de una inmunización preventiva empleando antígenos no replicativos, es posible suponer

que la activación de TLR-4 será relevante también para el desarrollo de la una adecuada inmunidad protectora. De acuerdo a esto, una alternativa de inmunización para lograr niveles de protección aceptables podría estar dada por la administración del antígeno vacunal de elección junto con un agonista de TLR-4 apropiado.

En los capítulos siguientes profundizaremos el análisis sobre la participación de esta y otras vías TLR en el establecimiento de mecanismos de defensa innatos y adaptativos frente a *B. pertussis*.



Capítulo 3

La estimulación de la respuesta innata y la generación de resistencia en la infección por *B. pertussis*

INTRODUCCION

El concepto de manipular la respuesta inmune como tratamiento frente a diversos tipos de patologías, y en particular frente a enfermedades infecciosas, viene siendo aplicado desde hace tiempo. La mayor parte de las estrategias se han centrado sobre la inmunidad adaptativa y el desarrollo de una respuesta de memoria que resulte eficaz para la profilaxia frente al encuentro con agentes patogénicos de diversas clases. Así, la utilidad de este concepto ha sido sustentada por las grandes disminuciones de mortalidad y morbilidad que se han producido desde la implementación de vacunas frente a múltiples patógenos bacterianos y virales, siendo una arma fundamental para el beneficio de la salud pública

Por su parte, menos estudios han contemplado la manipulación de la inmunidad innata como estrategia terapéutica aunque el conocimiento creciente sobre la importancia de esta rama del sistema inmune en el desarrollo de procesos inflamatorios presentes en patologías varias y en el direccionamiento de la respuesta adaptativa hace que esta idea esté cobrando importancia. En este sentido, el estudio de las vías de activación de la inmunidad innata y el descubrimiento del rol fundamental de los receptores TLR los ha convertido en blancos estratégicos para la modulación de dicha respuesta, un campo con amplio desarrollo en la industria farmacéutica actual. Parte de los esfuerzos se han abocado a la modulación negativa de la inmunidad innata en donde el desarrollo de antagonistas de receptores TLR aparece como una alternativa a otros agentes de uso actual que presentan considerables efectos adversos como los anticuerpos anti-TNF α . Asimismo, ha sido sugerido que el bloqueo específico de la señalización TLR podría ser una manera de limitar los efectos inflamatorios nocivos dependientes de NF κ B sin alterar su capacidad de activación fisiológica (Loiarro, Ruggiero, & Sette, 2010). A modo de ejemplo, antagonistas de TLR-4

están en etapas avanzadas de desarrollo para el tratamiento de la sepsis (Rossignol et al., 2004).

Las propiedades inmuno-estimuladoras de los agonistas TLR también ha sido aprovechada en distintos contextos. El primer término podemos resaltar el uso de estos agonistas como adyuvantes en el diseño de formulaciones vacunales, lo cual será objeto del siguiente capítulo de este trabajo. Por otra parte, la estimulación de receptores TLR también ha sido considerada en el tratamientos de desórdenes atópicos en los que existe una exacerbación del perfil de respuesta inmunológica Th2. A tal fin existen ensayos clínicos en curso con drogas que señalizan a través de TLR-4. También se han realizado experiencias clínicas empleando estos agentes en el tratamiento del cáncer. En este contexto la estimulación TLR tendría efectos benéficos al contrarrestar el entorno supresor en el que se desarrolla la neoplasia favoreciendo la activación de mecanismos inmunológicos anti-neoplásicos (Adams, 2009). El agonista de TLR-7 se encuentra actualmente licenciado para su uso en el tratamiento de “basal cell carcinoma” mientras que CpG, el agonista de TLR-9, parece ser promisorio de acuerdo a diversos ensayos clínicos (Romagne, 2007).

Por el contrario, menos se ha explotado el empleo de agonistas TLR en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Existen algunas experiencias que han avanzado hacia estudios clínicos señalando la potencialidad de esta estrategia. Hasta el presente, mayoritariamente agonistas de TLR-7 han sido empleados en el tratamiento de este tipo de patologías y el uso de imiquinod ha sido licenciado para el tratamiento del herpes genital (A Gaspari, Tyring, & Rosen, 2009). Entre los ensayos clínicos actuales, se encuentra el empleo de agonistas de TLR-7, de TLR-8 e incluso de TLR-9 en el control de patologías de origen viral como la hepatitis B, la hepatitis C (Bergmann et al., 2011) y el herpes genital (Diamantis et al., 2009).

Algunos trabajos recientes muestran resultados prometedores respecto de los efectos que esta estrategia pueda tener en el control de las infecciones respiratorias, donde la rápida eliminación del microorganismo es un aspecto clave. Mediante el empleo de modelos murinos se ha observado que la estimulación de la inmunidad innata local, a través de la administración intranasal de un lisado bacteriano, genera una respuesta protectora frente a desafíos concomitantes con dosis letales de patógenos diversos como el virus de influenza

A, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus fumigatus* (Evans, Scott, et al., 2010). Los resultados de este trabajo prueban los efectos benéficos que puede tener la exacerbación de la inmunidad innata en el control de las infecciones respiratorias. El estudio de los mecanismos implicados sugiere que el epitelio respiratorio sea, probablemente, el responsable de tales efectos. La activación de múltiples vías de la respuesta innata debido al estímulo utilizado podría explicar el amplio espectro de agentes microbianos frente a los que se logra resistencia; sin embargo, no permite determinar cuales son los determinantes moleculares claves para inducir protección. En este sentido, el empleo de agonistas TLR individuales puede ser de utilidad para determinar las vías que son necesarias y suficientes para generar resistencia a patógenos específicos y en forma simultánea poder evaluar el tipo de respuesta innata que permite el control de un microorganismo dado. Esta información favorece la comprensión sobre las herramientas que el hospedador pone en juego para resistir la infección y resulta útil para el diseño de estrategias terapéuticas y también para el diseño de estrategias profilácticas tanto vacunales como no vacunales.

Algunos trabajos en la literatura han demostrado el uso benéfico de agonistas TLR: la administración intraperitoneal o intranasal de oligodeoxinucleótidos CpG aumenta la sobrevida a infecciones respiratorias causadas por *Mycobacterium avium*, *Klebsiella pneumoniae* y algunas especies de *Burkholderia* (Deng et al., 2004; Goodyear et al., 2009; Standiford & Deng, 2004). De manera análoga, el tratamiento con el agonista de TLR2/6, MALP-2, reduce la carga bacteriana y aumenta la sobrevida en la infección por *S. pneumoniae* (Reppe et al., 2009) mientras que animales pre-tratados con Poly IC o preparaciones liposomales de CpG ODN muestran mejor sobrevida al desafío con distintas cepas del virus de influenza (J. P. Wong et al., 2009). Incluso el LPS ha sido empleado en este tipo de ensayos con el fin de disminuir la patología asociada a infecciones pulmonares bacterianas (Jean et al., 1998). Ningún estudio similar existe en la infección por *B. pertussis*.

El trabajo de este capítulo está destinado a analizar si la estimulación de vías específicas de la inmunidad innata es capaz de inducir resistencia a una infección concomitante por *B. pertussis*. El racional de esta estrategia es la

generación de una respuesta innata que supere en magnitud, calidad y cinética de establecimiento a la respuesta generada por el propio patógeno, analizando la capacidad de mecanismos específicos de brindar protección.

Con el fin de profundizar el estudio sobre el impacto de la señalización TLR-4 y los mecanismos desencadenados en el desarrollo de una respuesta innata capaz de brindar resistencia frente a *B. pertussis* decidimos analizar en forma comparativa los efectos producidos por la estimulación de TLR-4 frente a la activación de otras dos vías TLR: TLR-3 y TLR-5. Para estos estudios estimularemos la inmunidad innata local a través de la administración de los respectivos agonistas TLR por vía intranasal: Poly IC para TLR-3, LPS para TLR-4 y flagelina para TLR-5. Como hemos mencionado, estos dos receptores fueron escogidos por emplear vías de señalización parcialmente compartidas con la de TLR-4. Así, TLR-3 es exclusivamente TRIF dependiente y TLR-5 emplea la vía MyD-88 mientras que TLR-4 emplea ambas vías.

En los estudios realizados en el Capítulo 1 hemos comprobado que la administración intrasal tanto de Poly IC como de LPS y flagelina induce la expresión de quimoquinas y citoquinas en células epiteliales de vías aéreas de distintas regiones del árbol respiratorio, así como también en las células presentes en el espacio alveolar. Todos los agonistas indujeron también el reclutamiento leucocitario.

Por su parte, en el Capítulo 2 hemos visto la importancia de la activación de la inmunidad innata en el control temprano de la infección causada por *Bordetella pertussis*. En este contexto, la señalización vía TLR-4 resulta fundamental para la rápida detección de la bacteria, a pesar de expresar distintos tipos de patrones moleculares susceptibles de ser reconocidos por otros receptores innatos presentes en la mucosa respiratoria. Esto sugiere la existencia de mecanismos TLR-4 dependientes con cualidades específicas capaces de determinar el curso de la infección, parte de los cuales fueron estudiados en dicho capítulo.

En el presente capítulo, el estudio simultáneo de los efectos de las tres vías TLR seleccionadas nos permitirá profundizar el estudio de aquellos mecanismos que permiten el control de la infección por *B. pertussis* mediante el análisis de las respuestas efectoras desencadenados por Poly IC, LPS y flagelina y su correlación con el impacto de cada uno de ellos sobre el curso de la infección.

RESULTADOS

Para evaluar el efecto de la estimulación de los receptores TLR sobre la infección por *B. pertussis* se realizaron ensayos de infección en animales Balb/c en los que la suspensión bacteriana conteniendo 10^6 ufc de *B. pertussis* fue administrada sola (grupo control) o en combinación con $1\mu\text{g}$ de LPS de *B. pertussis*, $1\mu\text{g}$ de FliC o $50\mu\text{g}$ de Poly IC. El impacto de los distintos tratamientos fue evaluado mediante la determinación de la carga bacteriana en pulmón a las 24h post-infección (Figura 3.1).

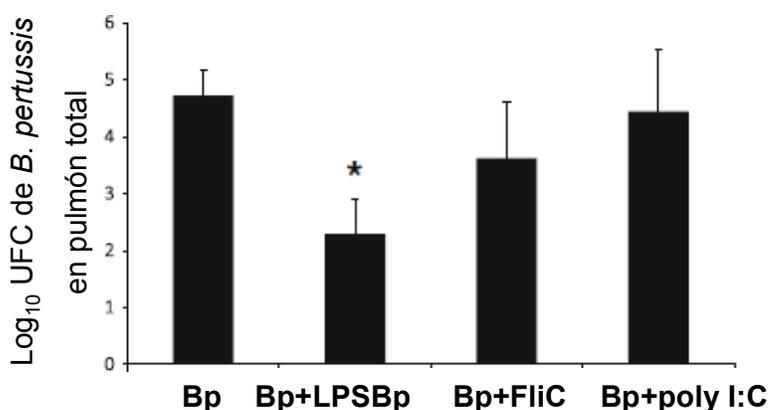


Figura 3.1: Efecto de la co-administración de agonistas TLR sobre la colonización pulmonar por *B. pertussis* a las 24h post-infección.

Animales Balb/c fueron infectados intranasalmente con 10^6 UFC de *B. pertussis* sola o en combinación con $1\mu\text{g}$ de LPS de *B. pertussis* o $1\mu\text{g}$ de flagelina (FliC) o $50\mu\text{g}$ de Poly IC. A las 24h post-infección la colonización bacteriana fue evaluada por recuento bacteriano en placa de las UFC presentes en los homogenato pulmonares. Los resultados indican los valores promedio del Log₁₀ de las UFC en pulmón total \pm SEM. Por cada condición fueron empleados 5 animales. La figura es representativa de 3 ensayos realizados.

* diferencias significativas respecto del tratamiento con *B. pertussis* sola por el test de Tukey. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$

Estos resultados indican que es posible disminuir la carga bacteriana pulmonar mediante la estimulación de la respuesta innata de la mucosa respiratoria al momento de la infección, reflejando nuevamente, la relevancia de la misma para el control de la infección por *B. pertussis*.

Sin embargo, el efecto benéfico se logra sólo ante la administración de LPS, en concordancia con lo encontrado en el Capítulo 2, que señala que la señalización vía TLR-4 es fundamental para el reconocimiento temprano de la

presencia patogénica y el establecimiento de los mecanismos de defensa. Así, este tratamiento induce una disminución en la carga bacteriana de aproximadamente dos órdenes de magnitud a diferencia del caso de Poly IC en el cual los niveles son comparables a los del grupo control (Figura 3.1). Por su parte, la activación de TLR-5 parece tener algún impacto sobre el control de la infección dado que la co-administración de flagelina parece generar una leve disminución de la carga bacteriana a las 24hs post-tratamiento aunque la misma no resultó estadísticamente significativa. A fin de comprobar la existencia de algún efecto mediado por la señalización vía TLR-5 sobre el control de la infección por *B. pertussis* se realizaron ensayos empleando dosis mayores de flagelina. Para garantizar que los hallazgos sean independientes de cualquier posible contaminación por LPS los ensayos fueron realizados en la cepa murina C3H/HeJ, deficiente para TLR-4 (Figura 3.2).

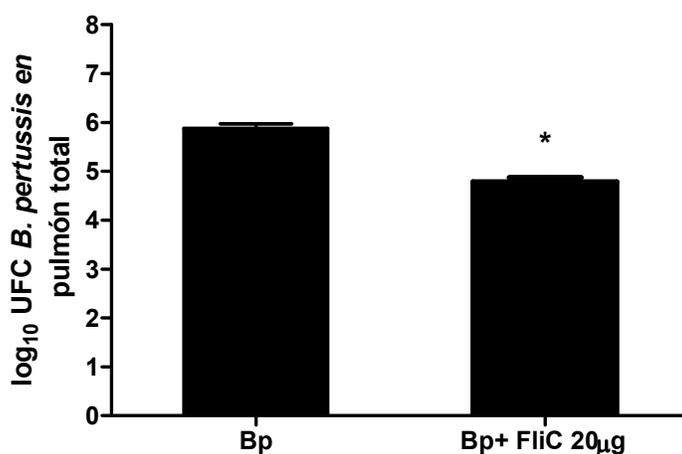


Figura 3.2: Efecto de la administración de flagelina sobre la colonización pulmonar por *B. pertussis*.

Animales C3H/HeJ fueron infectados intranasalmente con 10^6 UFC de *B. pertussis* sola o en combinación con distintas dosis de flagelina (FliC). A las 24h post-infección la colonización bacteriana fue evaluada por recuento bacteriano en placa de las UFC presentes en los homogenato pulmonares.

Los resultados indican los valores promedio del Log₁₀ de las UFC en pulmón total \pm SEM. Por cada condición fueron empleados 5 animales.

Diferencias significativas respecto del tratamiento con *B. pertussis* sola por el test de Tukey. * $p < 0.001$

Como se observa, si bien la administración de flagelina puede contribuir a la disminución de la carga bacteriana el efecto de la estimulación de la respuesta innata mucosal mediante TLR-5 es mas leve que el logrado por el tratamiento con

LPS. Así mientras el tratamiento con 1µg de LPS promovió una disminución de aproximadamente dos órdenes de magnitud en la carga bacteriana pulmonar, se necesitaron dosis de 20µg de flagelina para obtener disminuciones de 1 orden de magnitud (Figura 3.1 vs. Figura 3.2).

Con el objeto de evaluar la dependencia de TLR-4 de los mecanismos que facilitan el control de la infección en los ensayos de inducción de la inmunidad innata al momento de la infección por *B. pertussis* el mismo ensayo fue reproducido en la cepas murinas C3H/HeJ y C3H/HeN. Los resultados se muestran en la Figura 3.3.

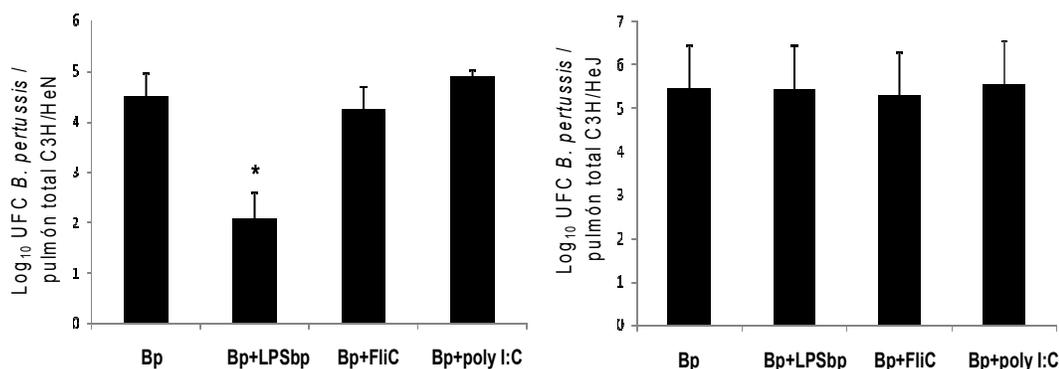


Figura 3.3: El efecto de la inducción de la respuesta innata sobre el control de la infección por *B. pertussis* es TLR-4 dependiente.

Animales C3H/HeN y C3H/HeJ fueron infectados intranasalmente con 10⁶ UFC de *B. pertussis* sola o en combinación con 1µg de LPS de *B. pertussis* o 1 µg de flagelina (FlIC) o 50 µg de Poly I:C. A las 24h post-infección la colonización bacteriana fue evaluada por recuento bacteriano en placa de las UFC presentes en los homogenato pulmonares.

Los resultados indican los valores promedio del Log₁₀ de las UFC en pulmón total ± SEM. Por cada condición fueron empleados 5 animales. Los resultados son representativos de dos experimentos realizados.

* Diferencias significativas respecto del tratamiento con *B. pertussis* sola por el test de Tukey. **p* < 0.05

Como se aprecia en la Figura 3.3, mientras los animales TLR-4 competentes (C3H/HeN) responden de manera análoga a los animales Balb/c ante la administración de los distintos agonistas, no se observa disminución de la carga bacteriana generada por el tratamiento con LPS en los animales TLR-4 deficientes (C3H/HeJ). Así, la disminución temprana de la carga bacteriana

pulmonar encontrada en estos ensayos depende del establecimiento de mecanismos de control microbianos desencadenados por la señalización vía TLR-4.

Con el fin de analizar la magnitud de la respuesta al momento de evaluar la carga microbiana se decidió analizar la expresión de marcadores de la respuesta innata a las 24h post-tratamiento a nivel pulmonar. En este caso, animales no tratados fueron empleados como control (Figura 3.4).

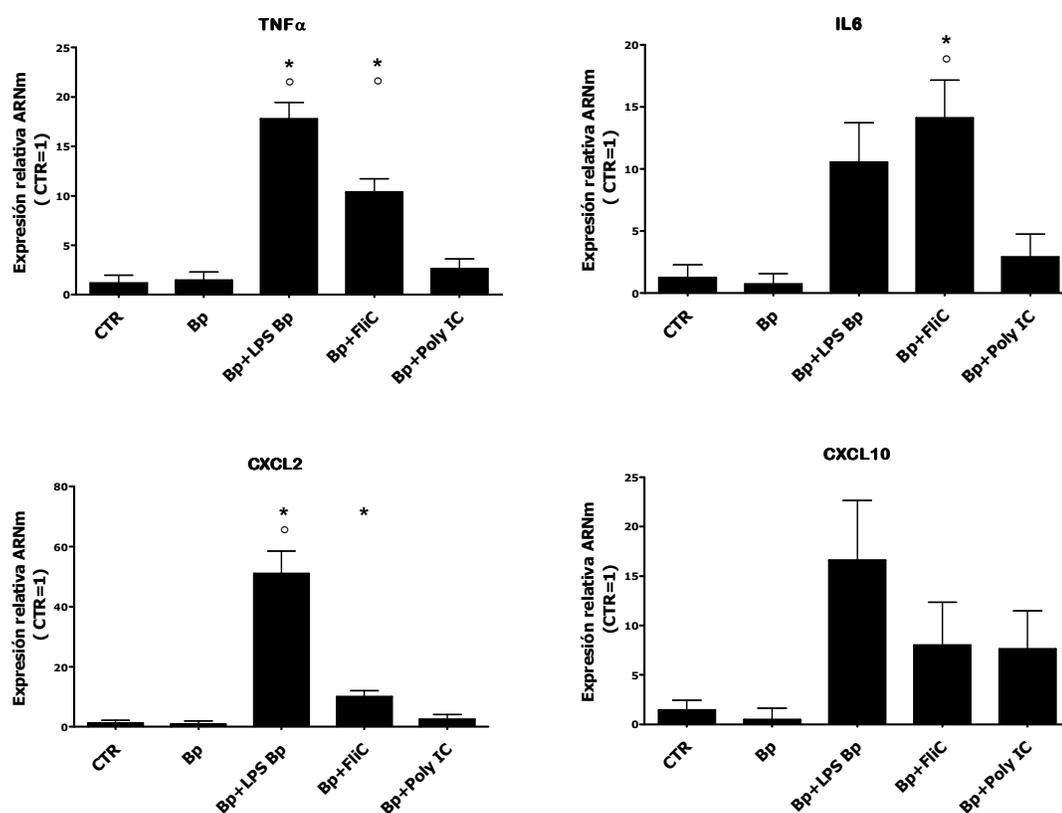


Figura 3.4: Expresión relativa pulmonar de marcadores de respuesta innata inducida por la co-administración de agonistas TLR en la infección por *B. pertussis*.

A las 24h post-infección se midió la expresión de IL6, TNF α , CXCL2 y CXCL10 en pulmones de animales Balb/c infectados con 10^6 UFC de *B. pertussis* sola o en combinación con 1 μ g de LPS de *B. pertussis*, 1 μ g de flagelina (FliC) o 50 μ g de Poly IC mediante PCR cuantitativa. El incremento relativo fue calculado en relación a los valores obtenidos para el grupo de animales no infectados (CTR).

Los resultados muestran los valores promedio de incremento relativo \pm SEM, para 5 animales por condición. La figura muestra los resultados representativos de dos ensayos realizados.

*p < 0.01 en comparación al control no infectado, Test de Tukey

° p < 0.01 en comparación a la condición Bp+ Poly IC, Test de Tukey.

La infección por *B. pertussis* en sí misma, a la dosis empleada, no produjo incrementos estadísticamente significativos respecto de los animales no infectados (control sin tratar) de ninguno de los marcadores estudiados (Figura 3.4). De acuerdo a los resultados mostrados en el Capítulo 2 y a otros resultados de nuestro equipo, esto está en relación a las dosis infectivas empleadas para estos estudios puesto que dosis mayores promueven una respuesta transcripcional activa.

Por el contrario, la inoculación de agonistas TLR al momento de la infección promueve la expresión génica de los marcadores innatos indicando que esta estrategia permite generar una respuesta activa en forma rápida. Los niveles de inducción encontrados para todos los marcadores y cada uno de los tratamientos muestra niveles muy inferiores a los determinados cuando los agonistas son administrados en ausencia de *B. pertussis*. Este fenómeno posiblemente se deba a la capacidad inmunomoduladora de *B. pertussis*.

Los perfiles encontrados para los agonistas empleados presentan ciertas características diferenciales: si bien tanto LPS como flagelina fueron capaces de inducir la expresión de CXCL2 y TNF α los niveles fueron significativamente superiores en el caso del tratamiento con LPS. Por el contrario, flagelina fue el único agonista que moduló significativamente la expresión de IL-6 en el pulmón, a pesar de que el tratamiento con LPS pareciera tener algún efecto. En el caso de CXCL10, todos los tratamientos parecen inducir su expresión, aunque no fueron encontradas diferencias significativas respecto del tratamiento control. La co-administración de Poly IC por su parte, no moduló ninguno de los marcadores evaluados, a pesar de que la dosis empleada generó una buena activación de estos marcadores al ser aplicada en ausencia de *B. pertussis*, tal como se vió en el Capítulo 1.

No pudo observarse una correlación estricta entre la activación de la respuesta innata y la eliminación de *B. pertussis* puesto que, al igual que el LPS, flagelina activa de manera significativa la respuesta innata tanto al ser empleada en forma individual como durante su co-administración al momento de la infección aunque no es capaz de promover la disminución de la carga bacteriana.

A pesar de ser un componente estructural esencial para las bacterias gram negativas, gran parte de estos microorganismos han desarrollado modificaciones en la estructura del LPS. Estas modificaciones impactan directamente en la forma en que cada microorganismo interactúa con su hospedador independientemente de si la relación es patogénica o simbiótica. Aunque existen distintos tipos de modificaciones, las variaciones en la estructura se localizan en muchos casos en la porción del lípido A, alterando así su interacción con TLR-4. De esta forma, LPS provenientes de distintos microorganismos pueden promover distintos tipos de respuesta (B Pulendran et al., 2001). Para comprobar si la capacidad de promover la disminución de la colonización pulmonar por *B. pertussis* es intrínseca al LPS de este patógeno, se realizaron ensayos de infección en animales Balb/c en los que se co-administró LPS de distintos orígenes: LPS de *B. bronchiseptica*, *E. coli* y *Sinhorizobium meliloti*. Cada uno de estos microorganismos presenta LPS con estructuras que difieren de uno a otro. En forma general, el LPS de *B. pertussis* consiste en una mezcla de especies conteniendo lípidos A tetra o penta-acilados unidos a un core polisacárido ramificado con numerosos grupos aminos y carboxilos libres y un trisacárido distal con azúcares N-acetilados. (Caroff, Brisson, Martin, & Karibian, 2000). Carece de antígeno O por lo que muchas veces se refiere a él como lipo-oligosacárido. *B. bronchiseptica* por el contrario presenta lípido A al igual que *E. coli*.

A diferencia de estos tres agentes patogénicos *S. meliloti* es una bacteria fijadora de nitrógeno que capaz de interactuar de manera simbiótica con plantas como la alfalfa a cambio de la obtención de determinados nutrientes. El LPS de este microorganismo presenta gran variabilidad que va desde la presencia ausencia de antígeno O a modificaciones en el core polisacárido (G. R. O. Campbell, Reuhs, & Walker, 2002).

La dosis infectiva utilizada fue análoga a la empleada en los ensayos previos. El efecto fue evaluado por recuento en placa de la carga bacteriana en pulmón a las 24h post-infección (Figura 3.5).

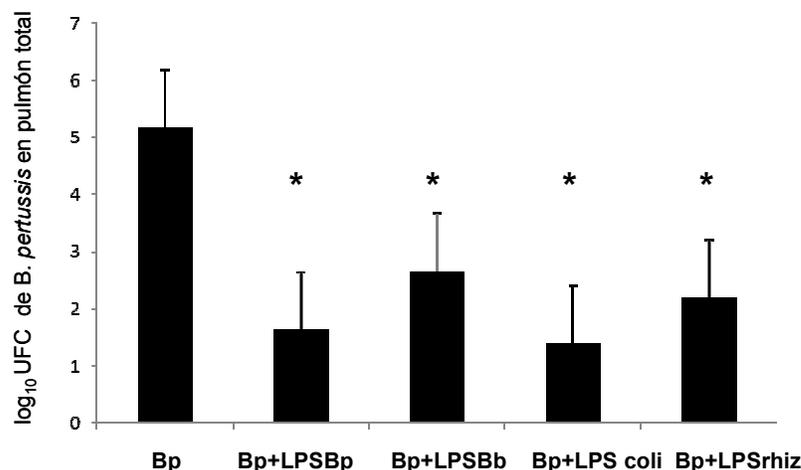


Figura 3.5: Efecto de la administración de LPS de distintas especies bacterianas sobre la colonización por *B. pertussis*.

Animales Balb/c fueron infectados intranasalmente con 10^6 UFC de *B. pertussis* sola o en combinación con $1\mu\text{g}$ de LPS de *B. pertussis* (Bp), $1\mu\text{g}$ de LPS de *B. bronchiseptica* (Bb), $1\mu\text{g}$ de LPS de *E. coli* o $1\mu\text{g}$ de LPS de *Sinhorizobium meliloti* (Rhiz). A las 24h post-infección la colonización bacteriana fue evaluada por recuento bacteriano en placa de las UFC presentes en los homogenato pulmonares.

Los resultados indican los valores promedio del Log₁₀ de las UFC en pulmón total \pm SEM. Por cada condición fueron empleados 5 animales. Los resultados son representativos de dos experimentos realizados.

* Diferencias significativas respecto de la condición Bp sola, $p < 0.001$ Test de Tukey.

Como se observa en la Figura 3.5 el empleo de los distintos LPS promovió disminuciones equivalentes de la colonización por *B. pertussis* (aproximadamente tres órdenes de magnitud) sugiriendo que el efecto es independiente del origen de dicho agonista.

DISCUSION

Los resultados mostrados en este capítulo reflejan que una inducción exacerbada de la respuesta innata de la mucosa respiratoria al momento de la infección por *B. pertussis* contribuye a la disminución temprana de la carga bacteriana. Esto refleja la importancia que tiene dicha respuesta en el control de la infección. A pesar de que otros trabajos han señalado la utilidad de esta estrategia para el control de infecciones respiratorias por otros agentes patogénicos (Clement et al., 2008; S. E. Evans, Scott, et al., 2010; Tuvim, Evans,

Clement, Dickey, & Gilbert, 2009) este trabajo ha sido el primero en resaltar la relevancia de la misma en el marco de la infección por *B. pertussis*.

Si bien la estimulación simultánea de distintas vías de la inmunidad innata genera protección contra un amplio espectro de patógenos (Tuvim et al., 2009), la activación individual de distintas vías TLR en forma comparativa frente a microorganismos particulares ha sido menos estudiada. En este trabajo evaluamos la capacidad de la respuesta innata temprana desencadenada por activación de TLR-3, TLR-4 y TLR-5 al momento de la infección de generar protección del hospedador frente a *B. pertussis*.

Los tres agonistas empleados, LPS, flagelina y Poly IC fueron buenos estimuladores de la respuesta innata respiratoria, promoviendo cada uno de ellos la activación tanto de células epiteliales como de las células residentes en el espacio alveolar (Capítulo 1). Sin embargo, el análisis comparativo de sus efectos en el marco de la infección por *B. pertussis* permitió determinar la existencia de mecanismos no redundantes desencadenados por cada receptor. Es así que, aunque todos los agonistas son capaces de inducir la respuesta innata de la mucosa respiratoria (Figura 3.4 cap3; Capítulo 1), sólo el LPS induce el clearance bacteriano a las 24h post-infección. Esto está en concordancia con los resultados mostrados en el Capítulo 2 que señalan la relevancia de la funcionalidad de TLR-4 para el rápido reconocimiento de la presencia de *B. pertussis* y inducción de una respuesta inmune que permita el control de la infección desde los momentos iniciales de la misma.

Los estudios realizados no permitieron establecer cuáles son las diferencias críticas entre las repuestas originadas por los distintos tratamientos. En principio pareciera que son diferencias cualitativas, no relacionadas a la magnitud de la activación de la inmunidad innata. Sin embargo, el efecto cuantitativo no puede descartarse, dado que en el modelo de estudio presentado en este capítulo no fue completamente caracterizado. Por otro lado, los perfiles de respuesta de la mucosa respiratoria a cada agonista a tiempos tempranos post-estimulación (2h) ha mostrado algunas diferencias entre sí, aunque las mismas son sutiles y no pueden ser claramente correlacionadas con los efectos encontrados sobre la infección por *B. pertussis* (Capítulo 1). Las diferencias nuevamente parecen ser cualitativas puesto que flagelina, que promueve una gran activación pulmonar temprana de todos los marcadores evaluados, con

diferencias significativas respecto de los otros agonistas, tiene un comportamiento distinto al del LPS en la eliminación temprana *B. pertussis*. Además hemos visto que aún empleando dosis superiores de flagelina la disminución de la carga bacteriana pulmonar obtenida es considerablemente menor a la obtenida por estimulación con LPS (Figura 3.2).

A diferencia de lo encontrado en el contexto de la infección por *B. pertussis*, diversas situaciones experimentales han mostrado la relevancia de la inmunidad innata desencadenada por el tratamiento con flagelina y la consecuente activación de TLR-5. Así por ejemplo, la estimulación de la inmunidad innata mediante la administración intraperitoneal de flagelina resulta protectora frente a una diversidad de injurias que no sólo incluyen agentes infecciosos sino también injurias químicas y radiológicas. De esta manera, es un tratamiento efectivo frente a la injuria producida por dextran sulfato, un compuesto químico ampliamente empleado para el desarrollo de modelos de colitis, igualmente que frente a radiación y desafíos virales y bacterianos por vía oral (Vijay-Kumar, Aitken, Sanders, et al., 2008). No sólo la administración intraperitoneal de flagelina genera respuesta protectoras. El efecto benéfico del tratamiento con flagelina por vía intranasal para el control de infecciones respiratorias también ha sido observado en el caso del desafío con *S. pneumoniae* y con *P. aeruginosa* en ambos casos mediante el reclutamiento temprano de neutrófilos y la eliminación del agente patógeno (Muñoz et al., 2010; Yu et al., 2010).

A pesar de la diversidad de estímulos frente a los que protege la estimulación de la inmunidad innata activada vía TLR-5 los efectos de la misma no fueron contundentes en el control de *B. pertussis*. Esto muestra que la mucosa respiratoria cuenta con diversos mecanismos de respuesta frente a infecciones bacterianas puesto que ambos receptores reconocen patrones moleculares asociados a bacterias pero sólo TLR-4 genera protección frente a la infección por *B. pertussis*. Asimismo, cada mecanismo innato tiene un impacto diferencial sobre distintos patógenos haciendo que el hospedador requiera de la ejecución de respuestas particulares y específicas de la inmunidad innata para promover el control temprano de distintos agentes microbianos.

La estimulación de la respuesta innata en la mucosa respiratoria mediante el empleo de Poly IC también ha sido benéfica para el control de infecciones virales (J. P. Wong et al., 2009) aunque no se ha descrito su relevancia en el control de infecciones bacterianas. Sin embargo, dado que el receptor de Poly IC, TLR-3, emplea vías de señalización TRIF-dependientes análogas a las empleadas por TLR-4, decidimos estudiar su contribución a la defensa frente a *B. pertussis*. A pesar de que Poly IC resultó ser un buen agente potenciador de la respuesta innata local cuando fue administrado solo, ningún efecto pudo observarse para el tratamiento con el agonista de dicho receptor.

Como se ha mencionado, no pudo encontrarse una correlación estricta entre la activación de la respuesta innata y la eliminación bacteriana. El discernimiento de los mecanismos responsables del control bacteriano en este modelo puede contribuir al entendimiento sobre el tipo de respuesta que confiere resistencia frente a este patógeno. Varios actores celulares y moleculares pueden estar implicados en este fenómeno. Dada la rapidez con la que se manifiestan estos efectos cabe pensar en la participación de células que estén presentes desde el inicio de la infección tales como las células epiteliales o los macrófagos alveolares. Ambos tipos celulares presentaron una activación significativa en respuesta a la estimulación con los agonistas TLR tal como se mostró en el capítulo anterior. Carbonetti y col. han mostrado que los macrófagos alveolares parecen tener una contribución al menos parcial en la eliminación de *B. pertussis* en el modelo murino de infección (Carbonetti et al., 2007). Esta población está equitativamente representada en las células obtenidas por lavado bronquioalveolar de los animales tratados con LPS, flagelina y Poly IC a las 24hs post-tratamiento. Sin embargo, dado que esta población tiene un recambio más lento que otras poblaciones leucocitarias que intervienen en la defensa de la mucosa respiratoria es menos probable, con respecto por ejemplo a los neutrófilos, que existan diferencias cuantitativas tempranas entre los tres agonistas que expliquen las diferencias observadas en los niveles de bacteria pulmonar en uno y otro caso. A pesar de ello, las diferencias podrían estar en relación con el grado de activación celular promovido por cada tratamiento. Los resultados mostrados en el Capítulo 1 indican que los tres agonistas provocaron la activación temprana (2h post-tratamiento) de las células presentes en el

espacio alveolar de animales Balb/c naive representadas en un 80% por los macrófagos alveolares. Aunque no se apreciaron diferencias cuantitativas en el grado de activación de estas células producido por LPS, flagelina y Poly IC, los perfiles mostraron algunas diferencias entre sí aunque no se evidenció un patrón claro de activación que pueda ser correlacionado con el efecto de cada tratamiento sobre la infección.

En cuanto a las células del epitelio respiratorio, no existen evidencias sobre la contribución del mismo en el control de la infección por *B. pertussis*. Esto se ha observado en otras infecciones respiratorias, como la de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e incluso la del virus de influenza (S. E. Evans, Scott, et al., 2010). Tampoco existe información sobre la acción de actores moleculares derivados del epitelio como las defensinas, las catelicidinas, la lipocalina, u otras respecto de su acción microbicida sobre *B. pertussis*. En este sentido, hemos observado que el epitelio respiratorio de distintas regiones de las vías de conducción aérea presenta una activación contundente frente a la estimulación tanto con LPS como con flagelina y Poly IC como se presentó en el Capítulo 1. En estos ensayos sólo fue medida la inducción génica de ciertos marcadores innatos y aunque se encontraron algunas diferencias sutiles en los perfiles inducidos por cada uno de ellos, no puede establecerse una correlación directa con el efecto de los agonistas sobre la infección. Por otra parte, en estos estudios no se ha evaluado la activación de mecanismos efectores epiteliales como la producción de péptidos anti-microbianos o la producción de radicales libres del oxígeno y los perfiles de activación producidos por cada agonista. Así, es posible que a pesar de que el LPS y la flagelina promueven la activación epitelial, los mecanismos efectores inducidos presenten ciertas diferencias en las cuales radiquen las diferencias observadas.

Otros agentes celulares pueden ser responsables de la resistencia frente a *B. pertussis*. Como se ha observado en el Capítulo 2 de esta tesis, existe un reclutamiento temprano de neutrófilos en respuesta a la infección siendo la magnitud de este efecto dependiente de la señalización de TLR-4. Aunque algunos trabajos muestran que esta población no es relevante para el control de *B. pertussis* en nuestros estudios los neutrófilos contribuyen significativamente a la eliminación bacteriana (Capítulo 2). Por otra parte, hemos visto que cada uno de los agonistas promueve el reclutamiento de neutrófilos al espacio

bronquioalveolar al ser administrados en ausencia de *B. pertussis* sugiriendo nuevamente, la ausencia de correlación entre la respuesta encontrada y la eliminación bacteriana. Mientras que LPS y flagelina presentaron un comportamiento similar en la cinética de reclutamiento neutrofílico, Poly IC no mostró un aumento estadísticamente significativo de neutrófilos de manera temprana (Capítulo 1). Sin embargo, el número absoluto de células reclutadas por cada agonista no fue evaluado, por lo que no se puede concluir en forma contundente acerca de este aspecto. Por otro lado, cabe recordar que se ha descrito la capacidad de *B. pertussis* de retrasar el reclutamiento temprano de neutrófilos a través de la acción de la toxina pertussis, uno de sus factores de virulencia. En nuestro ensayo no hemos analizado el reclutamiento promovido por cada tratamiento (agonista + *B. pertussis*) y es posible que los agonistas no sean capaces de revertir los efectos de la toxina pertussis en forma similar por lo que los perfiles de reclutamiento podrían ser diferentes de aquellos señalados en el Capítulo 1.

En resumen, el trabajo presentado en este capítulo muestra que la administración de LPS al momento de la infección por *B. pertussis*, facilita la resistencia de la mucosa respiratoria a este patógeno. Estos efectos no se deben meramente al desarrollo de una respuesta innata que supera en magnitud y cinética a la establecida por la infección misma sino que necesita además características específicas que se presentan por la activación de TLR-4 y no de otras vías TLR como se ha demostrado aquí mediante el empleo de agonistas de TLR-3 y de TLR-5. Por otra parte, el empleo de LPS proveniente de distintos microorganismos demostró que los efectos observados no son exclusivos del LPS de *B. pertussis* sino que son inherentes a la señalización a través de TLR-4. Así niveles equivalentes de disminución de la carga bacteriana fueron obtenidos para el LPS de *B. pertussis* y el LPS de *E. coli* empleado en la caracterización de la respuesta de la mucosa respiratoria a la activación de TLR-4.

La determinación de los mecanismos inducidos por LPS responsables de la disminución de la carga bacteriana así como la determinación de los aspectos cinéticos de establecimiento de la respuesta tanto como el marco temporal en que es posible activar TLR-4 y promover respuestas significativas de resistencia a

este patógeno serán objeto del trabajo de tesis doctoral de otro de los integrantes del grupo de trabajo de la Doctora D. Hozbor.



Capítulo 4

Empleo de agonistas TLR como adyuvantes mucosales en formulaciones acelulares frente a *B. pertussis*: capacidad de inducir inmunidad protectora

INTRODUCCION

Como hemos mencionado la tos convulsa o pertussis es en la actualidad una patología resurgente a pesar de la alta cobertura de vacunación, siendo ésta una de las enfermedades inmunoprevenibles menos controlada. Asociado a este nuevo status epidemiológico también ha habido un cambio de la población susceptible: ahora adolescentes y adultos pueden ser afectados. En la mayoría de los casos, estos individuos presentan una historia previa de vacunación y/o infección indicando que la inmunidad conferida no es duradera capaz de infectar personas que. Esta situación plantea nuevos desafíos para el control de la enfermedad puesto que representa un aumento sustancial de la población que sirve como fuente de diseminación de este patógeno al grupo etario más vulnerable, representado por los niños no inmunizados o con inmunidad incompleta para ser protegidos.

En este contexto epidemiológico, se vuelve de interés la búsqueda de nuevas alternativas vacunales. El hallazgo de formulaciones con mejor capacidad de generar una inmunidad protectora que sea sostenida durante un rango temporal más amplio y que pueda conferir protección frente a la enfermedad causada por cepas divergentes es sumamente atractivo como una herramienta de mayor efectividad a la hora de controlar la incidencia de la enfermedad y la mortalidad infantil.

A pesar de la complejidad de *B. pertussis*, con sus múltiples factores de virulencia y su gran capacidad inmunomodulatoria, es posible esbozar algunas alternativas para el diseño racional de nuevas vacunas frente a este patógeno. En primer término, podemos señalar los aspectos relativos a la elección de la vía de inmunización. Este aspecto influye sobre la naturaleza y magnitud de la respuesta inducida. La inmunización sistémica y la inmunización mucosal presentan características diferenciales tanto en los mecanismos efectores desencadenados

como en su redistribución anatómica (Neutra & Kozlowski, 2006; Srivastava et al., 2008). Se ha observado que la vacunación por vía mucosal se distingue de la sistémica en su capacidad de inducir el direccionamiento de células inmunes efectoras al compartimento mucosal siendo la inmunización local, en buena parte de los casos, la mejor forma de inducir una respuesta inmune efectiva en una mucosa dada (Jan Holmgren & Czerkinsky, 2005; J.-B. Sun, Czerkinsky, & Holmgren, 2010). Asimismo, este tipo de inmunización promueve el desarrollo de mecanismos efectores específicos, propios de la mucosa, los cuales son pobremente inducidos a través de la vía parenteral. Por otra parte, la inmunización mucosal también es capaz de inducir mecanismos de defensa a nivel sistémico que pueden tener alguna contribución al control microbiano según el patógeno dado (Premier, Jacobs, Lofthouse, Sedgmen, & Meeusen, 2004; Strindelius, Filler, & Sjöholm, 2004; Vujanic et al., 2010; Zuercher et al., 2006).

La inmunización mucosal presenta una ventaja adicional sobre la parenteral y es que presenta mayor potencialidad no sólo para disminuir el riesgo de desarrollar las formas severas de la patología sino además para prevenir la infección. Así, se ha observado que la inmunización intranasal en el modelo murino, empleando PspA (la proteína A de superficie de neumococco) o PotD (proteína transportadora de poliaminas D) no sólo protege del desarrollo de la patología pulmonar y sistémica causada por *S. pneumoniae*, sino además confiere protección duradera frente a la colonización nasofaríngea. Este último aspecto depende de los mecanismos efectores mucosales más que de aquellos inducidos a nivel sistémico (P. Shah, Briles, King, Hale, & Swiatlo, 2009; H. Y. Wu, Nahm, Guo, Russell, & Briles, 1997). De este modo, la inmunización mucosal parece ser una alternativa interesante para disminuir el reservorio de un agente infeccioso dado y su transmisión dentro de la población. Este aspecto es sumamente interesante en el marco de la infección por *B. pertussis* y el control de la tos convulsa. La inmunización mucosal, y en particular la intranasal, se presenta así como una alternativa atractiva en el marco del diseño de nuevas formulaciones vacunales anti-pertussis.

En cuanto a la propia formulación vacunal también es posible delinear estrategias basadas en el hecho de que la infección natural por *B. pertussis*, al ser resuelta por el huésped, genera una inmunidad protectora. De acuerdo a ello, una vacuna capaz de mimetizar la infección natural activando las vías inmunológicas

que resultan de relevancia para su control, debería presentar una buena eficacia. En el diseño de formulaciones acelulares esto puede ser conseguido mediante el empleo de agonistas TLR, dado que, como hemos visto, estos receptores tienen un rol fundamental en los eventos de activación de la respuesta inmune determinando sus características y el direccionamiento de la respuesta adaptativa. Resultados mostrados en capítulos anteriores indican la importancia de la activación de la vía de TLR4 en la inducción de la defensa anti-pertussis. De acuerdo a ello, es posible suponer que la activación de TLR-4 durante la administración de un antígeno vacunal de elección contribuirá a la generación de una respuesta protectora frente al desafío con el patógeno.

El objetivo de este capítulo es analizar en forma comparativa el impacto de la activación de las tres vías TLR escogidas TLR-3, TLR-4 y TLR-5 en la inducción de una respuesta inmune adaptativa capaz de conferir protección frente al desafío intranasal con *B. pertussis*. Para ello realizaremos ensayos de inmunización en los que un antígeno vacunal será administrado en combinación con Poly IC, LPS y flagelina por vía intranasal. De acuerdo a los resultados encontrados previamente esperamos que la activación de TLR-4 al momento de la administración del antígeno sea capaz de generar inmunidad protectora. Asimismo, el estudio comparativo de las respuestas inmunes desarrolladas por la activación de las tres vías y su correlación con los efectos sobre la colonización bacteriana resulta de utilidad a fin de discriminar cuáles son las características de respuesta adaptativa que deben ser inducidas para conferir protección frente a *B. pertussis*.

Ante la dificultad de obtener antígenos proteicos purificados como los empleados en las formulaciones vacunales acelulares, el antígeno que emplearemos serán vesículas de membrana externa de *B. pertussis* (OMV). Este es un antígeno complejo que contiene diversos inmunógenos proteicos de dicho patógeno, entre ellos parte de los factores de virulencia (R. Roberts et al., 2008). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado previamente que las OMV tienen capacidad de inducir inmunidad protectora al ser administradas por vía intranasal en el modelo murino de protección (R. Roberts et al., 2008). Para los ensayos aquí presentados trabajamos con una formulación de OMVs que contienen menor relación LPS: proteína (de aquí en más denominadas como OMV_{low}) que las naturalmente producidas por la bacteria.

RESULTADOS

Dado que a lo largo de este trabajo hemos observado que la activación de TLR-4 es capaz de inducir eventos de la respuesta innata que facilitan el control de la infección y que tal característica no es compartida con la activación de TLR-3 o TLR-5, en este capítulo decidimos comparar si lo mismo ocurre respecto de la inducción de una respuesta adaptativa que confiera protección en ensayos de inmunización por vía mucosal. Se realizaron ensayos preliminares en los que se definió un procedimiento de extracción que permitió minimizar el contenido de LPS en la preparación del antígeno vacunal. Una vez optimizado este procedimiento se realizaron ensayos de inmunización a fin de determinar la dosis de antígeno adecuada. La misma fue escogida de forma tal de limitar el efecto protector propio del antígeno, a fin de poder valorar la contribución del empleo de cada uno de los agonistas innatos escogidos cuando son administrados con el mismo. De acuerdo a los resultados obtenidos se definió el siguiente protocolo experimental: animales Balb/c recibieron dos inmunizaciones intranasales con OMV low (3 µg) en combinación con 1µg de LPS de *B. pertussis*, 1µg de flagelina o 50 µg de Poly IC. Como control se emplearon dos tratamientos: la inoculación con PBS estéril y la inoculación del antígeno en ausencia de agonistas TLR. Las inmunizaciones estuvieron separadas por 14 días y el desafío fue realizado 14 días después de la segunda inmunización. La respuesta a cada tratamiento fue evaluada por determinación de la carga bacteriana a nivel pulmonar a día 5 post-desafío (Figura 4.1).

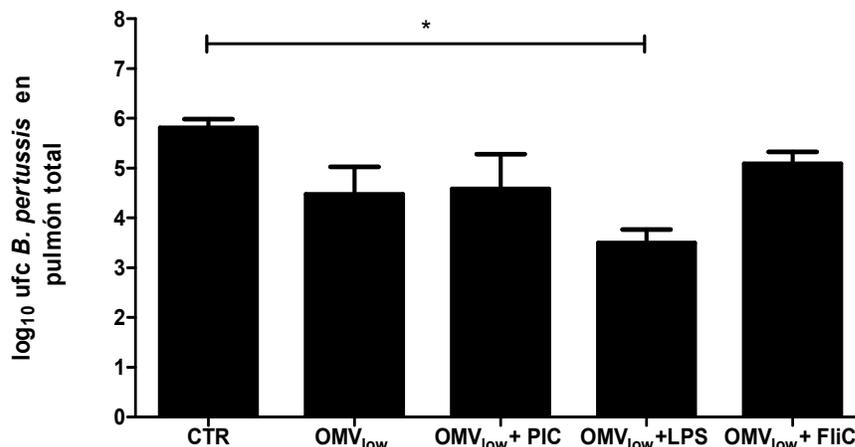


Figura 4.1: Efecto adyuvante de la señalización TLR en ensayos de inmunización intranasal frente a *B. pertussis*.

Los animales (Balb/c) recibieron dos inmunizaciones a día 0 y 14 y a día 28 fueron desafiados por vía intranasal con 10^6 UFC de *B. pertussis*. Cinco días post-desafío la carga bacteriana pulmonar fue evaluada por recuento de las UFC presentes en pulmón total. Los valores representan los promedios de Log₁₀ CFU encontradas \pm SEM para cada grupo. Por cada condición fueron empleados 5 ratones. Se muestran los resultados de dos experimentos realizados.

FliC: flagelina, PIC: Poly IC.

* Diferencias significativas respecto del CTR, $p < 0.05$, Test de Tukey.

Los tratamientos con distintos agonistas TLR tuvieron un comportamiento diferencial en la inducción de protección (Figura 4.1), de manera análoga a lo observado en capítulos anteriores. Aunque el tratamiento con el antígeno vacunal pareciera tener un efecto en sí mismo las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto del tratamiento control con PBS. Por su parte, ni la inclusión de agonistas de TLR-3 mediante el empleo de Poly IC ni de TLR-5 mediante el uso de flagelina presentaron efecto sobre los niveles de bacteria en pulmón. Por el contrario, la estimulación de TLR-4 durante la administración del antígeno vacunal a la mucosa respiratoria ocasionó una reducción de aproximadamente dos órdenes de magnitud en la carga bacteriana respecto del tratamiento con PBS estéril presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Puesto que el empleo de agonistas innatos conlleva la activación de vías inflamatorias, esto puede determinar la aparición de efectos tóxicos. De acuerdo a ello, como parte de la caracterización de los tratamientos evaluamos su toxicidad

mediante el test de ganancia de peso. Los animales fueron observados durante los 7 días posteriores a la primera inmunización. Las variaciones registradas en el peso corporal para cada tratamiento se muestran en la Figura 4.2.

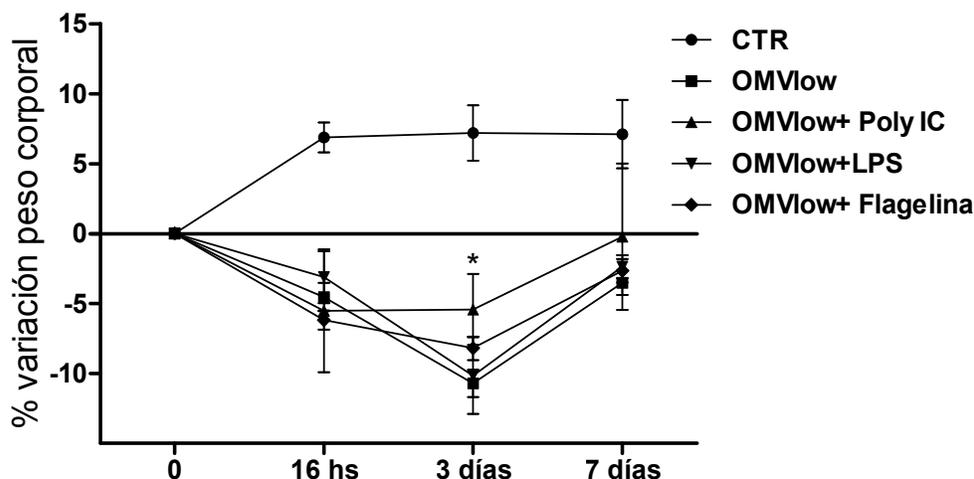


Figura 4.2: Evaluación de la toxicidad de los tratamientos vacunales: Test de ganancia de ganancia de peso corporal.

El seguimiento individual del peso corporal de los ratones correspondientes a todos los grupos fue determinado antes (tiempo 0) y después del tratamiento, a los tiempos indicados. Las curvas muestran el porcentaje de variación del peso corporal para cada condición respecto del peso inicial para cada grupo.
Diferencias significativas día 3 vs día 0 para OMV_{low}; OMV_{low} + LPS; OMV_{low}+ Flagelina.
*p< 0,01 test T.

De acuerdo a la OMS, un tratamiento se considera no tóxico cuando supera las siguientes condiciones: a) a día 3 post-tratamiento el peso corporal de los ratones pertenecientes al grupo vacunado es equivalente o superior al inicial; b) al día 7 post-tratamiento el peso no debe ser inferior al 60% del peso del grupo control y c) la mortalidad debida al tratamiento tiene que ser inferior al 5%.

La comparación pareada mostró que todos los tratamientos presentaron disminuciones estadísticamente significativas del peso corporal observado a día 3 post-administración respecto del peso inicial. En ninguno de los casos la adición de un agonista TLR produjo una disminución de peso superior a la observada para el tratamiento que contenía únicamente el antígeno. Las variaciones de peso encontradas van desde aproximadamente el 5% para OMV low + Poly IC hasta alrededor de un 10% para OMVlow y OMVlow+ LPS, con valores cercanos al 8% para OMVlow+Flagelina. A pesar de estos hallazgos, los animales

correspondientes a cada uno de los tratamientos recuperó el peso corporal inicial al día 7 post-inmunización siendo en todos los casos superior al 60% del peso correspondiente al grupo que recibió PBS. En forma adicional, no se observó mortalidad en respuesta a ninguno de los tratamientos administrados. De acuerdo a estos resultados, los distintos tratamientos cumplen con los requisitos de seguridad establecidos por la Organización Mundial de la Salud.

DISCUSIÓN

Las vacunas disponibles en la actualidad contra la tos convulsa han sido efectivas para controlar la transmisión de su agente etiológico, *B. pertussis*, y disminuir la mortalidad infantil. Sin embargo, la enfermedad continua representando un problema para la salud pública y es considerada hoy en día una enfermedad resurgente. Esta situación, plantea la necesidad de proveer de nuevas estrategias vacunales con mejores capacidades inmunogénicas que confieran protección a largo plazo y que permitan simplificar los esquemas de inmunización. Este último aspecto resulta relevante a fin de incrementar los porcentajes de cobertura poblacional incluso en zonas donde los recursos humanos y económicos son insuficientes (Berbers, de Greeff, & Mooi, 2009; Humiston & Rosenthal, 2005; Marzouqi et al., 2010; Jann Storsaeter & Wolter, 2006).

Una estrategia pertinente es la inmunización intranasal puesto que, en general, tiene una mejor performance respecto de la inmunización parenteral para generar mecanismos efectores y de memoria inmunológica en la mucosa respiratoria, el sitio al cual está restringida la infección por *B. pertussis*. Sólo pocas de las estrategias vacunales en estudio contemplan esta vía de inmunización siendo uno de los ejemplos la inmunización con una cepa atenuada de *B. pertussis* (Mielcarek et al., 2006). Sin embargo, el empleo de formulaciones acelulares por esta vía está limitada por la ausencia de adyuvantes mucosales licenciados. Como hemos visto, se ha probado que la activación de receptores de reconocimiento de patógenos es un buen mecanismo inmunopotenciador por lo que varios agonistas TLR están siendo estudiados actualmente con el fin de

analizar su potencial adyuvante en contextos específicos (Duthie et al., 2011). Sin embargo, la elección racional de un agonista TLR u otro tipo de agonista, requiere el conocimiento de aquellas vías que son relevantes en el marco de la infección. De acuerdo a lo mostrado en los distintos capítulos de esta tesis y a la bibliografía existente, TLR-4 parece ser un receptor fundamental para el desarrollo de una respuesta inmune capaz de controlar la infección causada por *B. pertussis*.

En este capítulo, empleamos los agonistas de TLR-3, TLR-4 y TLR-5 como adyuvantes intranasales en combinación con el antígeno complejo de *B. pertussis* OMV_{low}. Como hemos observado en el Capítulo 1, cada uno de ellos es capaz de generar una respuesta innata activa en la mucosa respiratoria al ser administrados por vía intranasal. Las dosis empleadas para cada agonista en tales estudios fueron las mismas que las utilizadas en los ensayos de inmunización y permitieron observar que tanto LPS como flagelina y Poly IC son capaces de estimular la respuesta inmune en el tracto respiratorio inferior. Así, todos generaron la activación de distintos tipos celulares, entre ellas las células epiteliales y los macrófagos alveolares, promoviendo la expresión de citoquinas y quimoquinas y el reclutamiento leucocitario marcando de esta manera la inducción y orquestación de la respuesta innata local. Además, los ensayos realizados en el Capítulo 3, mostraron que los tres agonistas son capaces de activar la respuesta mucosal aún en presencia de la capacidad inmunomoduladora de *B. pertussis*. Así, mientras la infección en sí misma no produjo la expresión de marcadores pro-inflamatorios, la administración de los agonistas al momento de la infección sí lo hizo. Todos estos resultados ponen de manifiesto la actividad inmunoestimuladora de cada uno de los agonistas TLR, evaluados señalando su potencialidad como adyuvantes mucosales. De hecho, tanto Poly IC como Flagelina han sido evaluados como adyuvantes intranasales frente a agentes patogénicos diversos, que incluyen no sólo el tipo de microorganismo al que se asocia cada agonista (virus/bacterias flageladas respectivamente) sino también otros tipos de agentes infecciosos. Así, por ejemplo, la combinación de Poly IC con antígenos patógeno-específicos ha mostrado ser protectora frente a infecciones virales por el virus de influenza como así también frente a *S. pneumoniae* (Ezoe et al., 2011). Flagelina por su parte, representa un adyuvante mucosal de creciente interés dado su carácter proteico y la posibilidad de generar proteínas de fusión conteniendo en una misma molécula

el antígeno de elección y el adyuvante. Este aspecto es relevante puesto que facilitaría la captación y presentación antigénica necesarias para la inducción de respuesta adaptativa (Letran et al., 2010), mejorando así, la performance de la respuesta generada. Este agonista TLR ha sido empleado con buenos resultados en la generación de inmunidad protectora antigénica específica en modelos infecciosos de agentes microbianos diversos: bacterias, parásitos e incluso virus (Bargieri et al., 2008; Hong et al., 2012; Nguyen, Kim, Kim, Lee, & Rhee, 2011). Sin embargo, a pesar de estas evidencias ni la administración de Poly IC ni de flagelina en combinación con el antígeno vacunal empleado permitieron conferir protección frente a *B. pertussis* en los ensayos realizados (Figura 4.1). En forma similar, ninguno de dichos agonistas fue capaz de inducir de mecanismos innatos que faciliten el control temprano de la infección, como fue apreciado en el Capítulo 3. Por el contrario, y en concordancia con lo observado previamente en el contexto de esta tesis, el empleo de LPS y la consecuente activación de TLR-4 resultó la combinación más eficiente a la hora de generar protección, lo que se evidenció como una disminución de la carga bacteriana pulmonar luego del desafío intranasal con *B. pertussis*. Si bien el antígeno empleado en estos ensayos es un antígeno complejo, en el cual varios agonistas de PRR pueden ser encontrados, la administración de este antígeno per-se no fue capaz de conferir protección, a diferencia de lo que ocurre cuando se adiciona un agonista de TLR-4 (Figura 4.1). En coincidencia con los resultados observados, ensayos preliminares empleando otros antígenos de *B. pertussis* y LPS de *E. coli* como agente adyuvante muestran un efecto comparable al obtenido en los ensayos presentados en este capítulo. En forma adicional, la realización de ensayos en los que se administró LPS de *B. pertussis* en ausencia de antígeno vacunal indican que dicho tratamiento no tiene efectos significativos sobre el control de la carga bacteriana. Estos hallazgos muestran que el resultado encontrado en el ensayo presentado en la Figura 4.1 refleja el efecto de la activación de TLR-4 y no el posible comportamiento antigénico del LPS de *B. pertussis*.

En forma similar a lo descrito en este capítulo, otras evidencias involucran a TLR-4 en la inducción de inmunidad protectora frente a este patógeno respiratorio. Así, tal como sugieren ensayos comparativos entre animales TLR-4 competentes y TLR-4 deficientes, dicho receptor es necesario para conferir

protección en respuesta a la administración parenteral de la vacuna celular y, en menor medida, de la vacuna acelular (S. Banus et al., 2008). De manera análoga, la adición de un agonista de TLR-4 a la formulación acelular permite mejorar los niveles de protección obtenida frente al desafío intranasal cuando es administrada por vía parenteral (Geurtsen et al., 2008). Sin embargo, la relación entre la activación de ésta u otras vías TLR en la mucosa respiratoria durante la inmunización intranasal y la protección frente a *B. pertussis* no ha sido analizada previamente.

En este capítulo hemos encontrado que la activación de TLR-4 es clave para la protección frente a *B. pertussis* en respuesta a la inmunización intranasal con antígenos específicos, resaltando la potencialidad del empleo de sus agonistas en formulaciones acelulares anti-pertussis con el fin de mejorar su eficacia. Sin embargo, no hemos podido profundizar en las propiedades de la respuesta adaptativa establecida y los mecanismos por los cuales tales efectos son conseguidos. Esto se ha debido a la falta de disponibilidad de un antígeno apropiado durante el período en que esta tesis fue llevada a cabo. La OMV/OMV_{low}, por sus características, dificulta la realización de ensayos destinados a evaluar tanto el desarrollo de la respuesta celular como el de la respuesta humoral. En este sentido, en los estudios preliminares presentados en este capítulo se han realizado mediciones de la respuesta humoral con el fin de determinar tanto la magnitud como el perfil de la misma (Th1/Th2) no habiendo encontrado resultados que diferencien los tratamientos de los controles realizados. Si bien hemos efectuado pruebas empleando otros antígenos recombinantes de los que dispone el grupo de trabajo, estas proteínas no mostraron las características antigénicas apropiadas para lograr protección. En la actualidad se está trabajando en tales aspectos con la finalidad de disponer de un antígeno proteico purificado que resulte adecuado para emplear en estudios de caracterización de la respuesta adaptativa. Con la intención de determinar cuáles son los aspectos relevantes de la misma, resulta de utilidad el análisis en forma comparativa de las respuestas desencadenadas por TLR-4 y los otros receptores escogidos en este trabajo, TLR-3 y TLR-5. En este formato de estudio, el hallazgo de diferencias entre las respuestas promovidas por cada receptor y su correlación con el efecto obtenido sobre la protección posiblemente contribuya a discriminar qué tipo de respuesta es necesaria y suficiente para conferir protección frente a

B. pertussis. Puesto que *B. pertussis* es un patógeno complejo, con múltiples mecanismos patogénicos, no ha sido posible hasta la actualidad definir tal respuesta y no se ha encontrado aún un correlato de protección, lo cual dificulta la evaluación de la eficacia de nuevos diseños vacunales.

En cuanto a las diferencias observadas en la capacidad de los tres agonistas empleados de inducir mecanismos de protección frente a *B. pertussis* muchos factores podrían estar contribuyendo. Como hemos mencionado en la introducción de este trabajo, los receptores TLR pueden modular tanto la inmunidad celular como la inmunidad humoral influyendo sobre el perfil al igual que sobre la magnitud, calidad y persistencia de dichas respuestas. Los mecanismos por los que actúan, aunque no completamente dilucidados, parecen ser varios pasando por la activación y capacitación de las células dendríticas hasta su accionar directo sobre las células dicha respuesta: los linfocitos T, efectores y reguladores, y los linfocitos B (Iwasaki & Medzhitov, 2010; Kasturi et al., 2011; Padovan, Landmann, & De Libero, 2007; Pasare & Medzhitov, 2005a, 2005b). Sin embargo, aún no se conoce de qué manera distintos receptores TLR participan y proveen de características determinadas a cada uno de los eventos moleculares que impactan en las propiedades de la respuesta desarrollada. Así, el estudio comparativo de la respuesta desencadenada por los tres receptores TLR en relación a la protección frente a *B. pertussis* también puede contribuir a determinar cuáles son las diferencias en los mecanismos de acción desencadenados por distintos receptores. Este conocimiento contribuiría a la comprensión de cómo es posible instruir características particulares de respuesta inmunológica adaptativa a través de distintas modulaciones de la inmunidad innata brindando herramientas para la elección racional de estos agonistas de acuerdo al sistema en evaluación.

En relación a TLR-4 y su vinculación con la protección anti-pertussis se ha observado el impacto de la señalización a través de dicho receptor sobre la respuesta celular y humoral frente a *B. pertussis*. Las deficiencias en la protección proporcionada por la vacuna celular en animales TLR-4 deficientes ha sido asociada a la generación de respuesta mixta Th1/ Th17 en donde uno de los mecanismos efectores de IL-17 sería facilitar de manera significativa los mecanismos microbicidas macrofágicos (Higgins et al., 2006). Por su parte, estudios en humanos han señalado que la presencia de determinados

polimorfismos en el gen de TLR-4 se correlaciona con menores niveles de anticuerpos frente a la toxina pertussis en respuesta a la inmunización con la vacuna celular, señalando la vinculación de dicho receptor con la generación de la respuesta humoral (S. Banus, Bottema, et al., 2007).

Entre las perspectivas de los estudios presentados en este capítulo se encuentra la repetición de los ensayos de inmunización comparativos empleando antígenos proteicos que permitan evaluar la inmunidad adaptativa desencadenada por los distintos agonistas TLR tanto a nivel mucosal como sistémico. Para ello han empezado a realizarse ensayos preliminares empleando como antígenos las fimbrias 2 y 3 purificadas a partir de cultivos de *B. pertussis*. En los mismos se ha determinado la dosis antigénica de elección y se ha evaluado el efecto de la activación de TLR-4 mediante el empleo de LPS de *E. coli* como adyuvante. Los resultados de estos estudios confirman los resultados encontrados con OMVlow. Así, esperamos que el empleo de tales antígenos en combinación con los distintos agonistas TLR nos permitan discriminar cada uno de los aspectos señalados anteriormente respecto de la respuesta protectora frente a *B. pertussis*.

Si bien los resultados mostrados en este capítulo son preliminares forman parte de los primeros estudios en el marco de la inmunización frente a *B. pertussis* que muestran la relevancia de TLR-4 en la inmunización mucosal.



Discusión General y Conclusiones



A lo largo de la historia, el control e incluso la prevención de las enfermedades infecciosas ha representado un desafío constante para la población. A tal fin han sido implementadas diversas medidas. Entre ellas, la mejora de las condiciones sanitarias y el desarrollo de las vacunas, han representado herramientas efectivas para disminuir la morbilidad y mortalidad asociadas a diversos tipos de patógenos. La mayoría de las vacunas existentes en la actualidad han sido desarrolladas de manera empírica, desconociendo o sólo conociendo parcialmente, los mecanismos por los cuales son capaces de generar inmunidad protectora, a pesar de lo cual, han resultado notablemente efectivas.

Sin embargo, aún existen diversos patógenos que representan amenazas considerables para la salud pública para los cuales o bien aún no existen vacunas, como en el caso de la malaria o el HIV, o bien, las vacunas existentes no son lo suficientemente adecuadas para controlar la situación epidemiológica del agente infeccioso al cual están destinadas, como es el caso de *S. pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *B. pertussis*, etc. Frente a estas situaciones, la profundización y utilización del conocimiento existente sobre la interacción patógeno huésped y el funcionamiento del sistema inmune, permitiría delinear estrategias de vacunación que resulten más efectivas. Asimismo, el desarrollo de diversas metodologías ha aportado significativamente a la vacunología, la cual ha crecido enormemente en los últimos años brindando hoy en día la posibilidad de contemplar diversos abordajes a fin de diseñar estrategias efectivas.

Como hemos señalado anteriormente, los receptores de la inmunidad innata son determinantes para la respuesta antimicrobiana, puesto que no sólo permiten activar mecanismos de contención temprana sino que además inducen y direccionan la respuesta adaptativa necesaria para la resolución de la infección y el establecimiento de una inmunidad que limite la re-infección (Iwasaki & Medzhitov, 2010)

Si bien hay distintas familias de receptores innatos, los receptores TLR parecen ser actores claves para la activación de la inmunidad innata por su vinculación con la inmunidad adaptativa. Es por ello que sus agonistas han

adquirido un lugar especial en el campo del desarrollo vacunal, en donde aparecen como buenos candidatos a ser adyuvantes para el diseño de formulaciones acelulares. Asimismo, estos compuestos resultan de interés puesto que permiten no sólo la activación de la respuesta inmune sino además su direccionamiento. De hecho se conoce hoy en día que los receptores TLR delimitan las características de la respuesta desarrollada influyendo sobre su intensidad y calidad así como también sobre su duración y su perfil (Bali Pulendran & Ahmed, 2006). Una prueba adicional a favor de estos compuestos proviene de estudios recientes que han empezado a señalar la asociación entre la inmunogenicidad de ciertas vacunas con la funcionalidad TLR. Así, una de las vacunas más exitosas, la de la fiebre amarilla, requiere de la señalización a través de varios receptores para conferir protección (Querec et al., 2006). Sin embargo, como hemos señalado, seleccionar el agonista adecuado requiere de conocer cuáles son las vías de reconocimiento que participan significativamente en el establecimiento de la defensa frente al patógeno en cuestión.

En este trabajo de tesis hemos escogido la infección por *B. pertussis* para poder establecer cómo el estudio de la infección posibilita el diseño de estrategias vacunales que resulten efectivas.

Teniendo en cuenta que la resolución de la infección causada por dicho patógeno confiere inmunidad protectora en este trabajo exploramos la posibilidad de mejorar las estrategias vacunales anti-pertussis mediante el empleo de adyuvantes y vías de inmunización que permitan emular la infección en el proceso de vacunación.

En este sentido, se escogió la vía intranasal como ruta de inmunización puesto que permite direccionar los mecanismos efectores al sitio de ingreso del microorganismo. Esto conceptualmente serviría para prevenir el desarrollo de las formas severas de la patología y limitar las posibilidades de infección un aspecto, que de conseguirse, es sumamente interesante para *B. pertussis* con el fin de disminuir la transmisión dentro la población. En forma adicional, la vacunación por vía mucosal resulta de interés en términos generales por su modo de aplicación y las ventajas que presenta al respecto sobre la vacunación parenteral, tales como usar dispositivos de bajo riesgo de manipulación y demandar menor grado de entrenamiento que debe recibir la persona que aplica la vacuna.

Para evaluar cuál/cuáles podrían ser los adyuvantes adecuados se decidió analizar la contribución de distintos receptores TLR en la defensa del huésped frente a la infección por *B. pertussis*. Empezamos estudiando la relevancia de TLR-4 en el establecimiento de la inmunidad innata frente a la infección, un receptor que al momento de inicio de esta tesis empezaba a aparecer en la literatura como una vía significativa para el control de este patógeno.

La metodología empleada (análisis del perfil transcripcional por microarreglos de AND / TLDA) así como la cinética escogida (2, 6 y 24h) en estos estudios fueron condiciones fundamentales para determinar la relevancia de dicho receptor y además para discriminar cuáles son los eventos TLR-4 dependientes que podrían estar participando en el control de la infección, un aspecto que no ha sido claramente delineado en otros trabajos. Así, encontramos que la funcionalidad de TLR-4 es esencial para la detección temprana de *B. pertussis* y que su deficiencia condiciona tanto la cinética de establecimiento de la respuesta inmune como sus características. En este sentido, pudimos encontrar que los niveles de varios marcadores pro-inflamatorios se ven disminuidos ante la ausencia de señalización TLR-4. Entre ellos, las quimoquinas reclutadoras de neutrófilos y citoquinas claves de la defensa antimicrobiana como IL-6, TNF α e IL-1 β . Estos tres mediadores participan activamente de la defensa frente a *B. pertussis* y su ausencia ha sido asociada a la desregulación de distintos mecanismos de control tanto innatos como adaptativos que se establecen en respuesta a la infección (Dunne et al., 2010; X. Zhang, Goel, et al., 2011; X. Zhang, Hester, et al., 2011). Posiblemente, la alteración tanto en la cinética de producción como en los niveles de expresión de estos tres marcadores contribuya a la sensibilidad del animal TLR-4 deficiente frente a la infección por *B. pertussis*.

Por su parte, también pudimos observar que la magnitud y la cinética de reclutamiento de neutrófilos en respuesta a la infección están condicionadas por la funcionalidad de TLR-4 a través del control de la expresión de distintos quimioattractantes de esta población leucocitaria. Además, en nuestro contexto experimental, los neutrófilos participan en la eliminación de la bacteria como señalan los ensayos de depleción realizados, siendo uno de los mecanismos efectores TLR-4 dependientes que permiten explicar la susceptibilidad del animal TLR-4 deficiente.

Por último estos estudios indicaron que la funcionalidad de TLR-4 no es necesaria para la inducción de la inmunidad mediada por interferón, cuya citoquina IFN γ es vital para la defensa del huésped, confinando la infección al tracto respiratorio y previniendo su diseminación. Nuestros resultados indican que este proceso se instala durante las primeras 24h de la infección a través de vías que permiten el reconocimiento de *B. pertussis* una vez que el reconocimiento inicial mediante TLR-4 ha ocurrido (luego de las 2h post-infección). Asimismo, estos hallazgos sugieren que la susceptibilidad de los animales TLR-4 deficientes a la infección por *B. pertussis* no radica en la deficiencia de la inmunidad mediada por interferón. En términos generales estos ensayos permitieron distinguir a TLR-4 como un receptor fundamental para la detección temprana de *B. pertussis* y el establecimiento de la respuesta inmune.

A continuación se analizó cómo la activación de distintas vías TLR es capaz de inducir mecanismos que permitan controlar la infección por *B. pertussis*.

Para ello realizamos estudios de exacerbación de la inmunidad innata al momento de la infección y evaluamos su impacto sobre la carga bacteriana a las 24h post-infección. Las vías TLR evaluadas fueron TLR-4, TLR-3 y TLR-5. Estos dos últimos receptores fueron escogidos por poseer vías de señalización parcialmente compartidas con TLR-4 con lo cual podrían tener alguna participación en la inducción de mecanismos de control pertinentes sobre *B. pertussis*. Adicionalmente su evaluación podría permitir tener algún indicio sobre la implicación de las vías MyD-88 y TRIF sobre la defensa del huésped frente a este patógeno.

Los resultados de estos ensayos permiten realizar las siguientes afirmaciones. En primer término, podemos mencionar que estos estudios fueron los primeros en determinar que es posible, mediante la magnificación de la inmunidad innata, cambiar el curso de la infección por *B. pertussis* consiguiendo una disminución considerable de la carga bacteriana dentro de las primeras 24h de la infección. Esta es una situación de importancia en las infecciones respiratorias y ha sido recientemente demostrado por otros autores en otros modelos de infecciones respiratorias (S. E. Evans, Scott, et al., 2010; Tuvim et al., 2009).

En segundo término, las diferencias encontradas respecto del efecto de los distintos agonistas nos permitieron, a su vez, arribar a distintas conclusiones. Primero, que TLR-4 es un receptor clave para la activación de mecanismos bactericidas frente a *B. pertussis* puesto que sólo el tratamiento con LPS fue capaz de disminuir de manera significativa la carga bacteriana. Este resultado coincide con los hallazgos previos y remarca la importancia de los mecanismos desencadenados por este receptor innato en el control temprano de la infección. A su vez, sugiere que tanto la señalización MyD-88 dependiente como la TRIF dependiente son necesarias para inducir tales mecanismos, puesto que ni la activación de TLR-3 que emplea exclusivamente la vía TRIF dependiente ni la activación de TLR-5 que señala a través de MyD-88 fueron capaces de limitar la infección. Sin embargo también es posible que las diferencias observadas sean debidas a la existencia de una distribución diferencial de los tres receptores en la/las células que participan de los mecanismos microbicidas o bien, en aquellas células que dan señales claves de activación de tales mecanismos aunque estos sean llevados a cabo por otro tipo celular. Es posible que además de requerirse la señalización a través de MyD-88 y de TRIF, también sea necesario que esta señalización tenga lugar en un tipo celular específico, lo cual podrá tratar de dilucidarse cuando se tenga algún indicio sobre los mecanismos microbicidas involucrados.

Por otra parte, el efecto diferencial de los tres agonistas sobre la disminución de la carga bacteriana señala además la existencia de diferencias entre los mecanismos efectores desencadenados por TLR-3, TLR-4 y TLR-5. Esto también fue sugerido por los resultados presentados en el capítulo 1 en donde se caracterizó la respuesta de la mucosa respiratoria frente a la inoculación intranasal de sus respectivos agonistas. Sin embargo, las diferencias encontradas en tales ensayos fueron sutiles y no pudieron correlacionarse claramente con la respuesta obtenida sobre el control de la infección. En este sentido, profundizar la caracterización de las respuestas desencadenadas por cada uno de estos receptores resulta de interés para poder discriminar cuáles son los mecanismos efectores que median la eliminación de *B. pertussis*, un conocimiento que aún no está claramente establecido. De manera análoga, distinguir los mecanismos específicos desencadenada por cada uno de estos receptores puede contribuir

también a determinar qué tipo de respuesta es clave en otros contextos infecciosos donde tales receptores participen de la defensa del huésped.

Si bien estos ensayos han permitido determinar la importancia de distintas vías TLR en la defensa frente a *B. pertussis* también han dejado abiertos una serie de interrogantes. Por un lado, cuáles son los mecanismos celulares y moleculares por los cuales TLR-4 facilita la eliminación bacteriana. Por otro lado, evaluar las condiciones cinéticas de los efectos observados, esto es, cuál es la ventana temporal bajo la cual es posible estimular la inmunidad innata y conseguir disminuciones significativas de la carga bacteriana. Ambas condiciones podrían resultar de interés para el diseño de estrategias tanto terapéuticas como profilácticas frente a la infección por *B. pertussis*. La dilucidación de estos aspectos forma parte del trabajo de tesis de otro de los integrantes de este grupo de trabajo, el cual fue iniciado a partir de los resultados aquí presentados.

Finalmente, conociendo la participación de las distintas vías de reconocimiento en la elaboración de mecanismos de contención innatos anti-pertussis se procedió a evaluar cuál es la capacidad de cada una de esas vías para establecer una respuesta adaptativa que confiera protección. Para ello se realizaron ensayos de inmunización intranasal en los cuales el antígeno vacunal fue administrado con cada uno de los agonistas TLR en cuestión: LPS, flagelina y Poly IC. En concordancia con los resultados obtenidos previamente sobre la relevancia de los distintos TLR en el contexto de la infección, sólo la activación de TLR-4 en el protocolo de inmunización fue capaz de inducir una respuesta protectora frente a *B. pertussis*. Nuestros resultados, si bien preliminares, concuerdan con lo señalado por otros autores. En tales estudios habían observado una asociación entre la funcionalidad de TLR-4 y el desarrollo de inmunidad protectora en respuesta a esquemas de vacunación que empleaban la administración parenteral (S. Banus et al., 2008; Higgins et al., 2006). Sin embargo, los estudios presentados en este trabajo fueron los primeros en evaluar la relevancia de éste y otros receptores TLR en el contexto de la inmunización mucosal.

El conjunto del trabajo realizado señala la importancia de TLR-4 en la orquestación de la defensa frente a la infección por *B. pertussis* tanto para la

generación de mecanismos efectores innatos que establezcan una contención inicial como para direccionar una respuesta adaptativa que permita limitar la re-infección.

Por otra parte, dichos hallazgos ponen de manifiesto la vinculación existente entre inmunidad innata y la adaptativa remarcando la posibilidad de modelar la respuesta adaptativa a través de la manipulación de la inmunidad innata tal como fue sugerido previamente. En el caso de *B. pertussis* nuestros resultados indican la importancia de la activación de TLR-4 en los protocolos de vacunación y muestran la potencialidad del empleo de sus agonistas en las formulaciones acelulares existentes con el fin de mejorar su eficacia. Estos resultados están en concordancia con lo reportado por Geursten y col., quienes mostraron que la adición de un agonista de TLR-4 a la vacuna acelular mejora los niveles de protección conseguidos cuando la administración es por vía parenteral (Geurtsen et al., 2008). De acuerdo a los resultados encontrados, la incorporación de MLP, un agonista de TLR-4 licenciado para su uso en humanos (Casella & Mitchell, 2008), a las formulaciones existentes podría ser una alternativa plausible para obtener una vacuna apropiada frente a la tos convulsa en un plazo relativamente corto, puesto que cada uno de los componentes a emplear ya han sido licenciados limitando la extensión de los estudios clínicos que es necesario realizar para conseguir su aprobación.

Finalmente, podemos decir que a lo largo del desarrollo de esta tesis pudimos encontrar una prueba de concepto que sostiene la hipótesis planteada, enfatizando la utilidad del estudio de las vías de reconocimiento patogénico implicadas en un contexto infeccioso dado con el fin de desarrollar nuevas formulaciones vacunales o mejorar las existentes. Además, pudimos verificar que en caso de *B. pertussis*, es posible delinear una alternativa vacunal pertinente empleando adyuvantes y vías de inmunización que permitan mimetizar la infección aunque aún quedan por determinar los aspectos mecanísticos por los cuales la respuesta generada resulta protectora.

Perspectivas

Entre las perspectivas de los trabajos realizados en esta tesis se encuentra la repetición de los ensayos de inmunización empleando antígenos proteicos purificados que permitan evaluar las características de la respuesta adaptativa desencadenada por los distintos agonistas TLR empleados. Así, esperamos que el análisis en forma comparativa de la respuesta humoral y celular, tanto a nivel de la mucosa como a nivel sistémico, permita discriminar los mecanismos por los cuales la activación de TLR-4 es capaz de generar una inmunidad protectora frente a *B. pertussis*. Como hemos mencionado si bien existen algunos indicios, aún se desconocen las características de tal respuesta que son necesarias y suficientes para limitar la infección por dicho patógeno. De esta manera, cualquier contribución a la dilucidación de estos aspectos es de relevancia para el diseño de estrategias de inmunointervención frente a *B. pertussis*. Asimismo, esperamos poder relacionar los aspectos de la respuesta adaptativa protectora con los efectores finales que participan en la eliminación bacteriana.

Por otra parte, aún quedan diversos aspectos por discriminar respecto de la utilización de agonistas de TLR-4 en los protocolos de vacunación. En principio esperamos poder evaluar comparativamente los efectos adyuvantes de LPS frente al MLP con el fin de verificar la utilidad de este último y comprobar la ausencia de efectos tóxicos. Por otro lado, es de interés analizar si mediante el empleo de estos adyuvantes y el antígeno vacunal adecuado es posible conferir una protección duradera para lo cual deberán realizarse nuevos estudios de inmunización donde se evalúe la capacidad protectora a largo plazo.

Finalmente, otro aspecto de interés es la capacidad de conferir protección frente a las cepas divergentes de *B. pertussis* para lo cual la combinación de un agonista de TLR-4 con un antígeno apropiado podría resultar de utilidad.



Bibliografía

Bibliografia

- A Gaspari, A., Tyring, S. K., & Rosen, T. (2009). Beyond a decade of 5% imiquimod topical therapy. *Journal of drugs in dermatology*: JDD, 8(5), 467-74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19537370>
- Adam, H. J., Richardson, S. E., Jamieson, F. B., Rawte, P., Low, D. E., & Fisman, D. N. (2010). Changing epidemiology of invasive Haemophilus influenzae in Ontario, Canada: evidence for herd effects and strain replacement due to Hib vaccination. *Vaccine*, 28(24), 4073-8. doi:10.1016/j.vaccine.2010.03.075
- Adams, S. (2009). Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy*, 1(6), 949-64. doi:10.2217/imt.09.70
- Agnese, D. M., Calvano, J. E., Hahm, S. J., Coyle, S. M., Corbett, S. A., Calvano, S. E., & Lowry, S. F. (2002). Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *The Journal of infectious diseases*, 186(10), 1522-5. doi:10.1086/344893
- Akira, S. (2000). Toll-like receptors: lessons from knockout mice. *Biochemical Society transactions*, 28(5), 551-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11044373>
- Andreasen, C., & Carbonetti, N. H. (2008). Pertussis toxin inhibits early chemokine production to delay neutrophil recruitment in response to Bordetella pertussis respiratory tract infection in mice. *Infection and immunity*, 76(11), 5139-48. doi:10.1128/IAI.00895-08
- Andreasen, C., & Carbonetti, N. H. (2009). Role of neutrophils in response to Bordetella pertussis infection in mice. *Infection and immunity*, 77(3), 1182-8. doi:10.1128/IAI.01150-08
- Andreasen, C., Powell, D. a, Carbonetti, N. H., & Al., E. (2009). Pertussis toxin stimulates IL-17 production in response to Bordetella pertussis infection in mice. *PloS one*, 4(9), e7079. doi:10.1371/journal.pone.0007079
- Archer, K. a, Ader, F., Kobayashi, K. S., Flavell, R. a, & Roy, C. R. (2010). Cooperation between multiple microbial pattern recognition systems is important for host protection against the intracellular pathogen Legionella pneumophila. *Infection and immunity*, 78(6), 2477-87. doi:10.1128/IAI.00243-10
- Archer, K. a, Alexopoulou, L., Flavell, R. a, & Roy, C. R. (2009). Multiple MyD88-dependent responses contribute to pulmonary clearance of Legionella pneumophila. *Cellular microbiology*, 11(1), 21-36. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01234.x
- Armstrong, L., Medford, A. R. L., Uppington, K. M., Robertson, J., Witherden, I. R., Tetley, T. D., & Millar, A. B. (2004). Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(2), 241-5. doi:10.1165/rcmb.2004-0078OC
- Asahi-Ozaki, Y., Itamura, S., Ichinohe, T., Strong, P., Tamura, S.-I., Takahashi, H., Sawa, H., et al. (2006). Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 8(12-13), 2706-14. doi:10.1016/j.micinf.2006.07.018
- Ausiello, C M, Urbani, F., la Sala, A., Lande, R., & Cassone, A. (1997). Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infection and immunity*, 65(6), 2168-74. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=175299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ausiello, C M, Urbani, F., La Sala, A., Lande, R., Piscitelli, A., & Cassone, A. (1997). Acellular vaccines induce cell-mediated immunity to Bordetella pertussis antigens in infants undergoing primary vaccination against pertussis. *Developments in biological standardization*, 89, 315-20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9272365>
- Avadhanula, V., Rodriguez, C. A., Devincenzo, J. P., Wang, Y., Webby, R. J., Ulett, G. C., & Adderson, E. E. (2006). Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *Journal of virology*, 80(4), 1629-36. doi:10.1128/JVI.80.4.1629-1636.2006

- Bafica, A., Scanga, C. A., Feng, C. G., Leifer, C., Cheever, A., & Sher, A. (2005). TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of experimental medicine*, 202(12), 1715-24. doi:10.1084/jem.20051782
- Bals, R., & Hiemstra, P. S. (2004). Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European Respiratory Journal*, 23(2), 327-333. doi:10.1183/09031936.03.00098803
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18, 767-811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767
- Banus, H., Vandebriel, R. J., Ruiter, H. D., Dormans, J. A. M. A., Nagelkerke, N. J., Mooi, F. R., Hoebee, B., et al. (2006). Host Genetics of Bordetella pertussis Infection in Mice: Significance of Toll-Like Receptor 4 in Genetic Susceptibility and Pathobiology. *Infection and immunity*, 74(5), 2596-2605. doi:10.1128/IAI.74.5.2596
- Banus, S., Bottema, R. W. B., Siezen, C. L. E., Vandebriel, R. J., Reimerink, J., Mommers, M., Koppelman, G. H., et al. (2007). Toll-like receptor 4 polymorphism associated with the response to whole-cell pertussis vaccination in children from the KOALA study. *Clinical and vaccine immunology*: CVI, 14(10), 1377-80. doi:10.1128/CVI.00175-07
- Banus, S., Pennings, J., Vandebriel, R., Wester, P., Breit, T., Mooi, F., Hoebee, B., et al. (2007). Lung response to Bordetella pertussis infection in mice identified by gene-expression profiling. *Immunogenetics*, 59(7), 555-64. doi:10.1007/s00251-007-0227-5
- Banus, S., Stenger, R. M., Gremmer, E. R., Dormans, J. a M. a, Mooi, F. R., Kimman, T. G., & Vandebriel, R. J. (2008). The role of Toll-like receptor-4 in pertussis vaccine-induced immunity. *BMC immunology*, 9, 21. doi:10.1186/1471-2172-9-21
- Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R. M., & Barton, Gregory M, et al. (2009). Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nature immunology*, 10(11), 1200-7. doi:10.1038/ni.1792
- Barbic, J., Leef, M. F., Burns, D. L., & Shahin, R. D. et al. (1997). Role of gamma interferon in natural clearance of Bordetella pertussis infection. *Infection and immunity*, 65(12), 4904-8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=175707&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bargieri, D. Y., Rosa, D. S., Braga, C. J. M., Carvalho, B. O., Costa, F. T. M., Espindola, N. M., Vaz, A. J., et al. (2008). New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. *Vaccine*, 26(48), 6132-42. doi:10.1016/j.vaccine.2008.08.070
- Barnes, M. G., & Weiss, A. A. (2001). BrkA protein of Bordetella pertussis inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infection and immunity*, 69(5), 3067-72. doi:10.1128/IAI.69.5.3067-3072.2001
- Basith, S., Manavalan, B., Lee, G., Kim, S. G., & Choi, S. (2011). Toll-like receptor modulators: a patent review (2006-2010). *Expert opinion on therapeutic patents*, 21(6), 927-44. doi:10.1517/13543776.2011.569494
- Becker, P. D., Fiorentini, S., Link, C., Tosti, G., Ebsen, T., Caruso, A., & Guzmán, C. A. (2006). The HIV-1 matrix protein p17 can be efficiently delivered by intranasal route in mice using the TLR 2/6 agonist MALP-2 as mucosal adjuvant. *Vaccine*, 24(25), 5269-76. doi:10.1016/j.vaccine.2005.11.008
- Bekeredjian-Ding, I., & Jago, G. (2009). Toll-like receptors--sentries in the B-cell response. *Immunology*, 128(3), 311-23. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03173.x
- Belshe, R., Lee, M.-S., Walker, R. E., Stoddard, J., & Mendelman, P. M. (2004). Safety, immunogenicity and efficacy of intranasal, live attenuated influenza vaccine. *Expert review of vaccines*, 3(6), 643-54. doi:10.1586/14760584.3.6.643
- Berbers, G. a M., de Greeff, S. C., & Mooi, F. R. (2009). Improving pertussis vaccination. *Human vaccines*, 5(7), 497-503. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19242096>

- Bergmann, J. F., de Bruijne, J., Hotho, D. M., de Knegt, R. J., Boonstra, A., Weegink, C. J., van Vliet, A. A., et al. (2011). Randomised clinical trial: anti-viral activity of ANA773, an oral inducer of endogenous interferons acting via TLR7, in chronic HCV. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 34(4), 443-53. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04745.x
- Bhan, U., Ballinger, M. N., Zeng, X., Newstead, M. J., Cornicelli, M. D., & Standiford, T. J. (2010). Cooperative interactions between TLR4 and TLR9 regulate interleukin 23 and 17 production in a murine model of gram negative bacterial pneumonia. *PloS one*, 5(3), e9896. doi:10.1371/journal.pone.0009896
- Bienenstock, J., & Mcdermott, M. R. (2005). Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues. *Immunological Reviews*, 206, 22-31.
- Bisgard, K. M., Pascual, F. B., Ehresmann, K. R., Miller, C. A., Cianfrini, C., Jennings, C. E., Rebmann, C. A., et al. (2004). Infant pertussis: who was the source? *The Pediatric infectious disease journal*, 23(11), 985-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545851>
- Blander, J. M., & Medzhitov, R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*, 440(7085), 808-12. doi:10.1038/nature04596
- Bottero, Daniela, Gaillard, M. E., Fingerhann, M., Weltman, G., Fernández, J., Sisti, F., Graieb, A., et al. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical Bordetella pertussis strains. *Clinical and vaccine immunology*: CVI, 14(11), 1490-8. doi:10.1128/CVI.00177-07
- Broutin, H., Rohani, P., Guégan, J.-F., Grenfell, B. T., & Simondon, F. (2004). Loss of immunity to pertussis in a rural community in Senegal. *Vaccine*, 22(5-6), 594-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14994740>
- Brysbaert, G., Pellay, F.-X., Noth, S., & Benecke, A. (2010). Quality assessment of transcriptome data using intrinsic statistical properties. *Genomics, proteomics & bioinformatics / Beijing Genomics Institute*, 8(1), 57-71. doi:10.1016/S1672-0229(10)60006-X
- Burch, L. H., Yang, I. V., Whitehead, G. S., Chao, F. G., Berman, K. G., & Schwartz, D. a. (2006). The transcriptional response to lipopolysaccharide reveals a role for interferon-gamma in lung neutrophil recruitment. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 291(4), L677-82. doi:10.1152/ajplung.00523.2005
- Byrne, Patricia, McGuirk, P., Todryk, S., & Mills, K. H. G. (2004). Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with Bordetella pertussis associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. *European journal of immunology*, 34(9), 2579-88. doi:10.1002/eji.200425092
- Cai, S., Batra, S., Shen, L., Wakamatsu, N., Jeyaseelan, S., & Alerts, E. (2009). Both TRIF- and MyD88-Dependent Signaling Contribute to Host Defense against Pulmonary Klebsiella Infection. *the Journal of Imm*, (183), 6629-6638. doi:10.4049/jimmunol.0901033
- Campbell, G. R. O., Reuhs, B. L., & Walker, G. C. (2002). Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by Sinorhizobium meliloti requires correct lipopolysaccharide core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3938-43. doi:10.1073/pnas.062425699
- Campos, M., & Godson, D. L. (2003). The effectiveness and limitations of immune memory: understanding protective immune responses. *International journal for parasitology*, 33(5-6), 655-61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782062>
- Carbonetti, N. H., Artamonova, G. V., Andreasen, C., Dudley, E., Mays, R. M., & Worthington, Zoe E V, et al. (2004). Suppression of serum antibody responses by pertussis toxin after respiratory tract colonization by Bordetella pertussis and identification of an immunodominant lipoprotein. *Infection and immunity*, 72(6), 3350-8. doi:10.1128/IAI.72.6.3350-3358.2004
- Carbonetti, N. H., Artamonova, G. V., Van Rooijen, N., & Ayala, V. I. et al. (2007). Pertussis toxin targets airway macrophages to promote Bordetella pertussis infection of the respiratory tract. *Infection and immunity*, 75(4), 1713-20. doi:10.1128/IAI.01578-06

- Caroff, M., Brisson, J., Martin, A., & Karibian, D. (2000). Structure of the Bordetella pertussis 1414 endotoxin. *FEBS letters*, 477(1-2), 8-14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899302>
- Caron, G., Duluc, D., Frémaux, I., Jeannin, P., David, C., Gascan, H., & Delneste, Y. (2005). Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)*, 175(3), 1551-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16034093>
- Casella, C. R., & Mitchell, T. C. (2008). Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cellular and molecular life sciences □: CMLS*, 65(20), 3231-40. doi:10.1007/s00018-008-8228-6
- Chang, H.-C., Chen, C.-W., Hsieh, B.-L., & Chung, W.-B. (2010). Toll-Like Receptor expressions in porcine alveolar macrophages and Dendritic Cells in responding to poly IC stimulation and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 33(3), 197-213. doi:10.1016/j.cimid.2008.10.001
- Chen, X., Howard, O. M. Z., & Oppenheim, J. J. (2007). Pertussis toxin by inducing IL-6 promotes the generation of IL-17-producing CD4 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)*, 178(10), 6123-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475838>
- Cheng, D.-sheng, Han, W., Chen, S. M., P, T., Chont, M., Park, G.-young, Sheller, J. R., et al. (2007). Airway Epithelium Controls Lung Inflammation and Injury through the NF- κ B Pathway. *The Journal of Immunology*, 179, 6504-6513.
- Cheng, D.-sheng, Han, W., Chen, S. M., Sherrill, T. P., Chont, M., Park, G.-Y., Sheller, J. R., et al. (2007). Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the NF-kappa B pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)*, 178(10), 6504-13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475880>
- Cherry, J D, Gornbein, J., Heininger, U., & Stehr, K. (1998). A search for serologic correlates of immunity to Bordetella pertussis cough illnesses. *Vaccine*, 16(20), 1901-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9796041>
- Cherry, James D. (2005). The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of Bordetella pertussis infection. *Pediatrics*, 115(5), 1422-7. doi:10.1542/peds.2004-2648
- Cherry, James D. (2006). Epidemiology of pertussis. *The Pediatric infectious disease journal*, 25(4), 361-2. doi:10.1097/01.inf.0000210478.60841.69
- Cheung, D. O., Halsey, K., & Speert, D. P. (2000). Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against Pseudomonas aeruginosa. *Infection and immunity*, 68(8), 4585-92. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98382&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chiffolleau, E., Heslan, J.-M., Heslan, M., Louvet, C., Condamine, T., & Cuturi, M.-C. (2007). TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4+ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4+ CD25+ T cell. *International immunology*, 19(2), 193-201. doi:10.1093/intimm/dx1136
- Choi, Y. J., Im, E., Chung, H. K., Pothoulakis, C., & Rhee, Sang Hoon, et al. (2010). TRIF mediates Toll-like receptor 5-induced signaling in intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(48), 37570-8. doi:10.1074/jbc.M110.158394
- Ciabattini, A., Pettini, E., Fiorino, F., Prota, G., Pozzi, G., & Medaglini, D. (2011). Distribution of primed T cells and antigen-loaded antigen presenting cells following intranasal immunization in mice. *PLoS one*, 6(4), e19346. doi:10.1371/journal.pone.0019346
- Clement, C. G., Evans, S. E., Evans, C. M., Hawke, D., Kobayashi, R., Reynolds, P. R., Moghaddam, S. J., et al. (2008). Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177(12), 1322-30. doi:10.1164/rccm.200607-1038OC

- Colonna, M. (2007). TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own. *European journal of immunology*, 37(2), 306-9. doi:10.1002/eji.200637009
- Cotter, P. A., & Jones, A. M. (2003). Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends in microbiology*, 11(8), 367-73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915094>
- Coudeville, L., van Rie, a, & Andre, P. (2008). Adult pertussis vaccination strategies and their impact on pertussis in the United States: evaluation of routine and targeted (cocoon) strategies. *Epidemiology and infection*, 136(5), 604-20. doi:10.1017/S0950268807009041
- Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E., & Baltimore, David, et al. (2005). Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science (New York, N. Y.)*, 309(5742), 1854-7. doi:10.1126/science.1112304
- Craig, A., Mai, J., Cai, S., & Jeyaseelan, S. (2009). Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infection and immunity*, 77(2), 568-75. doi:10.1128/IAI.00832-08
- Czerkinsky, C., & Holmgren, J. (2010). Topical immunization strategies. *Mucosal immunology*, 3(6), 545-555. Nature Publishing Group. doi:10.1038/mi.2010.55
- Czerkinsky, C., & Holmgren, J. (2012). Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues. *Current topics in microbiology and immunology*, 354, 1-18. doi:10.1007/82_2010_112
- Davis, J. P. (2005). Clinical and economic effects of pertussis outbreaks. *The Pediatric infectious disease journal*, 24(6 Suppl), S109-16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931138>
- Delgado, M. F., Coviello, S., Monsalvo, A. C., Melendi, G. A., Hernandez, J. Z., Batalle, J. P., Diaz, L., et al. (2009). Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nature medicine*, 15(1), 34-41. doi:10.1038/nm.1894
- Deng, J. C., Moore, T. A., Newstead, M. W., Zeng, X., Krieg, A. M., & Standiford, T. J. (2004). CpG oligodeoxynucleotides stimulate protective innate immunity against pulmonary *Klebsiella* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(8), 5148-55. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3001228&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Diamantis, M. L., Bartlett, B. L., & Tyring, S. K. (2009). Safety, efficacy & recurrence rates of imiquimod cream 5% for treatment of anogenital warts. *Skin therapy letter*, 14(5), 1-3, 5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19609471>
- Dockrell, D. H., Marriott, H. M., Prince, L. R., Ridger, V. C., Ince, P. G., Hellewell, P. G., & Whyte, M. K. B. (2003). Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in a resolving model of pulmonary infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(10), 5380-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607941>
- Donnelly, S., Loscher, C. E., Lynch, M. A., & Mills, K. H. (2001). Whole-cell but not acellular pertussis vaccines induce convulsive activity in mice: evidence of a role for toxin-induced interleukin-1beta in a new murine model for analysis of neuronal side effects of vaccination. *Infection and immunity*, 69(7), 4217-23. doi:10.1128/IAI.69.7.4217-4223.2001
- Dunne, A., Marshall, N. A., & Mills, K. H. G. (2011). TLR based therapeutics. *Current opinion in pharmacology*, 11(4), 404-11. doi:10.1016/j.coph.2011.03.004
- Dunne, A., Ross, P. J., Pospisilova, E., Masin, J., Meaney, A., Sutton, C. E., Iwakura, Y., et al. (2010). Inflammasome Activation by Adenylate Cyclase Toxin Directs Th17 Responses and Protection against *Bordetella pertussis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. doi:10.4049/jimmunol.1000105
- Duthie, M. S., Windish, H. P., Fox, C. B., & Reed, S. G. (2011). Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunological reviews*, 239(1), 178-96. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00978.x
- Echchannaoui, H., Frei, K., Schnell, C., Leib, S. L., Zimmerli, W., & Landmann, R. (2002). Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *The Journal of infectious diseases*, 186(6), 798-806. doi:10.1086/342845

- Esser, M. T., Marchese, R. D., Kierstead, L. S., Tussey, L. G., Wang, F., Chirmule, N., & Washabaugh, M. W. (2003). Memory T cells and vaccines. *Vaccine*, *21*(5-6), 419-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531640>
- Evans, S. E., Scott, B. L., Clement, C. G., Larson, D. T., Kontoyiannis, D., Lewis, R. E., Lasala, P. R., et al. (2010). Stimulated innate resistance of lung epithelium protects mice broadly against bacteria and fungi. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *42*(1), 40-50. doi:10.1165/rcmb.2008-0260OC
- Evans, S. E., Tuvim, M. J., Zhang, J., Larson, D. T., Garcia, C. D., Martinez-Pro, S., Coombes, K. R., et al. (2010). Host lung gene expression patterns predict infectious etiology in a mouse model of pneumonia. *Respiratory research*, *11*, 101. doi:10.1186/1465-9921-11-101
- Ezoe, H., Akeda, Y., Piao, Z., Aoshi, T., Koyama, S., Tanimoto, T., Ishii, K. J., et al. (2011). Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A plus poly(I:C) protects against secondary pneumococcal pneumonia in mice. *Vaccine*, *29*(9), 1754-61. doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.117
- Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buwitt-Beckmann, U., et al. (2008). Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *Journal of leukocyte biology*, *83*(3), 692-701. doi:10.1189/jlb.0807586
- Finn, T. M., & Stevens, L. A. (1995). Tracheal colonization factor: a Bordetella pertussis secreted virulence determinant. *Molecular microbiology*, *16*(4), 625-34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7476158>
- Flak, T. A., & Goldman, W. E. (1999). Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cellular microbiology*, *1*(1), 51-60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207540>
- Forsyth, K. D., Wirsing von Konig, C.-H., Tan, T., Caro, J., & Plotkin, Stanley, et al. (2007). Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. *Vaccine*, *25*(14), 2634-42. doi:10.1016/j.vaccine.2006.12.017
- Fransen, F., Stenger, R. M., Poelen, M. C. M., van Dijken, H. H., Kuipers, B., Boog, C. J. P., van Putten, J. P. M., et al. (2010). Differential effect of TLR2 and TLR4 on the immune response after immunization with a vaccine against Neisseria meningitidis or Bordetella pertussis. *PloS one*, *5*(12), e15692. doi:10.1371/journal.pone.0015692
- Gambuzza, M., Licata, N., Palella, E., Celi, D., Foti Cuzzola, V., Italiano, D., Marino, S., et al. (2011). Targeting Toll-like receptors: Emerging therapeutics for multiple sclerosis management. *Journal of neuroimmunology*, *239*(1-2), 1-12. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.08.010
- Gelman, A. E., Zhang, J., Choi, Y., & Turka, Laurence A, et al. (2004). Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)*, *172*(10), 6065-73. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2833313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gerold, G., Zychlinsky, A., & de Diego, J. L. et al. (2007). What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections? *Seminars in immunology*, *19*(1), 41-7. doi:10.1016/j.smim.2006.12.003
- Gerson, C., Sabater, J., Scuri, M., Torbati, A., Coffey, R., Abraham, J. W., Lauredo, I., et al. (2000). The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *22*(6), 665-71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837362>
- Geuijen, C. A., Willems, R. J., Bongaerts, M., Top, J., Gielen, H., & Mooi, F. R. et al. (1997). Role of the Bordetella pertussis minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infection and immunity*, *65*(10), 4222-8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=175606&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Geurtsen, J., Fransen, F., Vandebriel, R. J., Gremmer, E. R., de la Fonteyne-Blankestijn, L. J. J., Kuipers, B., Tommassen, J., et al. (2008). Supplementation of whole-cell pertussis vaccines with lipopolysaccharide analogs: modification of vaccine-induced immune responses. *Vaccine*, *26*(7), 899-906. doi:10.1016/j.vaccine.2007.12.012

- Giuliano, M., Mastrantonio, P., Giammanco, A., Piscitelli, A., Salmaso, S., & Wassilak, S. G. (1998). Antibody responses and persistence in the two years after immunization with two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. *The Journal of pediatrics*, 132(6), 983-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9627590>
- Gonzalez-Juarrero, M., Shim, T. S., Kipnis, A., Junqueira-Kipnis, A. P., & Orme, I. M. (2003). Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(6), 3128-35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960339>
- Goodyear, A., Kellihan, L., Bielefeldt-Ohmann, H., Troyer, R., Propst, K., & Dow, S. (2009). Protection from pneumonic infection with burkholderia species by inhalational immunotherapy. *Infection and immunity*, 77(4), 1579-88. doi:10.1128/IAI.01384-08
- Gordon, S. B., & Read, R. C. (2002). Macrophage defences against respiratory tract infections. *British Medical Bulletin*, (61), 45-61.
- Granström, M., Olander-Nielsen, A. M., Holmblad, P., Mark, A., & Hanngren, K. (1991). Specific immunoglobulin for treatment of whooping cough. *Lancet*, 338(8777), 1230-3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1682643>
- Gribar, S. C., Richardson, W. M., Sodhi, C. P., & Hackam, D. J. (2008). No longer an innocent bystander: epithelial toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 14(9-10), 645-59. doi:10.2119/2008-00035.Gribar
- Grubor, B., Meyerholz, D. K., & Ackermann, M. R. (2006). Collectins and cationic antimicrobial peptides of the respiratory epithelia. *Veterinary pathology*, 43(5), 595-612. doi:10.1354/vp.43-5-595
- Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M., & Guiso, N, et al. (1998). Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during Bordetella pertussis infection in vivo. *Infection and immunity*, 66(4), 1718-25. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=108109&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., et al. (2001). The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *The Journal of experimental medicine*, 193(9), 1035-44. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193436&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Guiso, N, Capiou, C., Carletti, G., Poolman, J., & Hauser, P. (1999). Intranasal murine model of Bordetella pertussis infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine*, 17(19), 2366-76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392618>
- Guiso, Nicole, Liese, J., & Plotkin, S. (2011). The Global Pertussis Initiative: meeting report from the fourth regional roundtable meeting, France, April 14-15, 2010. *Human vaccines*, 7(4), 481-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21389775>
- Guy, B. (2007). The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature reviews. Microbiology*, 5(7), 505-17. doi:10.1038/nrmicro1681
- Hajjar, A. M., Harowicz, H., Liggitt, H. D., Fink, P. J., Wilson, C. B., & Skerrett, S. J. (2005). An essential role for non-bone marrow-derived cells in control of Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 33(5), 470-5. doi:10.1165/rcmb.2005-0199OC
- Halperin, S. A. (2007). The control of pertussis--2007 and beyond. *The New England journal of medicine*, 356(2), 110-3. doi:10.1056/NEJMp068288
- Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2011). Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses. *Allergy*, 66(5), 579-87. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02528.x
- Hammerbeck, D. M., Burtleson, G. R., Schuller, C. J., Vasilakos, J. P., Tomai, M., Egging, E., Cochran, F. R., et al. (2007). Administration of a dual toll-like receptor 7 and toll-like receptor 8 agonist protects against influenza in rats. *Antiviral research*, 73(1), 1-11. doi:10.1016/j.antiviral.2006.07.011

- Hawn, T. R., Berrington, W. R., Smith, I. A., Uematsu, S., Akira, S., Aderem, A., Smith, K. D., et al. (2007). Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with *Legionella pneumophila*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(10), 6981-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982089>
- Hawn, T. R., Verbon, A., Lettinga, K. D., Zhao, L. P., Li, S. S., Laws, R. J., Skerrett, S. J., et al. (2003). A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *The Journal of experimental medicine*, 198(10), 1563-72. doi:10.1084/jem.20031220
- He, B., Xu, W., Santini, P. A., Polydorides, A. D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., et al. (2007). Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*, 26(6), 812-26. doi:10.1016/j.immuni.2007.04.014
- He, Q., & Mertsola, J. (2008). Factors contributing to pertussis resurgence. *Future microbiology*, 3(3), 329-39. doi:10.2217/17460913.3.3.329
- Heer, A. K., Shamshiev, A., Donda, A., Uematsu, S., Akira, S., Kopf, M., & Marsland, B. J. (2007). TLR signaling fine-tunes anti-influenza B cell responses without regulating effector T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(4), 2182-91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277123>
- Heininger, U., Klich, K., Stehr, K., & Cherry, J. D. (1997). Clinical findings in *Bordetella pertussis* infections: results of a prospective multicenter surveillance study. *Pediatrics*, 100(6), E10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382911>
- Heiss, L. N., Lancaster, J. R., Corbett, J. A., Goldman, W. E., & Al., E. (1994). Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 267-70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42928&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., & Akira, Shizuo, et al. (2003). The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(6), 3059-64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626561>
- Hickey, F. B., Brereton, C. F., & Mills, K. H. G. et al. (2008). Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*, 84(1), 234-43. doi:10.1189/jlb.0208113
- Hiemstra, P. S. (2007). The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Experimental lung research*, 33(10), 537-42. doi:10.1080/01902140701756687
- Higgins, S. C., Jarnicki, A. G., Lavelle, E. C., & Mills, K. H. G. (2006). TLR4 Mediates Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to *Bordetella pertussis*: Role of IL-17-Producing T Cells. *The Journal of Immunology*, (177), 7980-7989.
- Higgins, S. C., Lavelle, E. C., McCann, C., Keogh, B., McNeela, E., Byrne, P., O'Gorman, B., et al. (2003). Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(6), 3119-27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960338>
- Hippenstiel, S., Opitz, B., Schmeck, B., & Suttrop, N. (2006). Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respiratory research*, 7, 97. doi:10.1186/1465-9921-7-97
- Hiriart Y, Errea A, Gonzales Maciel D, Lopez JC, Rumbo M, et al. (2011). A method for the purification of bacterial flagellin that allows simple upscaling. *World J Microbiol Biotechnol*. doi:10.1007/s11274-011-0786-3
- Hochegger, K., Perco, P., Enrich, J., Mayer, B., Mayer, G., Rosenkranz, a R., & Rudnicki, M. (2007). In vitro--transcriptional response of polymorphonuclear leukocytes following contact with different antigens. *European journal of clinical investigation*, 37(11), 860-9. doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01872.x

- Hogan, R J, Usherwood, E. J., Zhong, W., Roberts, A. A., Dutton, R. W., Harmsen, A. G., & Woodland, D. L. (2001). Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(3), 1813-22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160228>
- Hogan, R J, Zhong, W., Usherwood, E. J., Cookenham, T., Roberts, A. D., & Woodland, D. L. (2001). Protection from respiratory virus infections can be mediated by antigen-specific CD4(+) T cells that persist in the lungs. *The Journal of experimental medicine*, 193(8), 981-6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193400&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Holmgren, Jan, & Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*, 11(4 Suppl), S45-53. doi:10.1038/nm1213
- Holt, P. G., Strickland, D. H., Wikström, M. E., & Jahnsen, F. L. (2008). Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nature reviews. Immunology*, 8(2), 142-52. doi:10.1038/nri2236
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., et al. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 434(7034), 772-7. doi:10.1038/nature03464
- Hong, S. H., Byun, Y.-H., Nguyen, C. T., Kim, S. Y., Seong, B. L., Park, S., Woo, G.-J., et al. (2012). Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection. *Vaccine*, 30(2), 466-74. doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.058
- Honko, A. N., Sriranganathan, N., Lees, C. J., & Mizel, S. B. (2006). Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infection and immunity*, 74(2), 1113-20. doi:10.1128/IAI.74.2.1113-1120.2006
- Horak, F. (2011). VTX-1463, a novel TLR8 agonist for the treatment of allergic rhinitis. *Expert opinion on investigational drugs*, 20(7), 981-6. doi:10.1517/13543784.2011.583237
- Hozbor, D, Rodriguez, M. E., Samo, A., Lagares, A., & Yantorno, O. (1993). Release of lipopolysaccharide during *Bordetella pertussis* growth. *Research in microbiology*, 144(3), 201-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8210677>
- Hozbor, D, Mooi, F., Flores, D., Weltman, G., Bottero, D., Fossati, S., Lara, C., et al. (2009). Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *The Journal of infection*, 59(4), 225-31. doi:10.1016/j.jinf.2009.07.014
- Humiston, S. G., & Rosenthal, S. L. (2005). Challenges to vaccinating adolescents: vaccine implementation issues. *The Pediatric infectious disease journal*, 24(6 Suppl), S134-40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931141>
- Inatsuka, C. S., Xu, Q., Vujkovic-Cvijin, I., Wong, S., Stibitz, S., Miller, J. F., & Cotter, P. a. (2010). Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infection and immunity*, 78(7), 2901-9. doi:10.1128/IAI.00188-10
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5963), 291-5. doi:10.1126/science.1183021
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20, 197-216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
- Janot, L., Sirard, J.-C., Secher, T., Noulin, N., Fick, L., Akira, S., Uematsu, S., et al. (2009). Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *European journal of immunology*, 39(6), 1587-96. doi:10.1002/eji.200838907
- Jean, D., Rezaiguia-Delclaux, S., Delacourt, C., Leclercq, R., Lafuma, C., Brun-Buisson, C., Harf, A., et al. (1998). Protective effect of endotoxin instillation on subsequent bacteria-induced acute lung injury in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 158(6), 1702-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9847256>

- Jeyaseelan, S., Chu, H. W., Young, S. K., & Worthen, G. S. (2004). Transcriptional Profiling of Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. *Society*, 72(12), 7247-7256. doi:10.1128/IAI.72.12.7247
- Johansson, E. L., Wassén, L., Holmgren, J., Jertborn, M., & Rudin, A. et al. (2001). Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infection and immunity*, 69(12), 7481-6. doi:10.1128/IAI.69.12.7481-7486.2001
- Jones, S. A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(6), 3463-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148087>
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., et al. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature immunology*, 3(6), 499. doi:10.1038/ni0602-499
- Kallonen, T., & He, Q. (2009). Bordetella pertussis strain variation and evolution postvaccination. *Expert review of vaccines*, 8(7), 863-75. doi:10.1586/erv.09.46
- Kamanova, J., Kofronova, O., Masin, J., Genth, H., Vojtova, J., Linhartova, I., Benada, O., et al. (2008). Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(8), 5587-97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832717>
- Kasturi, S. P., Skountzou, I., Albrecht, R. a., Koutsonanos, D., Hua, T., Nakaya, H. I., Ravindran, R., et al. (2011). Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature*, 470(7335), 543-547. doi:10.1038/nature09737
- Katada, T., Tamura, M., Ui, M., & Al, E. (1983). The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Archives of biochemistry and biophysics*, 224(1), 290-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6683482>
- Kato, A., & Schleimer, R. P. (2007). Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Current opinion in immunology*, 19(6), 711-20. doi:10.1016/j.coi.2007.08.004
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089), 101-5. doi:10.1038/nature04734
- Kawai, T., & Akira, S. (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *Journal of biochemistry*, 141(2), 137-45. doi:10.1093/jb/mvm032
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373-84. Nature Publishing Group. doi:10.1038/ni.1863
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*, 34(5), 637-50. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.006
- Kenny, E. F., & O'Neill, L. a J. (2008). Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine*, 43(3), 342-9. doi:10.1016/j.cyto.2008.07.010
- Kersten, G., & Hirschberg, H. (2007). Needle-free vaccine delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 4(5), 459-74. doi:10.1517/17425247.4.5.459
- Khan, A. Q., Chen, Q., Wu, Z.-Q., Paton, J. C., & Snapper, Clifford M, et al. (2005). Both innate immunity and type 1 humoral immunity to Streptococcus pneumoniae are mediated by MyD88 but differ in their relative levels of dependence on toll-like receptor 2. *Infection and immunity*, 73(1), 298-307. doi:10.1128/IAI.73.1.298-307.2005
- Kielian, T., Haney, A., Mayes, P. M., Garg, S., & Esen, N. et al. (2005). Toll-like receptor 2 modulates the proinflammatory milieu in Staphylococcus aureus-induced brain abscess. *Infection and immunity*, 73(11), 7428-35. doi:10.1128/IAI.73.11.7428-7435.2005

Kim, K. C., McCracken, K., Lee, B. C., Shin, C. Y., Jo, M. J., Lee, C. J., & Ko, K. H. (1997). Airway goblet cell mucin: its structure and regulation of secretion. *The European respiratory journal*: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology, 10(11), 2644-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9426108>

Kimman, T. G., Banus, S., Reijmerink, N., Reimerink, J., Stelma, F. F., Koppelman, G. H., Thijs, C., et al. (2008). Association of interacting genes in the toll-like receptor signaling pathway and the antibody response to pertussis vaccination. *PLoS one*, 3(11), e3665. doi:10.1371/journal.pone.0003665

King, A. J., van Gorkom, T., van der Heide, H. G. J., Advani, A., & van der Lee, S. (2010). Changes in the genomic content of circulating Bordetella pertussis strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? *BMC genomics*, 11, 64. doi:10.1186/1471-2164-11-64

Kirmanjesswara, G. S., Agosto, L. M., Kennett, M. J., Bjornstad, O. N., Harvill, E. T., & Al., E. (2005). Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of Bordetella pertussis, 115(12). doi:10.1172/JCI24609.3594

Knapp, S., Wieland, C. W., van 't Veer, C., Takeuchi, O., Akira, S., Florquin, S., & van der Poll, T. (2004). Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(5), 3132-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978119>

Knowles, M. R., & Boucher, R. C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of clinical investigation*, 109(5), 571-7. doi:10.1172/JCI15217

Kopp, E., & Medzhitov, R. (2003). Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Current opinion in immunology*, 15(4), 396-401. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900270>

Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 30(1), 16-34. doi:10.3109/08830185.2010.529976

LaRosa, D. F., Stumhofer, J. S., Gelman, A. E., Rahman, A. H., Taylor, D. K., Hunter, C. A., & Turka, L. A. (2008). T cell expression of MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3855-60. doi:10.1073/pnas.0706663105

Lagasse, E., & Weissman, I. L. (1996). Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *Journal of immunological methods*, 197(1-2), 139-50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8890901>

Lahn, M., Kanehiro, A., Takeda, K., Joetham, A., Schwarze, J., Köhler, G., O'Brien, R., et al. (1999). Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells. *Nature medicine*, 5(10), 1150-6. doi:10.1038/13476

Lamberti, Y. A., Hayes, J. A., Perez Vidakovics, M. L., Harvill, E. T., & Rodriguez, M. E. (2010). Intracellular trafficking of Bordetella pertussis in human macrophages. *Infection and immunity*, 78(3), 907-13. doi:10.1128/IAI.01031-09

Lamberti, Y., Perez Vidakovics, M. L., van der Pol, L.-W., & Rodríguez, M. E. (2008). Cholesterol-rich domains are involved in Bordetella pertussis phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microbial pathogenesis*, 44(6), 501-11. doi:10.1016/j.micpath.2008.01.002

Lambrecht, B. N. (2006). Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity*, 24(4), 366-8. doi:10.1016/j.immuni.2006.03.008

Lawson, L. B., Norton, E. B., & Clements, J. D. (2011). Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Current opinion in immunology*, 23(3), 414-20. doi:10.1016/j.coi.2011.03.009

Leef, M., Elkins, K. L., Barbic, J., & Shahin, R. D. (2000). Protective immunity to Bordetella pertussis requires both B cells and CD4(+) T cells for key functions other than specific antibody production. *The Journal of*

- experimental medicine*, 191(11), 1841-52. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213518&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Legge, K. L., & Braciale, T. J. (2003). Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity*, 18(2), 265-77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594953>
- Leibundgut-Landmann, S., Weidner, K., Hilbi, H., & Oxenius, A. (2011). Nonhematopoietic cells are key players in innate control of bacterial airway infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(5), 3130-7. doi:10.4049/jimmunol.1003565
- Lembo, A., Pelletier, M., Iyer, R., Timko, M., Dudda, J. C., West, T. E., Wilson, C. B., et al. (2008). Administration of a synthetic TLR4 agonist protects mice from pneumonic tularemia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(11), 7574-81. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3063511&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lenz, D. H., Weingart, C. L., & Weiss, A. A. (2000). Phagocytosed Bordetella pertussis fails to survive in human neutrophils. *Infection and immunity*, 68(2), 956-9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97230&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Letran, S. E., Lee, S.-J., Atif, S. M., Uematsu, S., Akira, S., & McSorley, S. J. (2010). TLR5 functions as an endocytic receptor to enhance flagellin-specific adaptive immunity. *European journal of immunology*, 29-38. doi:10.1002/eji.201040717
- Lewis, C. C., Yang, J. Y. H., Huang, X., Banerjee, S. K., Blackburn, M. R., Baluk, P., McDonald, D. M., et al. (2008). Disease-specific gene expression profiling in multiple models of lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177(4), 376-87. doi:10.1164/rccm.200702-333OC
- Liese, J. G., Renner, C., Stojanov, S., & Belohradsky, B. H. (2003). Clinical and epidemiological picture of B pertussis and B parapertussis infections after introduction of acellular pertussis vaccines. *Archives of disease in childhood*, 88(8), 684-7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1719607&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Liu, G., Zhang, L., & Zhao, Y. (2010). Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clinical and experimental immunology*, 160(2), 168-75. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04091.x
- Loiario, M., Ruggiero, V., & Sette, C. et al. (2010). Targeting TLR/IL-1R signalling in human diseases. *Mediators of inflammation*, 2010, 674363. doi:10.1155/2010/674363
- Long, G. H., Karanikas, A. T., Harvill, E. T., Read, A. F., & Hudson, P. J. (2010). Acellular pertussis vaccination facilitates Bordetella parapertussis infection in a rodent model of bordetellosis. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 277(1690), 2017-25. doi:10.1098/rspb.2010.0010
- Lorenz, E., Mira, J. P., Cornish, K. L., Arbour, N. C., & Schwartz, D. A. (2000). A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infection and immunity*, 68(11), 6398-401. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97725&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lu, X., Masic, A., Liu, Q., & Zhou, Y. (2011). Regulation of influenza A virus induced CXCL-10 gene expression requires PI3K/Akt pathway and IRF3 transcription factor. *Molecular immunology*, 48(12-13), 1417-23. doi:10.1016/j.molimm.2011.03.017
- Magalhaes, J. G., Philpott, D. J., Nahori, M.-A., Jehanno, M., Fritz, J., Le Bourhis, L., Viala, J., et al. (2005). Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO reports*, 6(12), 1201-7. doi:10.1038/sj.embor.7400552
- Mahon, B. P., Sheahan, B. J., Griffin, F., Murphy, G., & Mills, K. H. et al. (1997). Atypical disease after Bordetella pertussis respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon-gamma receptor or immunoglobulin mu chain genes. *The Journal of experimental medicine*, 186(11), 1843-51. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2199147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Marriott, H. M., & Dockrell, D. H. (2007). The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Experimental lung research*, 33(10), 493-505. doi:10.1080/01902140701756562
- Martino, A., Volpe, E., Auricchio, G., Colizzi, V., Baldini, P. M., & Al., E. (2006). Influence of pertussis toxin on CD1a isoform expression in human dendritic cells. *Journal of clinical immunology*, 26(2), 153-9. doi:10.1007/s10875-006-9009-3
- Marzouqi, I., Richmond, P., Fry, S., Wetherall, J., & Mukkur, T. (2010). Development of improved vaccines against whooping cough Current status. *Human Vaccines*, 6(7), 543-553.
- Masure, H. R. (1993). The adenylate cyclase toxin contributes to the survival of *Bordetella pertussis* within human macrophages. *Microbial pathogenesis*, 14(4), 253-60. doi:10.1006/impat.1993.1025
- Mattoo, S., & Cherry, J. D. (2005). Molecular Pathogenesis , Epidemiology , and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Society*, 18(2), 326-382. doi:10.1128/CMR.18.2.326
- Mayer, A. K., Muehmer, M., Mages, J., Gueinzus, K., Hess, C., Heeg, K., Bals, R., et al. (2007). Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(5), 3134-42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312161>
- McGillivray, G., Mason, K. M., Juncisek, J. A., Peeples, M. E., & Bakaletz, Lauren O, et al. (2009). Respiratory syncytial virus-induced dysregulation of expression of a mucosal beta-defensin augments colonization of the upper airway by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Cellular microbiology*, 11(9), 1399-408. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01339.x
- McGuirk, P., Mahon, B. P., Griffin, F., & Mills, K H, et al. (1998). Compartmentalization of T cell responses following respiratory infection with *Bordetella pertussis*: hyporesponsiveness of lung T cells is associated with modulated expression of the co-stimulatory molecule CD28. *European journal of immunology*, 28(1), 153-63. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199801)28:01<153::AID-IMMU153>3.0.CO;2-#
- Mcaleer, J. P., & Vella, A. T. (2011). Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide. *31(11)*, 429-435. doi:10.1016/j.it.2010.08.005.Educating
- Miao, E. A., Andersen-Nissen, E., Warren, S. E., & Aderem, A. (2007). TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Seminars in immunopathology*, 29(3), 275-88. doi:10.1007/s00281-007-0078-z
- Mielcarek, N., Debie, A.-S., Raze, D., Bertout, J., Rouanet, C., Younes, A. B., Creusy, C., et al. (2006). Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS pathogens*, 2(7), e65. doi:10.1371/journal.ppat.0020065
- Mills, K. (2001). Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes and Infection*, 3(8), 655-677. doi:10.1016/S1286-4579(01)01421-6
- Mills, K. H., Barnard, A., Watkins, J., & Redhead, K. (1993). Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infection and immunity*, 61(2), 399-410. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=302743&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mills, K. H., Brady, M., Ryan, E., & Mahon, B. P. (1998). A respiratory challenge model for infection with *Bordetella pertussis*: application in the assessment of pertussis vaccine potency and in defining the mechanism of protective immunity. *Developments in biological standardization*, 95, 31-41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9855412>
- Mills, Ryan, M., Ryan, E., & Mahon, B. P. et al. (1998). A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infection and immunity*, 66(2), 594-602. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=107945&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mitragotri, S. (2005). Immunization without needles. *Nature reviews. Immunology*, 5(12), 905-16. doi:10.1038/nri1728

- Mizgerd, J. P. (2006). Lung infection--a public health priority. *PLoS medicine*, 3(2), e76. doi:10.1371/journal.pmed.0030076
- Mizgerd, J. P., Lupa, M. M., & Spieker, M. S. (2004). NF-kappaB p50 facilitates neutrophil accumulation during LPS-induced pulmonary inflammation. *BMC immunology*, 5, 10. doi:10.1186/1471-2172-5-10
- Mooi, F R, Jansen, W. H., Brunings, H., Gielen, H., van der Heide, H. G., Walvoort, H. C., & Guinee, P. A. (1992). Construction and analysis of Bordetella pertussis mutants defective in the production of fimbriae. *Microbial pathogenesis*, 12(2), 127-35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1350044>
- Mooi, Frits R. (2010). Bordetella pertussis and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 10(1), 36-49. doi:10.1016/j.meegid.2009.10.007
- Mooi, Frits R. (2009). Bordetella pertussis Strains with Increased Toxin Production Associated with Pertussis Resurgence. *Emerging Infectious Diseases*, 15(8), 1206-1213. doi:10.3201/eid1508.081511
- Moskwa, P., Lorentzen, D., Excoffon, K. J. D. A., Zabner, J., McCray, P. B., Nauseef, W. M., Dupuy, C., et al. (2007). A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(2), 174-83. doi:10.1164/rccm.200607-1029OC
- Moyron-Quiroz, J. E., Rangel-Moreno, J., Kusser, K., Hartson, L., Sprague, F., Goodrich, S., Woodland, D. L., et al. (2004). Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nature medicine*, 10(9), 927-34. doi:10.1038/nm1091
- Muir, A., Soong, G., Sokol, S., Reddy, B., Gomez, M. I., Van Heeckeren, A., & Prince, A. (2004). Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 30(6), 777-83. doi:10.1165/rcmb.2003-0329OC
- Mullan, R. H., Bresnihan, B., Golden-Mason, L., Markham, T., O'Hara, R., FitzGerald, O., Veale, D. J., et al. (2006). Acute-phase serum amyloid A stimulation of angiogenesis, leukocyte recruitment, and matrix degradation in rheumatoid arthritis through an NF-kappaB-dependent signal transduction pathway. *Arthritis and rheumatism*, 54(1), 105-14. doi:10.1002/art.21518
- Muñoz, N., VAN Maele, L., Marqués, J. M., Rial, A., Sirard, J.-C., & Chabalgoity, J. a. (2010). Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection. *Infection and immunity*, 78(10), 4226-4233. doi:10.1128/IAI.00224-10
- Nagendra, S., & Schlueter, A. J. (2004). Absence of cross-reactivity between murine Ly-6C and Ly-6G. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 58(2), 195-200. doi:10.1002/cyto.a.20007
- Nasso, M., Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Costantino, P., Rappuoli, R., & Ausiello, C. M. (2009). Genetically detoxified pertussis toxin induces Th1/Th17 immune response through MAPKs and IL-10-dependent mechanisms. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(3), 1892-9. doi:10.4049/jimmunol.0901071
- Neff, S. B., Z'graggen, B. R., Neff, T. A., Jamnicki-Abegg, M., Suter, D., Schimmer, R. C., Booy, C., et al. (2006). Inflammatory response of tracheobronchial epithelial cells to endotoxin. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 290(1), L86-96. doi:10.1152/ajplung.00391.2004
- Neutra, M. R., & Kozlowski, P. A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature reviews. Immunology*, 6(2), 148-58. doi:10.1038/nri1777
- Nguyen, C. T., Kim, S. Y., Kim, M. S., Lee, S. E., & Rhee, J. H. (2011). Intranasal immunization with recombinant PspA fused with a flagellin enhances cross-protective immunity against Streptococcus pneumoniae infection in mice. *Vaccine*, 29(34), 5731-9. doi:10.1016/j.vaccine.2011.05.095
- Nicholson, T. L., Brockmeier, S. L., & Loving, C. L. et al. (2009). Contribution of Bordetella bronchiseptica filamentous hemagglutinin and pertactin to respiratory disease in swine. *Infection and immunity*, 77(5), 2136-46. doi:10.1128/IAI.01379-08

- Noth, S., Brysbaert, G., & Benecke, A. (2006). Normalization using weighted negative second order exponential error functions (NeONORM) provides robustness against asymmetries in comparative transcriptome profiles and avoids false calls. *Genomics, proteomics & bioinformatics / Beijing Genomics Institute*, 4(2), 90-109. doi:10.1016/S1672-0229(06)60021-1
- Olin, P., Rasmussen, F., Gustafsson, L., Hallander, H. O., & Heijbel, H. (1997). Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. *Lancet*, 350(9091), 1569-77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393335>
- Oma, K., Zhao, J., Ezo, H., Akeda, Y., Koyama, S., Ishii, K. J., Kataoka, K., et al. (2009). Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice. *Vaccine*, 27(24), 3181-8. doi:10.1016/j.vaccine.2009.03.055
- Otczyk, D. C., & Cripps, A. W. (2010). Mucosal immunization: A realistic alternative. *Human Vaccines*, 6(12), 978-1006. doi:10.4161/hv.6.12.13142
- Ouyang, X., Negishi, H., Takeda, R., Fujita, Y., Taniguchi, T., & Honda, K. (2007). Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 354(4), 1045-51. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.090
- Paccani, S. R., Dal Molin, F., Benagiano, M., Ladant, D., D'Elios, M. M., Montecucco, C., & Baldari, Cosima T, et al. (2008). Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infection and immunity*, 76(7), 2822-32. doi:10.1128/IAI.00200-08
- Padovan, E., Landmann, R. M., & De Libero, G. (2007). How pattern recognition receptor triggering influences T cell responses: a new look into the system. *Trends in immunology*, 28(7), 308-14. doi:10.1016/j.it.2007.05.002
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6853-66. doi:10.1038/sj.onc.1203239
- Panina, E. M., Mattoo, S., Griffith, N., Kozak, N. A., Yuk, M. H., & Miller, Jeff F, et al. (2005). A genome-wide screen identifies a *Bordetella* type III secretion effector and candidate effectors in other species. *Molecular microbiology*, 58(1), 267-79. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04823.x
- Parilla, N. W., Hughes, V. S., Lierl, K. M., Wong, H. R., & Page, K. (2006). CpG DNA modulates interleukin 1beta-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial (16HBE14o-) cells. *Respiratory research*, 7, 84. doi:10.1186/1465-9921-7-84
- Pasare, C., & Medzhitov, R. (2005a). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Advances in experimental medicine and biology*, 560, 11-8. doi:10.1007/0-387-24180-9_2
- Pasare, C., & Medzhitov, R. (2005b). Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*, 438(7066), 364-8. doi:10.1038/nature04267
- Pennings, J. L. a, Kimman, T. G., & Janssen, R. (2008). Identification of a common gene expression response in different lung inflammatory diseases in rodents and macaques. *PLoS one*, 3(7), e2596. doi:10.1371/journal.pone.0002596
- Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M.-F., Sher, A., & Soldati-Favre, D. (2008). *Toxoplasma profilin* is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell host & microbe*, 3(2), 77-87. doi:10.1016/j.chom.2008.01.001
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), 2085-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851930>
- Polverino, E., & Torres Marti, A. (2011). Community-acquired pneumonia. *Minerva anestesologica*, 77(2), 196-211. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21242952>

- Premier, R. R., Jacobs, H. J., Lofthouse, S. A., Sedgmen, B. J., & Meeusen, E. N. T. (2004). Antibody isotype profiles in serum and circulating antibody-secreting cells following mucosal and peripheral immunisations of sheep. *Veterinary immunology and immunopathology*, *98*(1-2), 77-84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15127844>
- Pulendran, B., Kumar, P., Cutler, C. W., Mohamadzadeh, M., Van Dyke, T., & Banchereau, J. (2001). Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*(9), 5067-76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673516>
- Pulendran, B., & Ahmed, R. (2006). Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell*, *124*(4), 849-63. doi:10.1016/j.cell.2006.02.019
- Purwar, R., Campbell, J., Murphy, G., Richards, W. G., Clark, R. A., & Kupper, T. S. (2011). Resident memory T cells (T(RM)) are abundant in human lung: diversity, function, and antigen specificity. *PLoS one*, *6*(1), e16245. doi:10.1371/journal.pone.0016245
- Querec, T., Bennouna, S., Alkan, S., Laouar, Y., Gorden, K., Flavell, R., Akira, S., et al. (2006). Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *The Journal of experimental medicine*, *203*(2), 413-24. doi:10.1084/jem.20051720
- Ramos, H. C., Rumbo, M., & Sirard, J.-C. (2004). Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in microbiology*, *12*(11), 509-17. doi:10.1016/j.tim.2004.09.002
- Randall, K. L. (2010). Generating humoral immune memory following infection or vaccination. *Expert review of vaccines*, *9*(9), 1083-93. doi:10.1586/erv.10.103
- Rangel-Moreno, J., Hartson, L., Navarro, C., Gaxiola, M., Selman, M., & Randall, T. D. (2006). Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*, *116*(12), 3183-94. doi:10.1172/JCI28756
- Raoust, E., Balloy, V., Garcia-Verdugo, I., Touqui, L., Ramphal, R., & Chignard, M. (2009). Pseudomonas aeruginosa LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS one*, *4*(10), e7259. doi:10.1371/journal.pone.0007259
- Reppe, K., Tschernig, T., Lührmann, A., van Laak, V., Grote, K., Zemlin, M. V., Gutbier, B., et al. (2009). Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *40*(4), 474-81. doi:10.1165/rcmb.2008-0071OC
- Roberts, M., Fairweather, N. F., Leininger, E., Pickard, D., Hewlett, E. L., Robinson, A., Hayward, C., et al. (1991). Construction and characterization of Bordetella pertussis mutants lacking the vir-regulated P.69 outer membrane protein. *Molecular microbiology*, *5*(6), 1393-404. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1787793>
- Roberts, R., Moreno, G., Bottero, D., Gaillard, M. E., Fingerhann, M., Graieb, A., Rumbo, M., et al. (2008). Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine*, *26*(36), 4639-46. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.004
- Rodriguez, M E, Hellwig, S. M., Hozbor, D. F., Leusen, J., van der Pol, W. L., & van de Winkel, J. G. (2001). Fc receptor-mediated immunity against Bordetella pertussis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*(11), 6545-51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714823>
- Romagne, F. (2007). Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug discovery today*, *12*(1-2), 80-7. doi:10.1016/j.drudis.2006.11.007
- Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., et al. (1997). Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*, *6*(3), 315-25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9075932>
- Rosignol, D. P., Wasan, K. M., Choo, E., Yau, E., Wong, N., Rose, J., Moran, J., et al. (2004). Safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and plasma lipoprotein distribution of eritoran (E5564) during

continuous intravenous infusion into healthy volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(9), 3233-40. doi:10.1128/AAC.48.9.3233-3240.2004

Ryan, M., Murphy, G., Ryan, E., Nilsson, L., Shackley, F., Gothefors, L., Oymar, K., et al. (1998). Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. *Immunology*, 93(1), 1-10. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1364099&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Sandri, S., Rodriguez, D., Gomes, E., Monteiro, H. P., Russo, M., & Campa, A. (2008). Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *Journal of leukocyte biology*, 83(5), 1174-80. doi:10.1189/jlb.0407203

Scheerlinck, J.-P. Y., Gekas, S., Yen, H.-H., Edwards, S., Pearse, M., Coulter, A., & Sutton, P. (2006). Local immune responses following nasal delivery of an adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine*, 24(18), 3929-36. doi:10.1016/j.vaccine.2006.02.032

Schurr, J. R., Young, E., Byrne, P., Steele, C., Shellito, J. E., & Kolls, J. K. (2005). Central Role of Toll-Like Receptor 4 Signaling and Host Defense in Experimental Pneumonia Caused by Gram-Negative Bacteria. *Society*, 73(1), 532-545. doi:10.1128/IAI.73.1.532

Shah, C., Hari-Dass, R., & Raynes, J. G. (2006). Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood*, 108(5), 1751-7. doi:10.1182/blood-2005-11-011932

Shah, P., Briles, D. E., King, J., Hale, Y., & Swiatlo, E. (2009). Mucosal immunization with polyamine transport protein D (PotD) protects mice against nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae*. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 234(4), 403-9. doi:10.3181/0809-RM-269

Shornick, L. P., Wells, A. G., Zhang, Y., Patel, A. C., Huang, G., Takami, K., Sosa, M., et al. (2008). Airway epithelial versus immune cell Stat1 function for innate defense against respiratory viral infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(5), 3319-28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292557>

Shortman, K., & Liu, Y.-J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews. Immunology*, 2(3), 151-61. doi:10.1038/nri746

Shrivastava, R., & Miller, J. F. (2009). Virulence factor secretion and translocation by *Bordetella* species. *Current opinion in microbiology*, 12(1), 88-93. doi:10.1016/j.mib.2009.01.001

Shumilla, J. A., Lacaille, V., Hornell, T. M. C., Huang, J., Narasimhan, S., Relman, D. A., & Mellins, Elizabeth D, et al. (2004). *Bordetella pertussis* infection of primary human monocytes alters HLA-DR expression. *Infection and immunity*, 72(3), 1450-62. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=356037&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Skerrett, S. J., Wilson, C. B., Liggitt, H. D., M, A., Wu, Q., Jiang, D., Minor, M. N., et al. (2006). Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292(1), 312-322. doi:10.1152/ajplung.00250.2006

Spensieri, F., Fedele, G., Fazio, C., Nasso, M., Stefanelli, P., Mastrantonio, P., & Ausiello, Clara Maria, et al. (2006). *Bordetella pertussis* inhibition of interleukin-12 (IL-12) p70 in human monocyte-derived dendritic cells blocks IL-12 p35 through adenylate cyclase toxin-dependent cyclic AMP induction. *Infection and immunity*, 74(5), 2831-8. doi:10.1128/IAI.74.5.2831-2838.2006

Srivastava, I., Goodsell, A., Zhou, F., Sun, Y., Burke, B., Barnett, S., & Vajdy, M. (2008). Dynamics of acute and memory mucosal and systemic immune responses against HIV-1 envelope following immunizations through single or combinations of mucosal and systemic routes. *Vaccine*, 26(22), 2796-806. doi:10.1016/j.vaccine.2007.11.083

Standiford, T. J., & Deng, J. C. (2004). Immunomodulation for the prevention and treatment of lung infections. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 25(1), 95-108. doi:10.1055/s-2004-822309

Stokley, S., Cohn, A., Dorell, C., Hariri, S., Yankey, D., Messonnier, N., & Wortley, P. M. (2011). Adolescent Vaccination-Coverage Levels in the United States: 2006-2009. *Pediatrics*, 128(6), 1078-86. doi:10.1542/peds.2011-1048

- Storsaeter, J, Hallander, H. O., Gustafsson, L., & Olin, P, et al. (1998). Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine*, *16*(20), 1907-16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9796042>
- Storsaeter, Jann, & Wolter, J. (2006). Is there a need for a new generation of vaccines against pertussis? *Expert opinion on emerging drugs*, *11*(2), 195-205. doi:10.1517/14728214.11.2.195
- Storsaeter, Jann, Hallander, H. O., Gustafsson, L., & Olin, P. (2003). Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine*, *21*(25-26), 3542-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12922081>
- Strindelius, L., Filler, M., & Sjöholm, I. (2004). Mucosal immunization with purified flagellin from *Salmonella* induces systemic and mucosal immune responses in C3H/HeJ mice. *Vaccine*, *22*(27-28), 3797-808. doi:10.1016/j.vaccine.2003.12.035
- Sun, J.-B., Czerkinsky, C., & Holmgren, J. (2010). Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit. *Scandinavian journal of immunology*, *71*(1), 1-11. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02321.x
- Takabayshi, K., Corr, M., Hayashi, T., Redecke, V., Beck, L., Guiney, D., Sheppard, D., et al. (2006). Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity*, *24*(4), 475-87. doi:10.1016/j.immuni.2006.02.008
- Takamura, S., Roberts, A. D., Jelley-Gibbs, D. M., Wittmer, S. T., Kohlmeier, J. E., & Woodland, D. L. (2010). The route of priming influences the ability of respiratory virus-specific memory CD8+ T cells to be activated by residual antigen. *The Journal of experimental medicine*, *207*(6), 1153-60. doi:10.1084/jem.20090283
- Takeuchi, O, Hoshino, K., & Akira, S. (2000). Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *165*(10), 5392-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11067888>
- Taranger, J., Trollfors, B., Lagergård, T., Sundh, V., Bryla, D. A., Schneerson, R., & Robbins, J B, et al. (2000). Correlation between pertussis toxin IgG antibodies in postvaccination sera and subsequent protection against pertussis. *The Journal of infectious diseases*, *181*(3), 1010-3. doi:10.1086/315318
- Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux, V. J. F., Maillet, I., Akira, S., Ryffel, B., et al. (2004). Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and immunity*, *72*(4), 2131-9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=375211&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Torres, J., Godoy, P., Artigues, A., Codina, G., Bach, P., Mòdol, I., Duró, M. À., et al. (2011). [Outbreak of whooping cough with a high attack rate in well-vaccinated children and adolescents]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, *29*(8), 564-7. doi:10.1016/j.eimc.2011.04.005
- Traeger, T., Kessler, W., Hilpert, A., Mikulcak, M., Entleutner, M., Koerner, P., Westerholt, A., et al. (2009). Selective depletion of alveolar macrophages in polymicrobial sepsis increases lung injury, bacterial load and mortality but does not affect cytokine release. *Respiration; international review of thoracic diseases*, *77*(2), 203-13. doi:10.1159/000160953
- Tseng, J., Do, J., Widdicombe, J. H., & Machen, T. E. (2006). Innate immune responses of human tracheal epithelium to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin, TNF-alpha, and IL-1beta. *American journal of physiology. Cell physiology*, *290*(3), C678-90. doi:10.1152/ajpcell.00166.2005
- Tuvim, M. J., Evans, S. E., Clement, C. G., Dickey, B. F., & Gilbert, B. E. (2009). Augmented lung inflammation protects against influenza A pneumonia. *PLoS one*, *4*(1), e4176. doi:10.1371/journal.pone.0004176
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B.-G., Jung, Y.-J., Nishiyama, M., Sato, S., et al. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature immunology*, *9*(7), 769-76. doi:10.1038/ni.1622

- Ulloa-Gutierrez, R., Hozbor, D., Avila-Aguero, M. L., Caro, J., Wirsing von König, C.-H., Tan, T., & Plotkin, S. (2010). The global pertussis initiative: Meeting report from the regional Latin America meeting, Costa Rica, 5-6 December, 2008. *Human Vaccines*, 6(11), 876-880. doi:10.4161/hv.6.11.13077
- Vajdy, M., & Singh, M. (2005). The role of adjuvants in the development of mucosal vaccines. *Expert opinion on biological therapy*, 5(7), 953-65. doi:10.1517/14712598.5.7.953
- Van Snick, J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annual review of immunology*, 8, 253-78. doi:10.1146/annurev.iy.08.040190.001345
- Vandebriel, R. (2003). Association of Bordetella pertussis with host immune cells in the mouse lung. *Microbial Pathogenesis*, 35(1), 19-29. doi:10.1016/S0882-4010(03)00087-1
- Vermaelen, K., & Pauwels, R. (2003). Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 29(3 Pt 1), 405-9. doi:10.1165/rcmb.2003-0008OC
- Vermaelen, K., & Pauwels, R. (2004). Accurate and simple discrimination of mouse pulmonary dendritic cell and macrophage populations by flow cytometry: methodology and new insights. *Cytometry. Part A*: the journal of the International Society for Analytical Cytology, 61(2), 170-77. doi:10.1002/cyto.a.20064
- Versteegh, F G A, Schellekens, J. F. P., Nagelkerke, A. F., & Roord, J. J. (2002). Laboratory-confirmed reinfections with Bordetella pertussis. *Acta paediatrica (Oslo, Norway*: 1992), 91(1), 95-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11885549>
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., & Gewirtz, A. T. (2008). Toll like receptor-5: protecting the gut from enteric microbes. *Seminars in immunopathology*, 30(1), 11-21. doi:10.1007/s00281-007-0100-5
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Sanders, C. J., Frias, A., Sloane, V. M., Xu, J., Neish, A. S., et al. (2008). Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.*: 1950), 180(12), 8280-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523294>
- Vujanic, A., Wee, J. L. K., Snibson, K. J., Edwards, S., Pearse, M., Quinn, C., Moloney, M., et al. (2010). Combined mucosal and systemic immunity following pulmonary delivery of ISCOMATRIX adjuvanted recombinant antigens. *Vaccine*, 28(14), 2593-7. doi:10.1016/j.vaccine.2010.01.018
- Wang, X., Moser, C., Louboutin, J.-P., Lysenko, E. S., Weiner, D. J., Weiser, J. N., & Wilson, J. M. (2002). Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to Haemophilus influenzae infection in mouse lung. *Journal of immunology (Baltimore, Md.*: 1950), 168(2), 810-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777976>
- Weiss, D. S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., & Zychlinsky, A. (2004). Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *Journal of immunology (Baltimore, Md.*: 1950), 172(7), 4463-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034062>
- Wendelboe, A. M., Van Rie, A., Salmaso, S., & Englund, J. A. (2005). Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *The Pediatric infectious disease journal*, 24(5 Suppl), S58-61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15876927>
- West, A. P., Koblansky, A. A., & Ghosh, Sankar, et al. (2006). Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annual review of cell and developmental biology*, 22, 409-37. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.115827
- Who Publication. (2011). Pertussis vaccines: WHO position paper-Recommendations. *Vaccine*, 29(13), 2355-6. doi:10.1016/j.vaccine.2010.11.059
- Wieland, C W, van Lieshout, M. H. P., Hoogendijk, A. J., & van der Poll, et al. (2011). Host defence during Klebsiella pneumoniae relies on haematopoietic-expressed Toll-like receptors 4 and 2. *The European respiratory journal*: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology, 37(4), 848-57. doi:10.1183/09031936.00076510

- Williams, J. P., Weiser, M. R., Pechet, T. T., Kobzik, L., Moore, F. D., & Hechtman, H. B. (1997). alpha 1-Acid glycoprotein reduces local and remote injuries after intestinal ischemia in the rat. *The American journal of physiology*, 273(5 Pt 1), G1031-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9374699>
- Wilson, R., Read, R., Thomas, M., Rutman, A., Harrison, K., Lund, V., Cookson, B., et al. (1991). Effects of Bordetella pertussis infection on human respiratory epithelium in vivo and in vitro. *Infection and immunity*, 59(1), 337-45. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=257746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wirsing von König, C. H., & Riffelman, M. (2007). Pertussis: an old disease in new clothes. *Euro surveillance*: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin, 12(9), E1-2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17991412>
- Wolfe, D. N., Mann, P. B., Buboltz, A. M., & Harvill, E. T. (2007). Delayed Role of Tumor Necrosis Factor – a in Overcoming the Effects of Pertussis Toxin. *Immunity*, 16802. doi:10.1086/521303
- Wong, J. P., Christopher, M. E., Viswanathan, S., Karpoff, N., Dai, X., Das, D., Sun, L. Q., et al. (2009). Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection. *Vaccine*, 27(25-26), 3481-3. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.048
- Wu, H. Y., Nahm, M. H., Guo, Y., Russell, M. W., & Briles, D. E. (1997). Intranasal immunization of mice with PspA (pneumococcal surface protein A) can prevent intranasal carriage, pulmonary infection, and sepsis with Streptococcus pneumoniae. *The Journal of infectious diseases*, 175(4), 839-46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9086139>
- Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., et al. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nature immunology*, 8(3), 294-303. doi:10.1038/ni1434
- Yamamoto, Masahiro, Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., et al. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5633), 640-3. doi:10.1126/science.1087262
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., et al. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1626-9. doi:10.1126/science.1109893
- Yu, F.-S., Cornicelli, M. D., Kovach, M. a, Newstead, M. W., Zeng, X., Kumar, A., Gao, N., et al. (2010). Flagellin Stimulates Protective Lung Mucosal Immunity: Role of Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide. *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)*. doi:10.4049/jimmunol.1000509
- Zhang, X., Goel, T., Goodfield, L. L., Muse, S. J., & Harvill, E. T. et al. (2011). Decreased Leukocyte Accumulation and Delayed Bordetella pertussis Clearance in IL-6^{-/-} Mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)*, 186(8), 4895-904. doi:10.4049/jimmunol.1000594
- Zhang, X., Hester, S. E., Kennett, M. J., Karanikas, A. T., Bendor, L., Place, D. E., & Harvill, E. T. et al. (2011). Interleukin-1 receptor signaling is required to overcome the effects of pertussis toxin and for efficient infection- or vaccination-induced immunity against Bordetella pertussis. *Infection and immunity*, 79(1), 527-41. doi:10.1128/IAI.00590-10
- Zhao, Yuan, De Trez, C., Flynn, R., Ware, C. F., Croft, M., & Salek-Ardakani, S. (2009). The adaptor molecule MyD88 directly promotes CD8 T cell responses to vaccinia virus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)*, 182(10), 6278-86. doi:10.4049/jimmunol.0803682
- Zhu, J., & Mohan, C. (2010). Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. *Mediators of inflammation*, 2010, 781235. doi:10.1155/2010/781235
- Zielinski, C. E., Corti, D., Mele, F., Pinto, D., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2011). Dissecting the human immunologic memory for pathogens. *Immunological reviews*, 240(1), 40-51. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.01000.x

- Zuercher, A. W., Horn, M. P., Wu, H., Song, Z., Bundgaard, C. J., Johansen, H. K., Høiby, N., et al. (2006). Intranasal immunisation with conjugate vaccine protects mice from systemic and respiratory tract infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*, *24*(20), 4333-42. doi:10.1016/j.vaccine.2006.03.007
- Zygmunt, B. M., Rharbaoui, F., Groebe, L., & Guzman, Carlos A, et al. (2009). Intranasal immunization promotes th17 immune responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *183*(11), 6933-8. doi:10.4049/jimmunol.0901144
- de Gouw, D., Diavatopoulos, D. a, Bootsma, H. J., Hermans, P. W. M., & Mooi, Frits R, et al. (2011). Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS microbiology reviews*, *35*(3), 441-74. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00257.x
- de Greeff, S C, Mooi, F. R., Schellekens, J. F. P., & de Melker, H. E. (2008). Impact of acellular pertussis preschool booster vaccination on disease burden of pertussis in The Netherlands. *The Pediatric infectious disease journal*, *27*(3), 218-23. doi:10.1097/INF.0b013e318161a2b9
- de Greeff, S C, Mooi, F. R., Westerhof, A., Verbakel, J. M. M., Peeters, M. F., Heuvelman, C. J., Notermans, D. W., et al. (2010). Pertussis disease burden in the household: how to protect young infants. *Clinical infectious diseases* □: *an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *50*(10), 1339-45. doi:10.1086/652281
- de Melker, Hester E, Versteegh, F. G. A., Schellekens, J. F. P., Teunis, P. F. M., & Kretzschmar, Mirjam, et al. (2006). The incidence of *Bordetella pertussis* infections estimated in the population from a combination of serological surveys. *The Journal of infection*, *53*(2), 106-13. doi:10.1016/j.jinf.2005.10.020
- van der Poll, T., & Opal, S. M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, *374*(9700), 1543-56. Elsevier Ltd. doi:10.1016/S0140-6736(09)61114-4