

**ESTUDIO DE LINFOCITOS T ANÉRGICOS EN LA RESPUESTA INMUNE A
ROTAVIRUS**



MARÍA FERNANDA JÁCOME HERNÁNDEZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
BOGOTÁ D.C. 2012**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Marta Mesa por enseñarme y orientarme en la construcción de mi conocimiento, por dedicar horas enteras en mi proceso de aprendizaje y aportar con su conocimiento invaluable a la formación de mi carrera profesional

A la Doctora Juanita Angel y al Doctor Manuel Franco por permitirme trabajar en su laboratorio y conocer de cerca este mundo maravilloso de la investigación.

A mi familia por su comprensión y estímulo constante, además de su apoyo incondicional a lo largo de mis estudios y a todas las personas que de una u otra forma me apoyaron en la realización de este trabajo

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la presencia de LT de memoria anérgicos específicos de RV en adultos sanos

Materiales y métodos: Se recolectaron muestras de sangre periférica con heparina de adultos sanos para separar CMSP (Células Mononucleares de Sangre Periférica) que fueron cultivadas con TLPs (1ug/ml) de RRV o dializados (control negativo) en presencia de Acs monoclonales Anti-CD28 y Anti CD49d y de IL-2r (0, 50 y 100UI/ml), IL-12 (5ng/ml) ó DGKi- α (25 μ M), durante 10h en presencia de brefeldina 5 μ g/ml y monensina 5 μ g/ml (últimas 5h). Los porcentajes de LT-RV productores de citocinas TNF- α , IL-2, IFN- γ ó IL-13 fueron evaluados mediante tinción con Ac monoclonales fluorescentes y citometría de flujo.

Resultados: Se observaron incrementos significativos en las frecuencias de LTCD3+, LTCD3+LTCD4+ y LTCD3+LTCD8+ específicos de RV secretores de IFN- γ + en presencia de 100UI/ml de IL-2r (IL-2 recombinante) y de LTCD8-RV IFN- γ + con 5 ng/ml de IL-12r (IL-2 recombinante); no se observaron diferencias significativas en los cultivos con DGKi- α . Tanto IL-2 como IL-12 y el DGKi incrementaron también la frecuencia de LT IFN- γ + inespecíficos.

Conclusión: El incremento de las frecuencias de LT secretores de IFN- γ + en los cultivos de CMSP estimulados con RV en presencia de IL-2r ó de IL-12r sugieren la posible existencia de LT anérgicos específicos del virus; sin embargo estos hallazgos requieren confirmación de dicha especificidad.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION	7
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GENERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	10
3. JUSTIFICACION	11
4. MARCO TEORICO	12
4.1 ROTAVIRUS	12
4.1.1 Estructura	12
4.1.2 Fisiopatología de la infección por RV en humanos	12
4.1.3 Manifestaciones clínicas	14
4.2 RESPUESTA INMUNE CONTRA RV	14
4.3 LT ANÉRGICOS	20
4.4 REVERSIÓN DE LA ANERGIA CON IL-2	21
4.5 REVERSIÓN DE ANERGIA CON IL-12	22
4.6 REVERSIÓN DE ANERGIA CON EL INHIBIDOR DE LA DGK- α (DGKi)	23
5. METODOLOGÍA	25
5.1. PRODUCCION DE RRV	25
5.1.1 Cultivo de células MA104	25
5.1.2 Purificación de partículas virales de triple capa (TLPs)	25
5.1.3 Titulación de las TLPs	26
5.1.4 Cuantificación de proteínas de las TLPs	27
5.2 CULTIVO DE CMSP CON RV	27
5.2.1 Muestras de sangre	27
5.2.2 ELISA para medir Acs IgG específicos de RV en suero	28
5.2.3 Obtención de CMSP	28
5.2.4 Estímulo (primer día)	29
5.2.5 Tinción (segundo día)	29
5.2.6. Controles de citometria	30
5.3 ANÁLISIS DE DATOS	31
6. RESULTADOS	32
6.1 Voluntarios sanos	32
6.2 Reversión de anergia con IL-2	32
6.2.1 Estandarización del ensayo para la reversión de anergia con IL-2	32
6.2.2 Efecto de la IL-2 sobre la frecuencia de LT-RV	34
6.3 Reversión de anergia con IL-12	37
6.3.1 Estandarización del ensayo para la reversión de anergia con IL-12	37
6.3.2 Efecto de la IL-12r sobre la frecuencia de LT-RV	39
6.4 Reversión de anergia con DGKi- α	41
6.4.1 Estandarización del ensayo para la reversión de anergia con DGKi- α	41
6.4.2 Efecto de la DGKi- α sobre la frecuencia de LT-RV	43
7. DISCUSIÓN	47
8. BIBLIOGRAFIA	51

1. INTRODUCCIÓN

La infección por Rotavirus (RV) es una de las principales causas de gastroenteritis (GE) severa en niños menores de 5 años (Parashar et al., 2006) y aunque las vacunas previenen las manifestaciones clínicas (Angel et al., 2007), no protegen de reinfección. Esto ha llevado a pensar que si bien se genera una respuesta inmunológica de memoria, ésta no es esterilizante de modo que no protege al individuo frente a un segundo encuentro con el virus.

El estudio de los Linfocitos T (LT) de memoria específicos de RV (LT-RV) ha mostrado que las frecuencias de LT-RV CD4+IFN- γ + y de LT-RV CD8+IFN- γ + circulantes en adultos son comparables a las de LT IFN- γ + específicos de otros virus que causan infecciones agudas; sin embargo, las frecuencias de LTCD4+IFN- γ + y LTCD8+IFN- γ + en niños son muy bajas o inferiores al límite de detección (0,02%) (Jaimes et al., 2002; Mesa et al., 2010). Diversas hipótesis se han planteado para explicar la baja frecuencia de LT específicos de RV en los niños.

Hipótesis 1: RV puede evadir la respuesta inmune alterando la función de las Células dendríticas (CD); sin embargo, en un estudio con CD mieloides derivadas de monocitos (CDmo) se encontró que RV no inducía su apoptosis, no alteraba la maduración de las CD inmaduras (CDi), no modificaba el fenotipo de las CD maduras (CDm), no alteraba la participación de las CDm en la estimulación policlonal (con enterotoxina de *Staphylococcus aureus* /SEB) ni específica de RV de LTCD4+ autólogos, ni tampoco modificaba la capacidad de las CDi de estimular LTCD4+ vírgenes alogénicos en cultivo (Narvaez et al., 2005). Estos estudios fueron realizados con CDm de adultos, pero su relevancia en el procesamiento y presentación de Antígenos (Ags) de RV por CD de niños no ha sido establecida; sin embargo los defectos reportados en las CD de niños utilizando otros patógenos enfatizan

la necesidad de realizar estudios similares con CD de niños (Krumbiegel et al., 2007; Upham et al., 2006; Velilla et al., 2006).

Hipótesis 2: RV altera la producción de IFN- α secretado por las CD plasmacitoides (CDp), que también participan en la activación y polarización de los LT vírgenes (Liu, 2005). En CDp de adultos cultivadas en presencia de RV se observó que una subpoblación de CDp, permisiva a la infección por RV, secretaba menos IFN- α que las CDp no infectadas (Deal et al., 2010); sin embargo, las CDp circulantes de niños con GE-RV no presentan evidencia de infección por el virus, analizada como expresión de la proteína viral NSP4 (Mesa et al., 2007). Por otro lado y aunque se ha observado que las CDp participan en la activación de LT-RV IFN- γ + de memoria (Mesa et al., 2007), hacen falta estudios sobre el papel de esta población celular en la activación de LT-RV vírgenes.

Hipótesis 3: RV puede inducir LT secretores de citocinas diferentes a IFN- γ +, IL-13 (Jaimes Jvirology 2002), IL-10 e IL-17 (Mesa et al., 2010).

Hipótesis 4: Las bajas frecuencias de LT son reflejo de la linfopenia absoluta observada en niños en algunos estudios; sin embargo; los LT-RV CD4+IFN- γ + son similares en niños con recuentos normales o bajos de linfocitos circulantes (Mesa et al., 2010).

Hipótesis 5: Las bajas frecuencias de LT-RV IFN- γ + están asociadas a LT reguladores (LTreg); sin embargo, aunque la remoción de LTreg CD4+CD25+ y el bloqueo del TGF- β en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de adultos reveló una mayor frecuencia de LT-RV IFN- γ +; la inhibición del TGF- β en cultivos similares de niños no evidenció la existencia de un mecanismo regulador mediado por esta citocina (Mesa et al., 2010).

Hipótesis 6: Las bajas frecuencias de LT-RV en niños podían ser el resultado de la presencia de LT anérgicos; esta hipótesis está sustentada en los siguientes antecedentes:

Antecedente 1: Por su naturaleza de patógeno entérico, es probable que la inmunidad contra RV generada en el ambiente tolerogénico del tejido linfoide asociado al intestino (TLAI) incluya mecanismos moduladores de la respuesta efectora, tales como la inducción de LT anérgicos (Nagler-Anderson and Shi, 2001; Pabst et al., 2007; Roncarolo et al., 2001); adicionalmente se ha mostrado, que los LT de memoria se pueden anergizar cuando son reestimulados con CD tolerizadas con IL-10/TGF- β (Torres-Aguilar et al., 2010) producidas por CD del TLAI (Coombes and Powrie, 2008).

Antecedente 2: Las elevadas antigenemia y viremia observadas en niños infectados por RV (Blutt et al., 2007) pueden producir una inactivación de los LT específicos de Ag (Goubier et al., 2008)

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la existencia de LT anérgicos específicos de RV en la sangre de adultos sanos, como un paso preliminar de estandarización de protocolos de laboratorio y de análisis para ser aplicados posteriormente en la evaluación de estas células en la sangre de niños menores de dos años con infección natural ó vacunados con RV.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de LT de memoria anérgicos específicos de RV en adultos sanos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Evaluar el efecto de IL-2 sobre la frecuencia de LT de memoria circulantes específicos de RV en adultos sanos.
- 2.** Evaluar el efecto de IL-12 sobre la frecuencia de LT de memoria circulantes específicos de RV en adultos sanos.
- 3.** Evaluar el efecto del inhibidor de la diacilglicerol cinasa alfa (DGKi) sobre la frecuencia de LT de memoria circulantes específicos de RV en adultos sanos.

3. JUSTIFICACIÓN

RV es el principal agente etiológico de GE aguda en la población infantil a nivel mundial (Parashar et al., 2006). Antes de la introducción de las vacunas Rotarix y RotaTeq en los planes de inmunización de varios países, entre los años 1990 y 2000 RV causaba la muerte de aproximadamente 1200 niños cada día, especialmente en los países más pobres de África y Asia; en el mismo período de tiempo se reportaron 111 millones de episodios de diarrea por año, 25 millones de visitas clínicas, 2 millones de hospitalizaciones y 352,000-592,000 muertes por año en niños menores de 5 años a nivel mundial (Parashar et al., 2003). En el 2008 la Organización Mundial para la Salud reportó 453,000 muertes de niños a nivel mundial principalmente en países de África (http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/rotavirus_estimates/en/index.html consultado el 9 de septiembre del 2012). En Colombia, en los años 2003 - 2004 en Bogotá, Barranquilla y Cali se detectó a RV como causa de diarrea en el 50% de los casos siendo motivo de 16 hospitalizaciones/1000 y 1 muerte/2000 niños (Caceres et al., 2006). De modo similar a la infección natural, las vacunas de RV protegen a la persona de diarrea severa pero no la protegen de reinfección, y aunque se genera respuesta inmunológica, ésta no es permanente para proteger al individuo ante un segundo encuentro con el virus. Estas observaciones plantean la necesidad de continuar estudiando los mecanismos de inducción y mantenimiento de la inmunidad contra RV por las implicaciones que este conocimiento puede tener en el desarrollo de mejores métodos de prevención.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. ROTAVIRUS

4.1.1 Estructura

RV pertenece a la familia *Reoviridae*. Es un virus desnudo, su genoma consiste de 11 segmentos génicos de Ácido Ribonucleico de doble cadena (ARNdc) que codifican para 6 proteínas estructurales (VP) y 6 no estructurales (NSP). La cápside icosaédrica del virión está compuesta por 6 proteínas que se organizan en tres capas concéntricas: interna, intermedia y externa; la capa interna está conformada por VP1, VP2 y el genoma; la intermedia por VP6 y la externa por las proteínas VP7 y VP4 (Ramig, 2007). Las partículas virales infecciosas completas o de tres capas (TLPs, por su abreviatura en inglés: Triple Layer Particles) cuando se tratan *in vitro* con quelantes de calcio, como tripsina, liberan la capa externa de VP4 y VP7 generando partículas de doble capa (DLPs, por su abreviatura en inglés: double layer particles) no infecciosas (Angel et al., 2007).

4.1.2 Fisiopatología de la infección por RV en humanos

RV es transmitido por ruta oro-fecal e infecta células de las vellosidades del intestino delgado (enterocitos).

La infección por RV causa la destrucción de los enterocitos provocando una disminución de los procesos absortivos y pérdida de enzimas que degradan los polisacáridos en monómeros de glucosa necesarios para la célula. Al no ingresar estos azúcares al interior del enterocito se produce un aumento de lactosa y glucosa en la luz intestinal, los cuales ejercen presión osmótica, es decir, aumentan la salida de agua y electrolitos al espacio extracelular, provocando un desequilibrio hidroelectrolítico; por otro lado, se produce aumento de la motilidad intestinal; y todos estos fenómenos en conjunto conllevan a la producción de diarrea acuosa (Lundgren and Svensson, 2001). Estos procesos pueden

estar mediados por la proteína viral NSP4, la cual se comporta como una enterotoxina que eleva la concentración de calcio intracelular provocando la ruptura de las uniones intercelulares y el escape de líquido; en las células de la cripta, se produce un incremento en la secreción de Cl⁻ y agua; además, NSP4 produce activación del sistema nervioso entérico aumentando la secreción de agua y electrolitos (Ramig, 2007).

Tabla 1. Características y funciones de las proteínas de RV (Angel et al., 2007).

PROTEÍNA	CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES
VP1 (pol)	Polimerasa de ARN dependiente de ARN
VP2	Unión no específica a ARN, necesaria para la actividad replicasa de VP1
VP3	Guanililtransferasa, metiltransferasa, proteína básica, hace parte del complejo de transcripción del virión
VP4 (VP5 y VP8)	Hemaglutinina Se une a los receptores celulares <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> y media la entrada de los virus a la célula blanco Genera Ac neutralizantes anti-VP4 Clivada por tripsina en: VP5: permeabiliza la membrana de la célula blanco y facilita la entrada del virión a la célula blanco VP8: hemaglutinina altamente variable (contiene los Ag del serotipo P)
VP6	Proteína más abundante del virión Su variabilidad determina los Ag del grupo A-G Necesaria para la transcripción
VP7	Proteína más abundante de la capa externa con alto grado de glicosilación Fija Ca ⁺⁺ Su variabilidad determina los Ag del serotipo G Genera Ac neutralizantes Anti-VP7
NSP1	Proteína de más alta variabilidad en los RV Inhibe la producción de Interferón tipo I
NSP2	Actividad de NTPasa y helicasa, esencial en la síntesis de dsARN Cataliza el empaquetamiento del ARNm en estructuras tipo core
NSP3	Unión al ARN y regulación traduccional
NSP4	Proteína viral que se ubica en la membrana del RER para actuar como receptor de las DLP gemantes y VP4 modula los niveles intracelulares de Ca y la replicación del ARN actividad de enterotoxina
NSP5	Unión a NSP2 y NSP6 Kinasa autocatalítica; se une a ARN cs Componente del viroplasma; esencial para la replicación viral
NSP6	Unión a NSP5 Componente del viroplasma

Además de la infección a nivel intestinal puede ocurrir también la diseminación de Ags de RV o de partículas virales a otros tejidos (Ramig, 2007) y de hecho, una elevada antigenemia y viremia se han detectado en niños durante la primoinfección por RV (Blutt et al., 2003; Blutt et al., 2007).

4.1.3 Manifestaciones clínicas

El periodo de incubación de RV en niños es de 24 a 48h y puede ser más prolongado en adultos, antes de la aparición de GE aguda. Las manifestaciones clínicas se presentan como episodios repetitivos de diarrea acuosa, vómito, fiebre y deshidratación (Ramig, 2007). La enfermedad es más grave en niños de 6 a 24 meses de edad y generalmente es autolimitada con una duración de 4 a 8 días ó de 4 a 12 días cuando requiere hospitalización.

Un aspecto importante es la infección extraintestinal por RV, la cual se asocia con manifestaciones sistémicas como hepatitis, neumonía, exantema y compromiso neurológico (Blutt et al., 2007)

4.2. RESPUESTA INMUNE CONTRA RV

Como se mencionó anteriormente, RV infecta los enterocitos siendo el TLAI el encargado de iniciar la respuesta inmune.

El TLAI está conformado por el epitelio asociado a folículos linfoides (EAF); las placas de Peyer (PP) que son agregados linfoides de LT y LB ubicados en la submucosa del intestino delgado; y los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) (Mowat, 2003).

En el EAF se encuentran unas células llamadas células M, las cuales permiten la entrada de RV a las PP, y las células presentadoras de antígenos (CPAs) allí que reconocen al virus, lo endocitan y procesan sus proteínas a péptidos que son ensamblados en las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH-II); posteriormente estas CPAs migran a los

NLM, donde presentan los complejos péptidos de RV-CMH-II a los LT vírgenes específicos de RV que pueden entonces ser activados hacia LT efectores y LT de memoria (Butcher et al., 1999). Estos LT efectores y LT de memoria específicos de RV presentes en los NLM salen por los vasos linfáticos eferentes para llegar al conducto torácico y desembocar en la circulación sanguínea para migrar a la lámina propia del intestino delgado. La migración de los LT está mediada por la integrina $\alpha_4\beta_7$ y el CCR9 (Mowat, 2003). Durante la inflamación a nivel intestinal el ligando para la $\alpha_4\beta_7$ integrina, la molécula de adhesión celular adresina de la mucosa 1 (MAdCAM1), localizada en el endotelio de las vénulas post capilares del intestino es sobre-expresada permitiendo el tráfico de LT hacia el intestino y adicionalmente la interacción entre el CCR9 y su ligando, la quimiocina CCL25, producida en la lámina propia del epitelio intestinal, regula el tráfico hacia ese órgano (Butcher et al., 1999; Kunkel and Butcher, 2002). En humanos, algunos de los LT de memoria circulantes específicos de Rotavirus expresan la integrina $\alpha_4\beta_7$ (Rott et al., 1997).

En los primeros años de vida, pocos días después de una infección natural por RV, se detectan Acs IgM, IgG e IgA específicos en suero e IgA en heces y algunos estudios muestran que la IgA en suero es un marcador de protección de enfermedad severa; aunque, por razones desconocidas no es una respuesta permanente (Angel et al., 2007).

En cuanto a la respuesta de los LT, se ha observado que los LT-RV son detectables *in vitro* en ensayos de proliferación en etapas iniciales de la enfermedad; esta respuesta desaparece al cabo de un año en niños con gastroenteritis aguda (Offit et al., 1992); en algunos niños de 5 años y adultos, la linfoproliferación frente a Acs de RV es más estable, tal vez por el contacto repetido con el virus (Offit et al., 1992). En adultos sanos se han observado frecuencias bajas de LTCD4+RV y LTCD8+RV que sintetizan IFN- γ y/ó IL-2; éstas frecuencias se incrementan en adultos con infección aguda e incluso en algunos de ellos se observan LT CD4+ IL-10+; la presencia de LT-RV IL-13+ ó IL-4+ es mucho menor o nula. En contraste con los adultos, en niños con GE-RV el número de LT-RV circulantes es

bajo o indetectable (menor al límite de detección de 0,02%) (Angel et al., 2007; Jaimes et al., 2002; Mesa et al., 2010).

Estas observaciones han llevado a concluir que RV no induce una buena respuesta de LT en humanos, especialmente en niños (Jaimes et al., 2002) y varias hipótesis se han planteado para explicar esta observación como se mencionó en la introducción. Una de las hipótesis que explicaría la baja frecuencia de LT-RV en niños es la existencia de LT-RV de memoria anérgicos. Esta hipótesis está sustentada en los siguientes antecedentes:

Antecedente 1: El ambiente tolerogénico del intestino puede inducir LT anérgicos

Las CD residentes del intestino son unas CPAs condicionadas por el ambiente tolerogénico del TIAI que conlleva a estas células a limitar la expresión de citocinas proinflamatorias promoviendo una respuesta reguladora, que logra así una supresión de la respuesta celular y humoral. La presencia de unas CPAs que controlen una respuesta inmune exacerbada es necesaria puesto que el intestino es un reservorio de diferentes Ags (las proteínas de la dieta, y la microflora comensal entre otras) que pueden desencadenar una respuesta inflamatoria dañina para el epitelio intestinal.

En el modelo murino se han identificado varios subtipos de CD capaces de modular la respuesta efectora de los LT; por ejemplo en el compartimento intestinal se han descrito las siguientes subpoblaciones:

CD de las PP: en modelo murino, las $CD11^{hi}CD11b^{+}CD8\alpha^{-}CD4^{-}$ (CD11b+); las $CD11^{hi}CD11b^{-}CD8\alpha^{+}CD4^{-}$ (CD8 α +) y las $CD11b^{-}CD8\alpha^{-}$; las primeras tienen una alta capacidad para producir IL-10 (citocina que inhibe la producción de IFN- γ y polarizar hacia una respuesta Th2 (IL-10, TGF- β e IL-4), mientras que las dos últimas producen IL-12 que favorece la producción de IFN- γ (Coombes and Powrie, 2008; Johansson and Kelsall, 2005; Scott et al., 2011).

CD de la lámina propia (LP): las CD103⁻ son CD que pueden captar Ags luminales y presentarlos a los LT vírgenes en los NLM, donde cumplen diferentes funciones como producir Ácido retinoico (AR), (derivado de la vitamina A), necesario para generar LTFOXP3⁺ por un mecanismo mediado por TGF- β (Jaensson et al., 2008; Scott et al., 2011). Otra de las funciones de las CD CD103⁺ es inducir la expresión de las moléculas CCR9 y $\alpha_4\beta_7$ en los LT. Esta propiedad ha sido observada en los LT de ratones y humanos (Jaensson et al., 2008).

El mecanismo por el cual las CD103⁺ capturan los Ag luminales no es aún conocido pero en un principio se pensaba que podían captar los Ag luminales a través de la extensión de pseudópodos entre los enterocitos hacia la superficie apical en un proceso dependiente del receptor 1 de la quemocina CX₃-C (CX3CR1) (Mowat, 2003); pero esa propiedad parece ser una función de los macrófagos CX3CR1 de la mucosa, los cuales pueden transferir los Ag a las CD103⁺ en la LP (Scott et al., 2011).

CD de NLM: las CD103⁻ son CD con actividad proinflamatoria porque tienen la capacidad de inducir una respuesta Th1 (Scott et al., 2011).

Otro grupo de CD son las CD plasmacitoides presentes en los NLMs que promueven la diferenciación de los LTCD4⁺ vírgenes a LTreg (Coombes and Powrie, 2008).

El ambiente tolerogénico del intestino puede inducir CD condicionadas

El ambiente tolerogénico del intestino puede ser el resultado de una respuesta reguladora contra bacterias comensales para prevenir una respuesta inmune exacerbada. Se ha reportado que la respuesta frente a estas bacterias puede inducir CD tolerizadas a través de diferentes mecanismos; uno de ellos es la producción de citocinas condicionantes por

las células epiteliales del intestino (CEIs) como la Linfopoyetina Estromal Tímica (TSLP, por su abreviatura en inglés), la IL-10 y el TGF- β . En modelos murinos se ha observado que la TSLP es capaz de promover la producción de TGF- β y AR por las CD, inhibir la producción de IL-12 y promover la expresión de IL-10 por las CD activadas y aumentar su capacidad para promover una respuesta Th2 (Artis, 2008; Rescigno, 2011; Rimoldi et al., 2005).

La IL-10 es una citocina inmunoreguladora que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6) y promueve la producción de TGF- β por parte de las CD (Artis, 2008); además, participa en la inducción de anergia y se ha observado que la activación de LTCD4+ en presencia de IL-10 o con CD tratadas con IL-10 resulta en la inducción de LT anérgicos que aunque movilizan calcio después de estimulación vía TCR no proliferan y estos LT no revierten ni en presencia de IL-2. Igualmente los LTCD8+ humanos activados con CPA alogénicas e IL-10 presentaron proliferación y citotoxicidad reducidas (Roncarolo et al., 2001).

El TGF- β es una citocina inmunoreguladora que controla la proliferación de los LT a través de la inhibición de genes dependientes de NF- κ B como la IL-2 e induce LTreg FOXP₃+ (Artis, 2008; Worthington et al., 2011).

Para verificar si en el contexto del microambiente intestinal, RV podía modificar la función de las CDm, se cultivaron CDI previamente tratadas con sobrenadante de células Caco-2 infectadas con RV de simio, RRV, con LT humanos de sangre periférica para comparar las frecuencias de LT-RV IFN- γ + inducidos en presencia y ausencia de CDI preconditionadas; los resultados mostraron una menor frecuencia de LTCD4+IFN- γ + en los cultivos realizados con CD condicionadas; además se observó que el efecto inhibitorio de las CD condicionadas era dependiente de TGF- β 1 (Rodríguez et al., 2012).

Otros estudios han reportado que bacterias comensales como *Lactobacillus spp*, *Bacteroides spp* y *Escherichia coli* pueden inhibir la activación de NFκB mediada por TLR expresados en los enterocitos o inhibir la degradación de Iκb limitando así la producción de citocinas proinflamatorias (Abreu, 2010; Rescigno, 2011).

En conjunto, estas observaciones sugieren que la respuesta de los LT puede estar modulada por los LTreg que se generan de manera eficiente en este ambiente tolerogénico; la remoción de LTreg CD4+CD25+, así como el bloqueo de la señalización del TGF-β en cultivos de CMSP con RV, incrementaron el porcentaje de LTCD4+RV y LTCD8+RV IFN-γ en adultos sanos (Mesa et al., 2010).

Antecedente 2: En niños con primo-infección por RV se observan elevados niveles de Ag de RV (Blutt et al., 2003) e incluso de partículas virales infecciosas en sangre periférica (Blutt et al., 2007); y los altos niveles de Ag se han asociado con inducción de LT anérgicos (Faria and Weiner, 2005).

La infección por RV es generalmente localizada en el intestino; sin embargo, varios estudios en los últimos 10 años han sugerido que RV puede causar infección sistémica, incluyendo hepatitis, nefritis, neumonía y complicaciones neurológicas como encefalitis. En el 2003 un estudio reportó que el 66% de los niños con muestras de heces positivas para RV presentaban antigenemia en la primera semana de la infección; además 3/6 muestras de suero de niños fueron positivas para ARN de RV detectado por PCR, sugiriendo la presencia de viriones intactos. En el mismo estudio se mostró que todas las muestras de suero de ratones sin contacto previo con RV inoculados con sueros de ratones infectados con RV se volvieron positivas para Ag y RNA de RV; es decir, que los sueros contenían partículas virales completas e infecciosas (Blutt et al., 2003).

Posteriormente, en el 2007, se reportó la presencia de Ags y partículas virales en muestras de suero de niños con GE por RV; el 90% de los niños con GE y heces positivas para RV y GE presentaron antigenemia o RNA de RV; además, comprobaron que el suero de estos niños contenía partículas infecciosas porque cultivos sucesivos (5 pases) de muestras de suero de 11 niños con GE por RV en líneas de células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29) mostraron focos de partículas virales (Blutt et al., 2007).

Las concentraciones elevadas de Ag pueden inducir anergia; se ha observado que la administración de Ag por vía oral en altas dosis produce inactivación de LT específicos de Ag (Faria and Weiner, 2005) y que las CDp del hígado que presentan haptenos de alimentos inducen anergia de LTCD8+ (Goubier et al., 2008). Estos estudios permiten postular que la elevada antigenemia de RV observada en niños con primoinfección puede producir una eliminación o inactivación (LT anérgicos) de los LT específicos del virus.

4.3 LT ANÉRGICOS

La anergia es un estado de hiporespuesta que un linfocito puede asumir luego de su encuentro con el Ag y es caracterizada y es caracterizada por un bloqueo en la señalización del TCR y la producción de IL-2 y la proliferación subsiguiente en respuesta a un re-estímulo completo (Choi and Schwartz, 2007). La anergia clonal representa un estado de bloqueo del crecimiento asociado con daño en la síntesis de citocinas como la IL-2 que tiene como consecuencia la incapacidad para proliferar y puede ser revertida por estimulación con IL-2 (Schwartz, 2003).

La inducción del estado anérgico fue inicialmente descrita como el resultado de la ausencia de señales coestimuladoras proporcionadas por la interacción entre CD80/CD86 de las CD con el receptor CD28 presente en los LT vírgenes. Cuando las CPAs presentan el Ag en moléculas del CMH-II al TCR del LT y las moléculas CD80/CD86 presentes en las CPAs se unen al coreceptor CD28 del LT se produce la activación de la fosfolipasa C γ (PLC γ) y de

la proteína quinasa C (PKC), dos enzimas que activan rutas de señalización intracelular mediadas por las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), las quinasas Jun (JNK), la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K/Akt) y la movilización de calcio intracelular (Chappert and Schwartz, 2010). Estas vías inducen a su vez la activación de factores de transcripción, NFAT-1, AP-1 y NF κ B, los cuales son importantes para la transcripción del gen de la IL-2 (Chappert and Schwartz, 2010). La activación del TCR en ausencia de CD28 produce un bloqueo en las vías de señalización anteriormente descritas que llevan a la falta de producción de IL-2 y a la inducción del estado anérgico (Radziewicz et al., 2010; Wells, 2009).

La anergia de los LT específicos de patógenos ha podido ser revertida en diferentes modelos experimentales. En este trabajo se propuso la utilización de algunas de ellas para evaluar si las bajas frecuencias de LT de memoria específicos de RV se relacionan con la presencia de LT anérgicos.

4.4 REVERSIÓN DE LA ANERGIA CON IL-2

Como se describió anteriormente, la ausencia de moléculas coestimuladoras lleva a la falta de producción de IL-2, un importante factor de crecimiento de los LT. Uno de los rasgos característicos de la anergia es la reversión en presencia de IL-2 exógena que actúa a través del receptor de la IL-2 (IL-2R) induciendo la activación de vías de señalización como la vía JAK3-Stat5 y MAPK (Wells, 2009).

La adición de IL-2 puede activar otras vías de señalización dependientes de IL-2R, que involucran a PI3K y mTOR/Akt. Se ha observado en LT CD4⁺ murinos que la proteína mTOR es capaz de bloquear a Ikaros, una proteína de anillo de zinc que se une al promotor del gen de la IL-2 impidiendo la unión de factores de transcripción necesarios para la producción de IL-2 (Wells, 2009). Si la vía mTOR/Akt se encuentra bloqueada esta proteína

no puede inhibir a Ikaros y ésta permanecerá unida al promotor de la IL-2. Así pues, al agregar IL-2 a los LT anérgicos la vía de señalización mTOR/Akt se desbloquea y ésta proteína puede unirse a Ikaros; la adición de IL-2 al cultivo de LT murinos previno la inducción de LT anérgicos mediante la inhibición de la expresión del gen Ikaros (Dure and Macian, 2009).

En modelos humanos se ha observado que la adición de IL-2 a cultivos de CPAs con LT específicos del virus de la hepatitis C (HCV) induce en las CD la expresión de CD86 que entonces genera la “señal 2” necesaria para que el LT se active adecuadamente, sintetice citocinas y prolifere (Radziewicz et al., 2010).

Otros estudios en humanos muestran que cuando se cultivan CMSP de pacientes positivos para el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) en presencia de IL-2, se produce un aumento en la proliferación de los LTCD4+ y LTCD8+ y de los LTCD4+ y LTCD8+, así como de la frecuencia de los LT-HIV CD4+ y LTCD8+ que secretan IFN- γ (Gu et al., 2007; Yu et al., 2006).

4.5 REVERSIÓN DE ANERGIA CON IL-12

La IL-12 secretada por las CPAs, especialmente por las CD activadas por el Ag, participa en la conversión de LTCD4+ vírgenes a LTCD4+ efectores y es un estímulo crucial para la secreción de IFN- γ por los LTh1 (Hilkens et al., 1997; Ylikoski et al., 2005).

Los estudios en humanos han mostrado que La IL-12 previene y revierte el estado anérgico de los LT. En el caso de los LT específicos de virus, es interesante la observación del efecto inhibitorio del IFN-I sobre la producción de IL-12 por las CD y el desarrollo de los LTh1 (McRae et al., 1998); por ejemplo, en los cultivos de CMSPs de pacientes VIH+, la

adición de IL-12 mostró que los LTCD4⁺ recuperaron la capacidad de proliferación y de síntesis de IFN- γ , de modo que pudieron ser detectados en mayor porcentaje (Dybul et al., 2000). Resultados similares fueron observados en cultivos de LT específicos de sarampión de adultos (Gans et al., 1999) y de niños (Gans et al., 2008) así como para LT específicos del virus de la Hepatitis B (VHB) (Szkaradkiewicz et al., 2005).

4.6 REVERSIÓN DE ANERGIA CON EL INHIBIDOR DE LA DGK- α (DGKi)

Cuando el LT es activado a través del TCR varias vías de señalización intracelular se activan para promover la traslocación al núcleo de los factores de transcripción NF- κ B, NFAT y AP-1, que son claves en la proliferación y síntesis de moléculas de un LT activado. Una de esas vías es la ruta de la fosfolipasa C gama 1 (PLC γ 1) que degrada el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP₂) a los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ aumenta la concentración de calcio intracelular que se une a la calmodulina y activa la fosfatasa calcineurina para activar a NFAT y promover su traslocación al núcleo de la célula. El DAG activa la PKC θ que induce la activación y traslocación de NF κ B y de Jun; además el DAG activa la molécula Ras, involucrada en la vía que fosforila las quinasas de proteínas asociadas con mitógenos (MAPK) que activan la traslocación de Fos; Fos y Jun conforman el factor de transcripción AP-1 (Chappert and Schwartz, 2010).

Cuando los tres factores de transcripción se traslocan al núcleo se unen a regiones promotoras de varios genes e inducen su transcripción; estos genes están a cargo de la proliferación y diferenciación del LT; uno de ellos es el gen de la IL-2. Cuando un LT es anérgico las rutas de señalización están parcialmente bloqueadas y además se produce la transcripción de varios genes que conforman un programa genético diferente que codifica las proteínas del estado anérgico; entre ellas, la enzima diacilglicerol quinasa alfa (DGK- α). Esta enzima degrada el DAG a ácido fosfatídico, de modo que la depleción del DAG inhibe la activación de Ras, NF κ B y NFAT y por lo tanto la síntesis de IL-2 (Fathman

and Lineberry, 2007). Algunos estudios en ratones han mostrado que la inhibición de la DGK- α revierte al LT de su estado anérgico a un estado efector.

En uno de estos trabajos se observó que los LTh1 murinos anérgicos sobre-expresaban el gen de DGK- α y que el bloqueo de esta enzima se relacionaba con la recuperación de la producción de IL-2 por los LTh1 anérgicos en una respuesta dosis dependiente (Zha et al., 2006). En otro estudio se observó que los LT dgk $\alpha^{-/-}$ de ratones estimulados con Anti-CD3 proliferaron notablemente en comparación con los LT de ratones silvestres y el bloqueo de la DGK- α , con el inhibidor R59022, de LT de ratones silvestres mostró un aumento en la producción de IL-2 (Olenchock et al., 2006).

5. METODOLOGÍA

5.1. PRODUCCION DE RRV

5.1.1 Cultivo de células MA104

Se cultivaron células epiteliales de riñón de mono, MA104, en medio DMEM (Invitrogen-GIBCO, Grand Island, NY) suplementado con HEPES 20mM (Invitrogen-GIBCO); Penicilina-estreptomicina glutamina 100X (Invitrogen-GIBCO); Ciprofloxacina 0,5µg/ml y Suero Fetal Bovino al 10% (SFB; Invitrogen-GIBCO).

Las células fueron infectadas con RRV activado con tripsina 2µg/mL (Sigma, St. Louis, MO) durante 48 horas y posteriormente sometidas a procesos de congelación a -70°C y descongelación para liberar las partículas virales. Luego los sobrenadantes se congelaron a -70°C hasta la purificación de las TLPs. De los cultivos se obtuvieron dos lotes de RRV los cuales se rotularon como p54 y p58.

5.1.2 Purificación de partículas virales de triple capa (TLPs)

Los lisados de las células MA104 infectados con RRV, p54 y p58, se centrifugaron a 10000 rpm (Allegra® X-12R, Beckman Coulter) durante 30 minutos para remover detritus celulares y los sobrenadantes obtenidos se ultracentrifugaron a 36000 rpm (L8-70M, Beckman Coulter) por 1h y 40 minutos a 4°C. Los “pellets” que contenían los virus se resuspendieron en tampón TNC pH=7 [Tris 10mM (BioRad, Hercules, CA), CaCl₂ 10mM (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), NaCl 140mM (Carlo Erba, Val de reuil, Paris)], se mezclaron con vertrel (MicroCare, New England, CT) y se centrifugaron a 10000 rpm (Eppendorf 5415R) durante 5 minutos a 4°C para liberar partículas virales retenidas en las membranas celulares. Los sobrenadantes con las partículas virales se separaron y los

“pellets” de membranas remanentes se sometieron a dos rondas adicionales de extracción con vertrel y centrifugación.

Finalmente, las TLPs se purificaron por centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio/CsCl (USB corporation, Santa clara, CA); para esto, se transfirió el sobrenadante con las partículas virales a tubos de polialómero y se mezcló con una solución de CsCl-TNC hasta llenar el 80% del tubo; se determinó el índice de refracción (IR) de esta mezcla hasta alcanzar un IR = 1,369 y se ultracentrifugó a 30500 rpm (L8-70M, Beckman Coulter) por 18h a 4°C. Cumplidas las 18h de ultracentrifugación se realizó la extracción de las bandas de TLPs y de DLPs.

5.1.3 Titulación de las TLPs

En placas de 96 pozos (Microtest tissue culture plate, BD Bioscience; San Diego, CA) se cultivaron células MA104 durante 48h a 37°C. Las TLPs purificadas de cada producción (p54 y p58) se activaron con tripsina 2µg/mL durante 30 minutos a 37°C y se diluyeron seriadamente 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625, 1/78125, 1/390625. Cada dilución de TLPs se cultivó por duplicado sobre las células MA104 simultáneamente con un control positivo de RRV y un control negativo (sin partículas virales) diluidos de modo similar. La placa se incubó por 16h a 37°C y finalmente las células se lavaron con PBS 1X estéril precalentado y se fijaron con metanol frío durante 20 minutos. Después de retirar el metanol y lavar la monocapa celular con PBS 1X se realizó la tinción para la detección de la proteína de RV, VP6; para esto, se utilizaron en secuencia los siguientes reactivos: Ac monoclonal anti-VP6 1/2000 (donación generosa de E. Kohli, Université de Dijon, France) 45 minutos a 37°C, Ac de cabra anti IgG de ratón acoplado a biotina 1/2000 (GAM biotina; KPL, Washington, WA) 45 minutos a 37°C, estreptavidina peroxidasa 1/1000 (KPL) 45 minutos a 37°C, AEC (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) hasta observar la aparición

de un color marrón en el control positivo; una vez se observó este color se adicionó agua de la llave y se realizó el recuento de células marcadas por pozo.

Tabla 2. Título de TLPs

P54	p58
$1,46 \times 10^8$ UFF/mL	$1,9 \times 10^8$ UFF/mL

5.1.4 Cuantificación de proteínas de las TLPs

Se realizó por el método del Ácido Bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific, Nuevo León, México) mediante nanoespectrofotometría utilizando una curva de calibración de Albúmina sérica bovina/BSA (Merck KGaA) de 0 a 500 µg/ml de TNC.

Tabla 3. Concentración de proteína en las preparaciones de TLPs

P54	p58
452,8 µg/mL	212,5 µg/mL

Para los ensayos de estimulación de los LT, se utilizaron TLPs (1 µg/ml) dializadas tres veces contra medio AIMV (GIBCO, Grands Island, NY), con una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm con el fin de remover el CsCl. El medio del tercer paso (dializado) se utilizó como control negativo.

5.2 CULTIVO DE CMSP CON RV

5.2.1 Muestras de sangre

Se recolectaron muestras de sangre periférica de voluntarios adultos sanos en tubo seco y con heparina previa firma de un consentimiento informado asignando a cada individuo un código numérico. La muestra del tubo seco se utilizó para separar suero que se conservó a

-70°C para análisis de Acs específicos de RV y la sangre heparinizada se utilizó para separar CMSP que se procesaron inmediatamente para los ensayos de estimulación de los LT con RV.

5.2.2 ELISA para medir Acs IgG específicos de RV en suero

Para la detección de Acs IgG específicos de RV, placas de 96 pozos se cubrieron con 70µl de sobrenadantes dil 1/10 en PBS de células MA104 infectadas con la cepa bovina de RV, RF ó sobrenadantes de células MA104 sin infectar (Mock ó control negativo) y se incubaron toda la noche a 4°C. Después de retirar los sobrenadantes, los pozos se bloquearon con 150µl/pozo de BLOTTO al 5% (PBS, Tween 20 0,1%, leche descremada 5%) a 37°C por 1 hora; luego el BLOTTO fue retirado y 70µl de cada dilución de las muestras de suero (1/6400, 1/25600, 1/102400, 1/409600, 1/1638400) en BLOTTO 2.5% (PBS, Tween 20 0,1%, leche descremada 2,5%) se depositaron en pozos con RF y Mock. Después de 2 horas de incubación a 37°C, se realizaron lavados con PBS-Tween 0,1%, y luego se adicionaron 70 µl de Ac de cabra anti IgG humana acoplado a biotina (Kirkegaard and Perry Laboratories, KPL, Gaithersburg, MD) diluido 1/1000 en BLOTTO al 2,5% y se incubó por 1 hora a 37°C. Después de lavar la placa, se adicionaron 70µl de estreptavidina peroxidasa (KPL) diluido 1/1000 en BLOTTO al 2,5% y se incubó por 1 hora a 37°C. Finalmente las placas fueron lavadas con PBS-Tween 0,1% y se revelaron con 70µl del sustrato-cromógeno H₂O₂ (KPL)-tetrametil bencidina (TMB; KPL). La reacción se detuvo con 17,5µl de ácido sulfúrico 2M y la absorbancia se leyó a 450nm en un lector de ELISA (multiskan EX, ThermoLab System). Las muestras se consideraron positivas cuando la densidad óptica (DO) era mayor a 0,1 (DO>0,1) y por lo menos el doble del control negativo (mock).

5.2.3 Obtención de CMSP

La sangre heparinizada diluida 1/3 en PBS 1X se centrifugó en un gradiente de densidad de Ficoll paque (d=1,077) (GE Healthcare, Belfast, UK) a 1400xg por 30 minutos. El anillo de

CMSP se separó y las células se lavaron con medio AIMV tres veces a 400xg por 10 minutos y se ajustaron a una concentración de 1×10^6 CMSP/ml de AIMV.

5.2.4 Estímulo (primer día)

Las CMSP se cultivaron a una concentración de 1×10^6 /ml de AIMV en tubos de poliestireno cónicos de 15 ml con los siguientes estímulos: SEB (Sigma) 1,25 μ g/ml (Control positivo), TLPs 1 μ g/mL (5 μ L) ó Dializado de TLPs (5 μ L) (Control negativo) en ausencia o presencia de IL-2 100UI/ml (Proleukin, CHIRON), IL-12 5ng/ml (Peprotech, Zacatecas, México), DGKi 25 μ M (Sigma) en presencia de 1 μ L de Anti-CD28 (BD Pharmingen, San Diego, CA), más 1 μ L de Anti-CD49d (BD Pharmingen). Las dosis de IL-2, IL-12 y de DGKi se establecieron en ensayos previos de titulación empleando concentraciones publicadas en la literatura. Los tubos se incubaron por 5 horas en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂ con un ángulo de inclinación de 5°; posteriormente se agregó Brefeldina A (Sigma) 5 μ g/ml y Monensina (Sigma) 5 μ g/ml y se incubaron durante 5 horas más a 37°C en baño serológico.

5.2.5 Tinción (segundo día)

Las células se lavaron con PBS 1X filtrado a 1000xg por 10 minutos, se agregó PSB-EDTA (Sigma) 0,05mM para desprender células adherentes y se centrifugaron a 1000xg por 10 minutos. Las células se incubaron con 10 μ l de Aqua (Invitrogen) dil 1/20 durante 10 minutos antes de adicionar los Acs monoclonales (BD Bioscience): anti-CD3 Pacific Blue, anti-CD4 PercP-Cy5.5, anti-CD8 APC-H7, Anti-CD14 V500 y anti-CD19V500 para continuar la incubación por 30 minutos. Transcurrido el tiempo las células se lavaron una vez con PBS 1X seguido de un lavado con PBS-BSA 0,5%-AZIDA 0,02% (Mallinckrodt Chemicals, Kentucky, KY); luego se permeabilizaron con Cytifix Cytoperm (BD Bioscience), se lavaron 2 veces con PermWash (BD Bioscience) y se realizó tinción intracelular con los siguientes Acs monoclonales (BD Bioscience): anti-IFN- γ FITC, anti-TNF- α APC, anti-CD69 PeCy7, anti IL-13 PE y anti-IL-2 AlexaFluor700 (Biolegend, San Diego,CA). Las muestras fueron

adquiridas en un citómetro FACS Aria II y el análisis se realizó con el programa FlowJo V 8.6.3 (Treestar Inc., San Carlos, CA). Los valores netos de las frecuencias de LTCD3+, LTCD4+ y LTCD8+ específicos de RV y positivos para cada citocina fueron calculados restando el valor del dializado correspondiente a cada estímulo.

5.2.6. Controles de citometría

Se realizaron “Application settings” con CMSP estimuladas con SEB pero sin teñir para ajustar los voltajes de las señales negativas por encima del ruido electrónico del equipo.

Cada día se hicieron controles de calidad con perlas CST/Cytometer Setting and Tracking Beads (BD Bioscience) para establecer las variaciones en el voltaje con respecto a la línea de base del citómetro.

Los protocolos de compensación se realizaron con perlas Compbeads (BD Bioscience) para todos los Acs y perlas SMPLX (Bangs Lab, Fishers IN) para el AQUA para eliminar los solapamientos entre las señales de los fluorocromos.

COMPBEADS RATON	COMPBEADS DE RATA	SMPLX
CD3 Pacific Blue	IL-13 PE	AQUA
CD4 PerCP-Cy5.5	IL-2 AF700	
CD8 APC-H7		
IFN- γ FITC		
TNF- α APC		
CD69 PECy7		

A cada tubo se le agregó una gota de las perlas positivas y una gota de las perlas negativas, los tubos se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con 2mL de PBS 1X y se centrifugaron a 1500rpm 10 min a 18°C.

También se realizaron controles FMO (Fluorescence minus One) para establecer el umbral entre las señales positivas y negativas para cada citocina (TNF- α , IFN- γ , IL-2 y Anti-IL-13)

5.3 ANÁLISIS DE DATOS

El análisis estadístico fue realizando usando el programa GraphPad Prism v5.0a. Las diferencias en las frecuencias de LT-RV TNF- α +, IL-2+, IL-13+ ó IFN- γ fueron evaluadas mediante el test de Wilcoxon para los tratamientos con IL-12 y el DGKi.

Para los tratamientos con IL-2 se utilizó el test de Friedman con comparaciones post test de Dunn's y cuando estas diferencias fueron significativas se realizaron comparaciones pareadas con el test de Wilcoxon.

6. RESULTADOS

6.1 Voluntarios sanos

En este estudio se emplearon muestras de sangre periférica de 10 voluntarios sanos, 7 mujeres y 3 hombres, con una mediana de edad de 24,5 años (rango=19-35) que habían tenido contacto previo con RV, de acuerdo con los títulos de Acs IgG específicos (Tabla 4) contacto previo con RV, de acuerdo con los títulos de Acs IgG específicos (Tabla 4)

Tabla 4. Datos sociodemográficos voluntarios sanos

VOLUNTARIO	SEXO	EDAD (años)	TITULO DE Acs*
1	M	28	204800
2	F	34	409600
3	F	35	1638400
4	M	24	204800
5	F	21	1638400
6	F	23	>25600
7	M	22	102400
8	F	25	6400
9	F	19	409600
10	F	25	204800

* Inverso de la mayor dilución positiva

6.2 Reversión de anergia con IL-2

6.2.1 Estandarización del ensayo para la reversión de anergia con IL-2

De acuerdo con la literatura revisada se determinaron las diferentes concentraciones de IL-2 que se debían agregar a los cultivos (Gu et al., 2007; Radziewicz et al., 2010; Yu et al., 2006) y se realizaron ensayos con muestras de 2 adultos sanos. Las CMSP se cultivaron en presencia de RRV más 2,5, 25, 50 ó 100 UI/ml de IL-2 como se describió en materiales y métodos utilizando la plantilla de jerarquía que se muestra en la Figura 1.

ROTAVIRUS

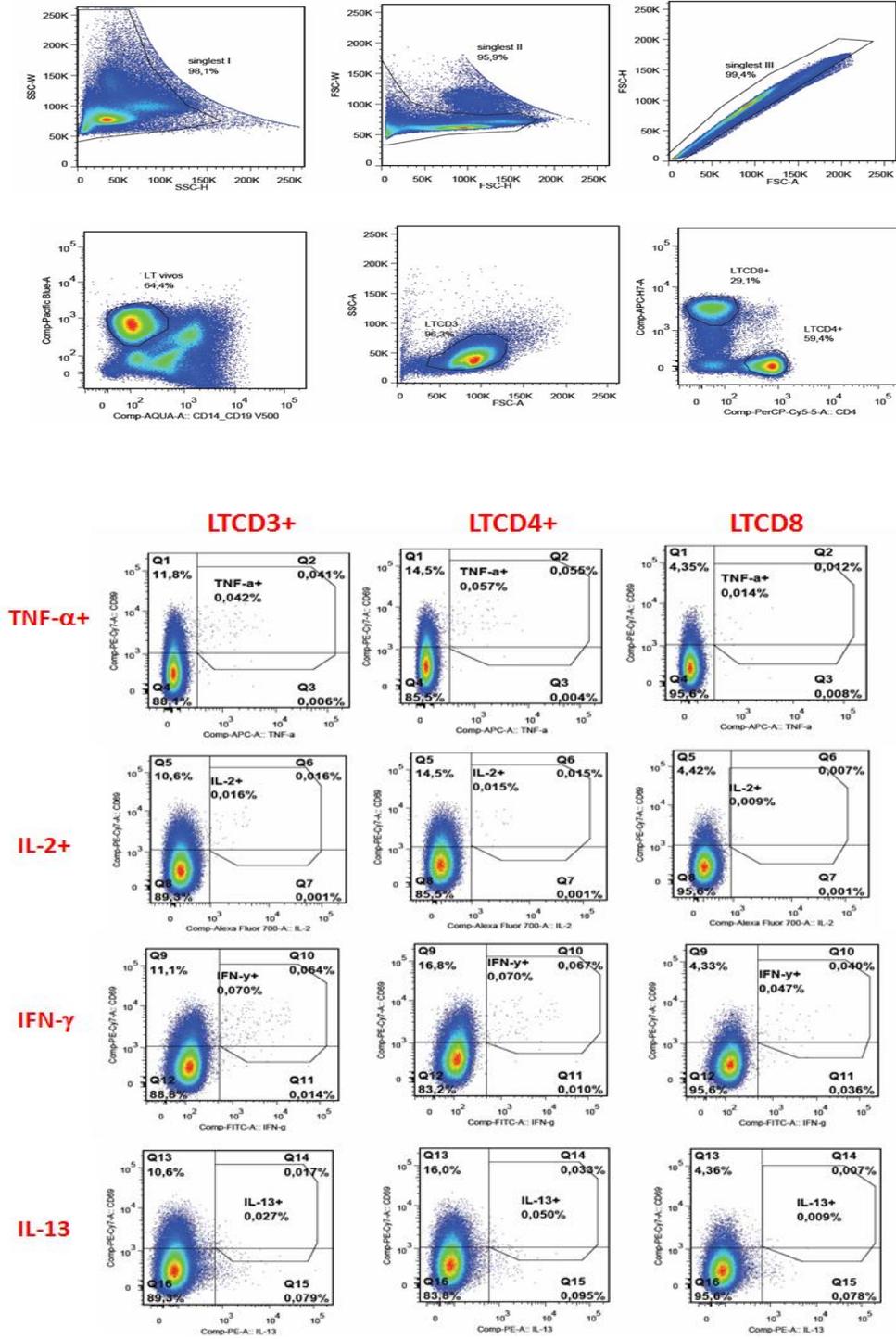


Figura 1. Plantilla de análisis

Cuando las CMSP fueron cultivadas en presencia de IL-2 se observó un incremento en las frecuencias de los LTCD3 y LTCD8-RV IFN- γ^+ a medida que la concentración de IL-2 fue aumentando; esa tendencia fue similar en los dos voluntarios (Figura 2) y se escogieron las concentraciones más altas (50 y 100UI/ml) de IL-2 para los cultivos de reversión de anergia con esta citocina.

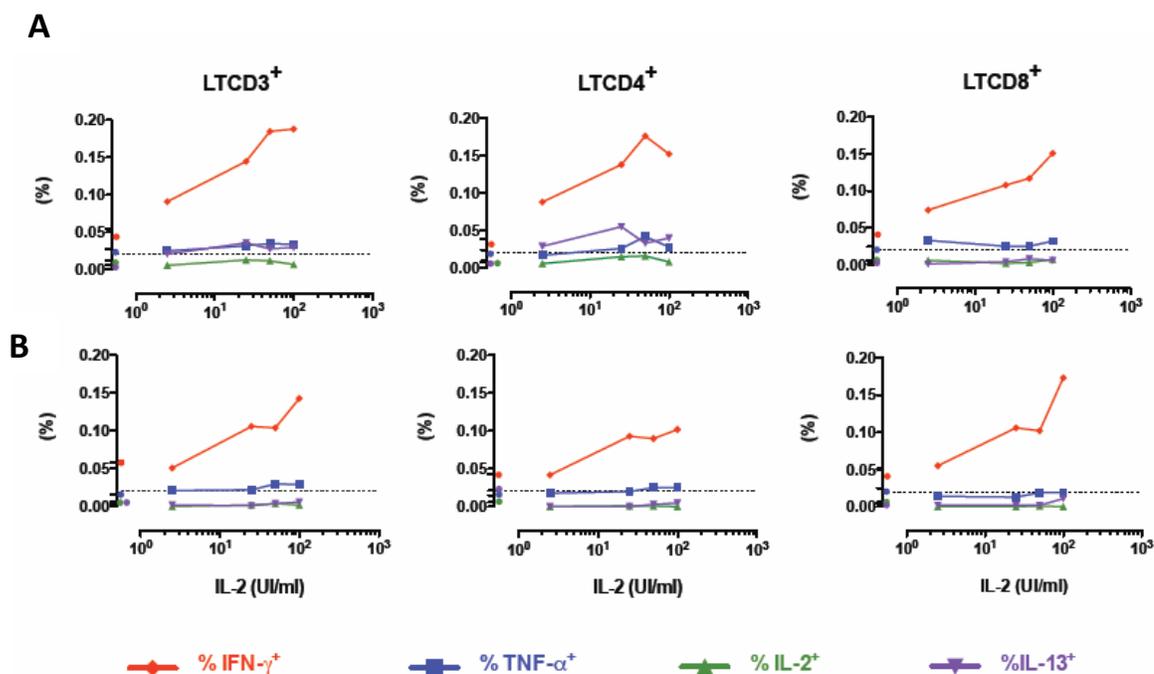


Fig 2. Titulación de IL-2 para los ensayos de reversión de anergia. Las CMSP de dos voluntarios adultos sanos V3 (A) y V5 (B) fueron cultivadas con TLPs (1ug/ml) de RRV o dializados (control negativo) en presencia de Acs monoclonales anti-CD28 y anti CD49d más IL-2r (2,5, 25, 50 y 100UI/ml) durante 10h en presencia de brefeldina 5 μ g/ml y monensina 5 μ g/ml (últimas 5h). Los porcentajes de LT-RV productores de citocinas TNF- α , IL-2, IFN- γ e IL-13 fueron evaluados mediante tinción con Ac monoclonales fluorescentes y citometría de flujo. Las gráficas muestran las frecuencias netas de LT-RV TNF- α^+ , IL-2+, IFN- γ^+ ó IL-13+. La línea punteada representa el límite de detección. Los puntos aislados en color sobre el eje de las Y corresponden a las frecuencias de LT-RV cultivados en ausencia de IL-2 (0 UI/ml)

6.2.2 Efecto de la IL-2 sobre la frecuencia de LT-RV

Para explorar el papel de la IL-2 en la reversión de la anergia de los LT-RV, las frecuencia de LT-RV TNF- α^+ , IL-2+, IFN- γ^+ ó IL-13+ fueron evaluadas en cultivos de CMSP de voluntarios sanos estimulados con TLPs de RRV en presencia de 50 y 100UI/ml de IL-2r. La

frecuencia de LT-RV IFN- γ + se incrementó significativamente con 100UI/ml de IL-2r en las poblaciones de LTCD3+ ($p = 0,0008$; Test de Friedman; $p < 0,05$; posTest de Dunn), LTCD4+ ($p = 0,0239$; Test de Friedman $p < 0,05$ una cola; posTest de Dunn) y LTCD8+ ($p = 0,0008$; Test de Friedman; $p < 0,05$; posTest de Dunn).

También se observó un aumento significativo en las frecuencias de LTCD4-RV TNF- α + ($p = 0,0085$; Test de Friedman; $p > 0,05$; posTest de Dunn) y de los LTCD8-RV TNF- α + en presencia de 100UI/ml de IL-2r ($p = 0,0008$; Test de Friedman una cola; $p < 0,05$; posTest de Dunn); sin embargo es importante anotar que la mayoría de valores de LTCD8+-RV TNF- α + eran menores al límite de detección del ensayo (0,02%) (Figura 3; Tabla 5)

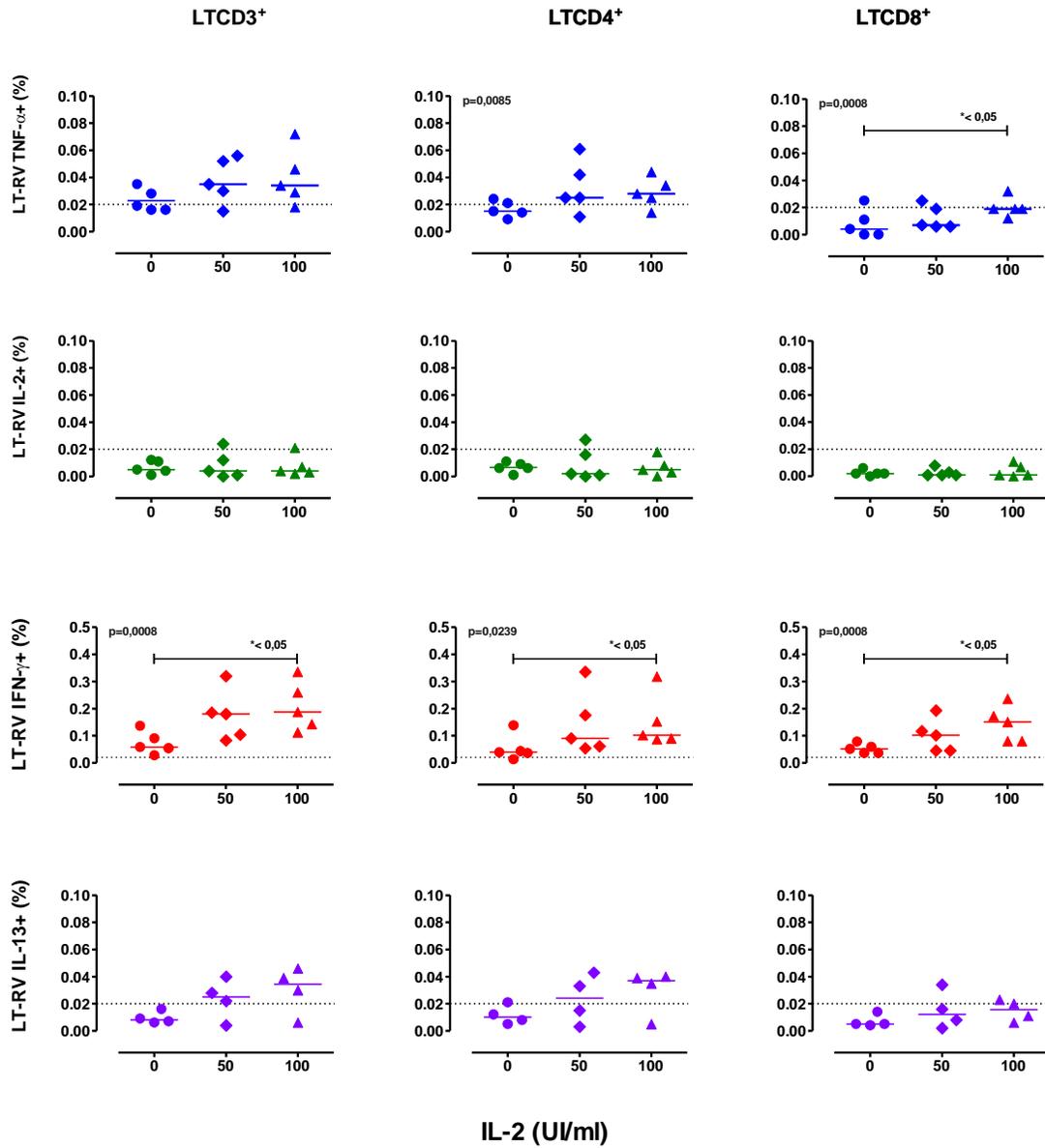


Figura 3. Efecto de la IL-2 sobre la frecuencia de LT-RV TNF-α+, IL-2+, IFN-γ+ ó IL-13+. Las CMSP de cinco voluntarios adultos sanos fueron cultivadas con TLPs (1ug/ml) de RRV o dializados (control negativo) en presencia de Acs monoclonales Anti-CD28 y Anti CD49d más IL-2r (0, 50 y 100UI/ml) durante 10h en presencia de brefeldina 5μg/ml y monensina 5μg/ml (ultimas 5h). Los porcentajes de LT-RV productores de citocinas TNF-α, IL-2, IFN-γ e IL-13 fueron evaluados mediante tinción con Ac monoclonales fluorescentes y citometría de flujo. Las gráficas muestran las frecuencias netas de LT-RV TNF-α, IL-2, IFN-γ e IL-13. Las líneas horizontales corresponden a la Mediana; la línea punteada representa el límite de detección. p<0,05; Friedman una cola (extremo superior del eje Y) con comparaciones post test de Dunn *p<0,05 (sobre la barra horizontal).

Tabla 5. Efecto de IL-2r sobre la Frecuencia de LT-RV citocina+

Citocina	LT	IL-2 UI/ml			Friedman Una cola	Dunn (<0,05)
		0	50	100		
TNF- α	LTCD3+	0,019	0,035	0,034	0,1242	
		(0,016-0,035)	(0,015-0,056)	(0,018-0,072)		
	LTCD4+	0,015	0,025	0,028	0,0085	
(0,009-0,024)		(0,011-0,061)	(0,014-0,044)			
LTCD8+	0,004	0,007	0,019	0,0008	0 vs 100	
	(0,000-0,025)	(0,006-0,025)	(0,012-0,032)			
IL-2	LTCD3+	0,005	0,004	0,004	0,6914	
		(0,001-0,012)	(0,010-0,024)	(0,002-0,021)		
	LTCD4+	0,006	0,002	0,005	0,9537	
(0,001-0,011)		(0,000-0,027)	(0,000-0,018)			
LTCD8+	0,002	0,001	0,004	0,3673		
	(0,000-0,006)	(0,001-0,008)	(0,000-0,011)			
IFN- γ	LTCD3+	0,058	0,180	0,188	0,0008	0 vs 100
		(0,284-0,136)	(0,083-0,320)	(0,112-0,336)		
	LTCD4+	0,039	0,090	0,102	0,0239	0 vs 100
(0,013-0,138)		(0,054-0,336)	(0,087-0,318)			
LTCD8+	0,051	0,102	0,151	0,0008	0 vs 100	
	(0,036-0,078)	(0,045-0,193)	(0,080-0,236)			
IL-13	LTCD3+	0,008	0,025	0,035	0,2731	
		(0,006-0,016)	(0,004-0,04)	(0,006-0,046)		
	LTCD4+	0,010	0,024	0,037	0,4306	
(0,005-0,021)		(0,003-0,043)	(0,005-0,040)			
LTCD8+	0,005	0,012	0,016	0,2731		
	(0,004-0,014)	(0,002-0,034)	(0,006-0,023)			

En cada población celular el valor superior corresponde a la mediana y el inferior entre paréntesis al rango.

6.3 Reversión de anergia con IL-12

6.3.1 Estandarización del ensayo para la reversión de anergia con IL-12

De acuerdo con la literatura revisada se analizaron diferentes concentraciones de IL-12r (Dybul et al., 2000; Gans et al., 1999; Gans et al., 2008; Szkaradkiewicz et al., 2005) y se realizaron ensayos con muestras de 2 adultos sanos (V4 y V7). Las CMSP se cultivaron en

presencia de RRV más IL-12 a las concentraciones de 0,5, 5 y 10ng/ml, como fue descrito previamente.

Cuando las CMSP fueron cultivadas en presencia de IL-12 5 ng/ml se observó un incremento en las frecuencias de los LT-RV IFN- γ + en los dos voluntarios (Figuras 4A y 4B) y V7 (Figura 4B); para los siguientes ensayos se escogió la dosis de 5ng/ml porque aunque las frecuencias de LT-RV IFN- γ + fueron menores en comparación con las frecuencias ejercidas por la IL-12 10ng/ml, el ruido de fondo (frecuencias observadas con el dializado + IL-12 5 ng/ml) fue menor que el observado en presencia de IL-12 10ng/ml.

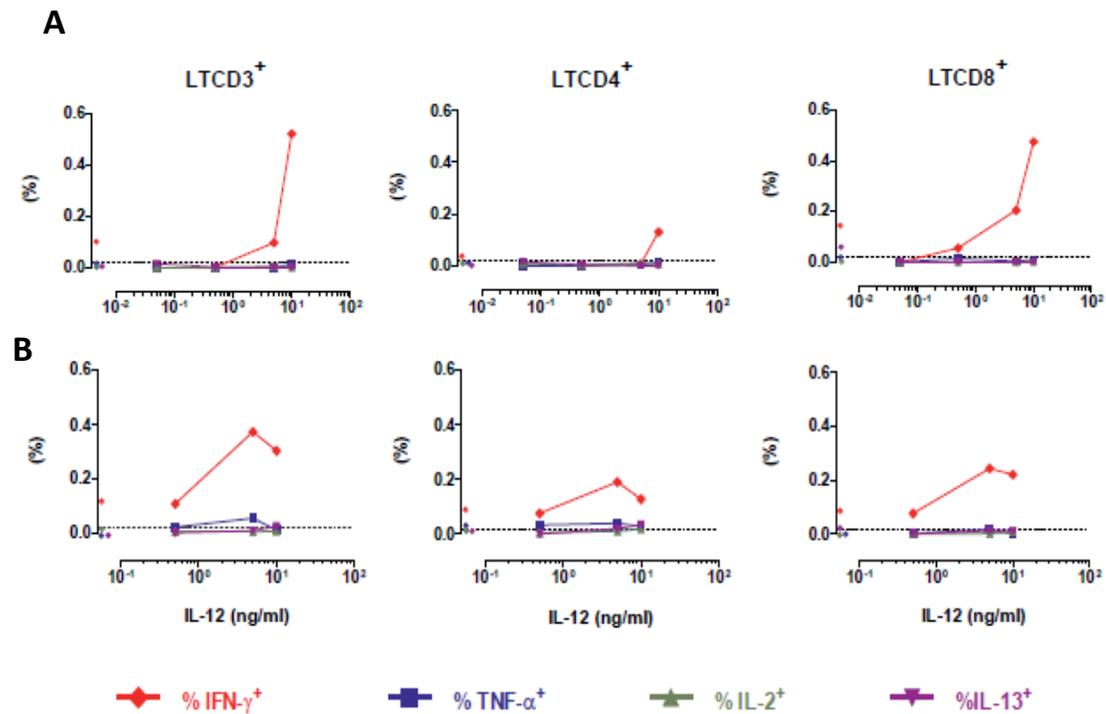


Figura 4. Titulación de IL-12r para los ensayos de reversión de anergia. Las CMSP de dos voluntarios adultos sanos V2 (A) y V7 (B) fueron cultivadas con TLPs (1ug/ml) de RRV o dializados (control negativo) en presencia de Acs monoclonales anti-CD28 y anti CD49d más IL-12 (0,05, 0.5, 5 y 10ng/ml) durante 10h en presencia de brefeldina 5 μ g/ml y monensina 5 μ g/ml (últimas 5h). Los porcentajes de LT-RV productores de citocinas TNF- α , IL-2, IFN- γ e IL-13 fueron evaluados mediante tinción con Ac monoclonales fluorescentes y citometría de flujo. Las gráficas muestran las frecuencias netas de LT-RV TNF- α +, IL-2+, IFN- γ + ó IL-13+. La línea punteada representa el límite de detección. Los puntos aislados en color sobre el eje de las Y corresponde a las frecuencias de LT-RV cultivados en ausencia de IL-12 (0 ng/ml)

6.3.2 Efecto de la IL-12r sobre la frecuencia de LT-RV

Para estudiar el papel de la IL-12 en la reversión de la anergia de los LT-RV las frecuencias de LT-RV TNF- α +, IL-2+, IFN- γ + ó IL-13+ fueron evaluadas en cultivos de CMSP de voluntarios sanos estimulados con TLPs de RRV en presencia de 5ng/ml de IL-12. Las frecuencias de los LT-RV TNF- α +, IL-2+ ó IL-13+ no mostraron cambios significativos en presencia de IL-12 aunque si hubo un incremento significativo en la frecuencia de los LTCD8-RV IFN- γ + ($p = 0,031$; Test de Wilcoxon una cola) (Figura 5; Tabla 6).

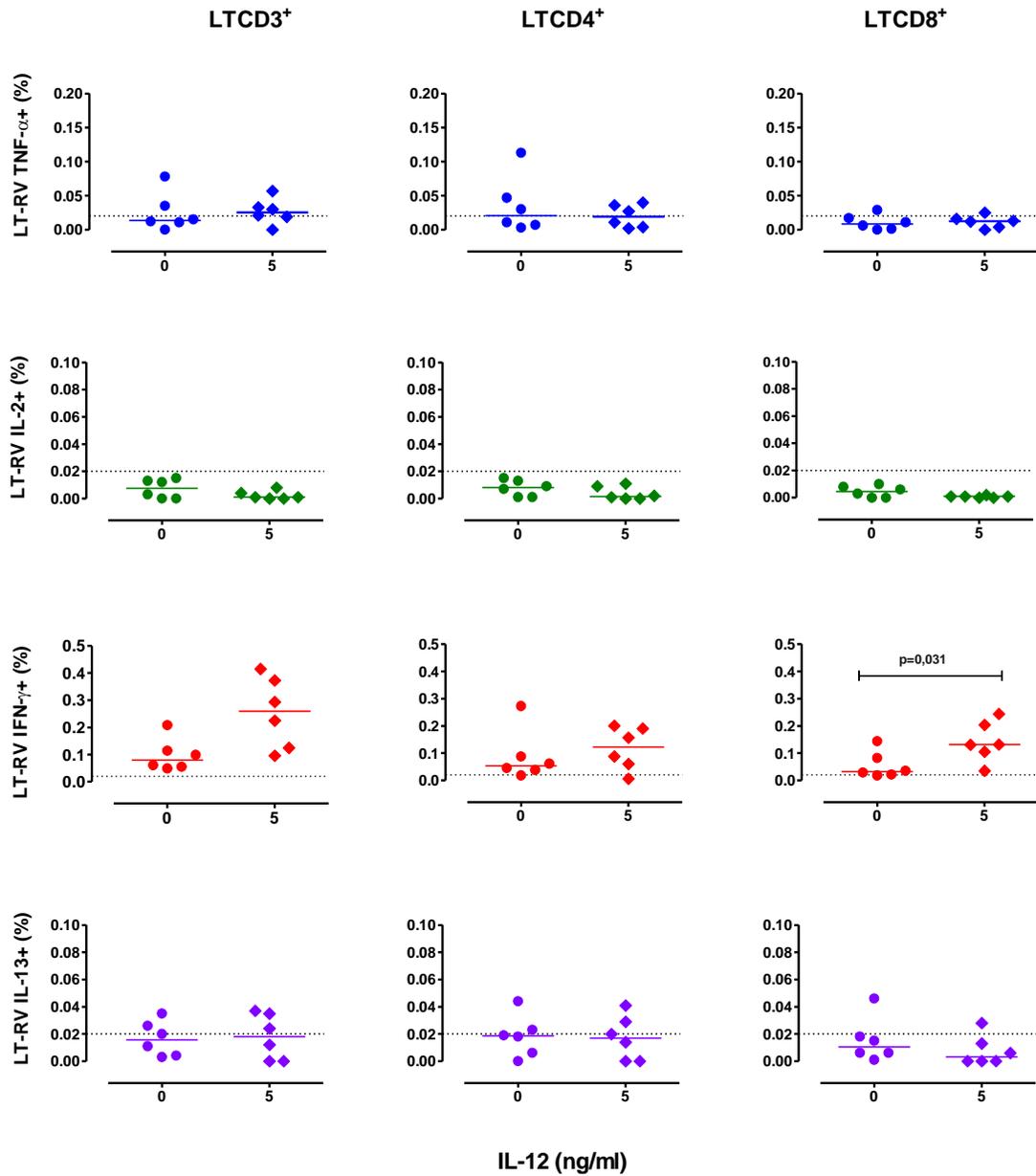


Figura 5. Efecto de la IL-12 sobre la frecuencia de LT-RV TNF- α +, IL-2+, IFN- γ + ó IL-13+. Las CMSP de seis voluntarios adultos sanos fueron cultivadas con TLPs (1 μ g/ml) de RRV o dializados (control negativo) en presencia de Acs monoclonales anti-CD28 y Anti CD49d más IL-12 (5ng/ml) durante 10h en presencia de brefeldina 5 μ g/ml y monensina 5 μ g/ml (ultimas 5h). Los porcentajes de LT-RV productores de citocinas TNF- α , IL-2, IFN- γ ó IL-13 fueron evaluados mediante tinción con Ac monoclonales fluorescentes y citometría de flujo. Las gráficas muestran las frecuencias netas de LT-RV TNF- α , IL-2, IFN- γ ó IL-13. Las líneas horizontales corresponden a las Medianas y la línea punteada representa el límite de detección. $p < 0.05$; Wilcoxon una cola

Tabla 6. Efecto de IL-12r sobre la Frecuencia de LT-RV citocina+

citocina	LT	IL-12 ng/ml		Wilcoxon Una cola
		0	5	
TNF- α	LTCD3+	0,014	0,026	0,916
		(0,0- 0,0780)	(0,0-0,0570)	
	LTCD4+	0,021	0,019	0,563
(0,0030-0,1130)		(0,0020-0,0400)		
LTCD8+	0,009	0,013	0,916	
	(0,0-0,0290)	(0,0-0,0250)		
IL-2	LTCD3+	0,008	0,001	0,279
		(0,0-0,0150)	(0,0-0,0080)	
	LTCD4+	0,008	0,002	0,248
(0,0010-0,0150)		(0,0-0,0110)		
LTCD8+	0,005	0,001	0,172	
	(0,0-0,0100)	(0,0-0,0020)		
IFN- γ	LTCD3+	0,080	0,260	0,156
		(0,0490-0,2080)	(0,0960-0,4150)	
	LTCD4+	0,053	0,123	0,438
(0,0180-0,2730)		(0,0060-0,2010)		
LTCD8+	0,032	0,132	0,031	
	(0,0180-0,1440)	(0,0350-0,2440)		
IL-13	LTCD3+	0,016	0,018	0,813
		(0,0030-0,0350)	(0,0-0,0370)	
	LTCD4+	0,019	0,017	0,685
(0,0-0,0440)		(0,0-0,0410)		
LTCD8+	0,032	0,132	0,563	
	(0,0180-0,1440)	(0,0350-0,2440)		

En cada población celular el valor superior corresponde a la mediana y el inferior entre paréntesis al rango.

6.4 Reversión de anergia con DGKi- α

6.4.1 Estandarización del ensayo para la reversión de anergia con DGKi- α

De acuerdo con la literatura revisada y de los resultados obtenidos en ensayo previos realizados en el laboratorio con sobrenadante de cultivo de MA104 infectadas con RRV, se determinaron las concentraciones del DGKi- α que se debían agregar a los cultivos

(Olenchock et al., 2006; Zha et al., 2006). Se realizaron ensayos con las CMSP de 2 voluntarios adultos sanos que se cultivaron en presencia de RRV más DGKi- α a las concentraciones de 2,5, 12,5 y 25 μ M.

En el V9, las frecuencias netas de LT-RV en cultivos de CMSP con y sin DGK- α fueron muy bajas (Figura 6A), debido al elevado ruido de fondo. En el V10 las frecuencias de los LTCD3-RV y LTCD4-RV TNF- α + e IFN- γ + aumentaron a medida que la concentración de DGKi- α fue aumentando, alcanzando el pico más alto a la concentración de 25 μ M (Figura 6B); sin embargo, se observó una ligera disminución de los LTCD8-RV IFN- γ + (Figura 6B). Con base en este resultado y los resultados previos realizados en el laboratorio con sobrenadante de cultivo de células MA104 infectadas con RRV, se escogió la concentración de 25 μ M para los siguientes experimentos.

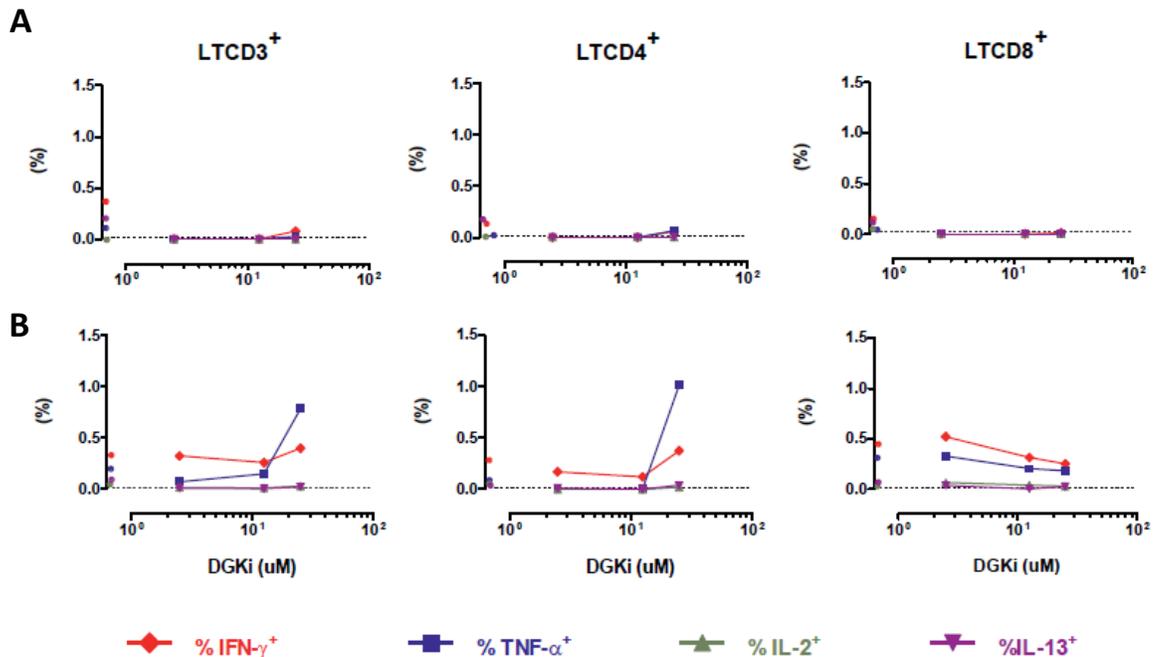


Figura 6. Titulación de DGKi- α para los ensayos de reversión de anergia. Las CMSP de dos voluntarios adultos sanos V9 (A) y V10 (B) fueron cultivadas con TLPs (1ug/ml) de RRV o dializados (control negativo) en presencia de Acs monoclonales Anti-CD28 y Anti CD49d más DGKi- α (2.5, 12.5 y 25 μ M) durante 10h en presencia de brefeldina 5 μ g/ml y monensina 5 μ g/ml (últimas 5h). Los porcentajes de LT-RV productores de citocinas TNA- α , IL-2, IFN- γ e IL-13 fueron evaluados mediante tinción con Ac monoclonales fluorescentes y citometría de flujo. Las gráficas muestran las frecuencias netas de LT-RV TNF- α +, IL-2+, IFN- γ + ó IL-13+. La línea punteada representa el límite de detección. Los puntos aislados en color sobre el eje de las y corresponde a las frecuencias de LT-RV cultivados en ausencia de DGKi- α (0 μ M)

6.4.2 Efecto de la DGKi- α sobre la frecuencia de LT-RV

Para estudiar el papel de la DGKi- α en la reversión de la anergia de los LT-RV la frecuencia de LT-RV TNF- α +, IL-2+, IFN- γ + ó IL-13+ fueron evaluadas en cultivos de CMSP de voluntarios sanos estimulados con TLPs de RRV en presencia de 25 μ M de DGKi- α . Las frecuencias de los LT-RV TNF- α +, IL-2+, IFN- γ + ó IL-13+ evaluadas en los cultivos sin y con DGKi no mostraron diferencias significativas (Figura 7; Tabla 7); aunque en algunos voluntarios se observaron altas frecuencias de LTCD+-RV y LTCD4-RV TNF- α + (Tabla 7).

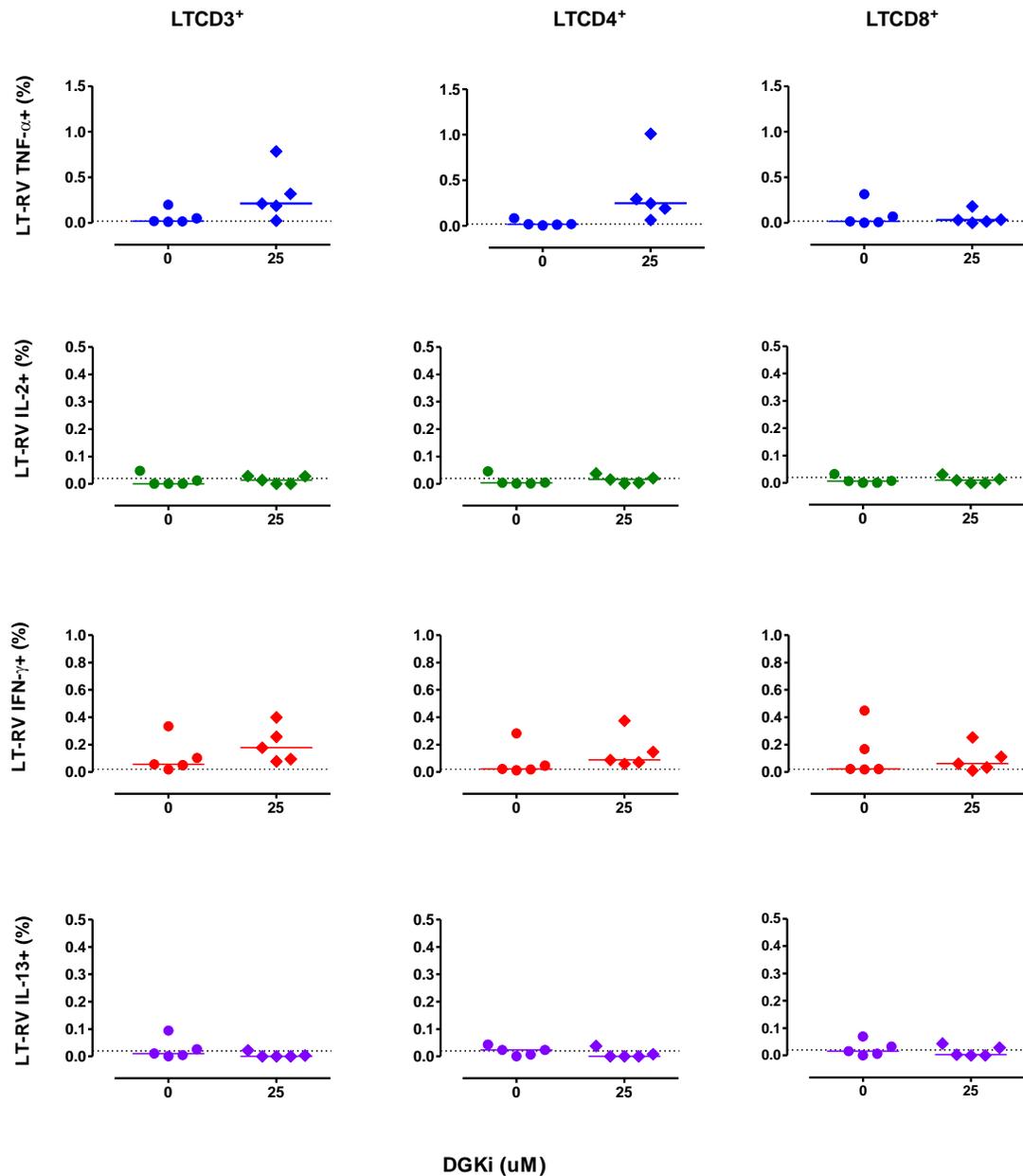


Figura 7. Efecto del DGKi- α sobre la frecuencia de LT-RV TNF- α +, IL-2+, IFN- γ + ó IL-13+. Las CMSP de cinco voluntarios adultos sanos fueron cultivadas con TLPs (1ug/ml) de RRV o dializados (control negativo) en presencia de Acs monoclonales Anti-CD28 y Anti CD49d más DGKi- α (25 μ M) durante 10h en presencia de brefeldina 5 μ g/ml y monensina 5 μ g/ml (ultimas 5h). Los porcentajes de LT-RV productores de citocinas TNF- α , IL-2, IFN- γ ó IL-13 fueron evaluados mediante tinción con Ac monoclonales fluorescentes y citometría de flujo. Las gráficas muestran las frecuencias netas de LT-RV TNF- α , IL-2, IFN- γ ó IL-13. Las líneas horizontales corresponden a la Mediana y la línea punteada representa el límite de detección.

Las CMSP de todos los voluntarios en todos los experimentos realizados sintetizaron citocinas en respuesta a SEB; se observaron mayores frecuencias de LTCD4+ productores de TNF- α + ó IL-2 y de LTCD8+ secretores de IFN- γ (Tabla 8).

Tabla 7. Efecto DGKi- α sobre la Frecuencia de LT-RV citocina+

citocina	LT	DGKi (μ M)		<i>Wilcoxon Una cola</i>
		0	25	
TNF-a	LTCD3+	0,018	0,213	0,063
		(0,0110-0,1980)	(0,0260-0,7850)	
	LTCD4+	0,016	0,247	0,063
		(0,0030-0,0830)	(0,0640-1,012)	
	LTCD8+	0,015	0,032	0,625
		(0,0010-0,3140)	(0,0-0,1820)	
IL-2	LTCD3+	0,000	0,014	0,750
		(0,0-0,0470)	(0,0-0,0290)	
	LTCD4+	0,003	0,016	0,438
		(0,0010-0,0450)	(0,0020-0,0380)	
	LTCD8+	0,006	0,010	0,875
		(0,0-0,0320)	(0,0-0,0310)	
IFN-g	LTCD3+	0,055	0,177	0,063
		(0,0180-0,3330)	(0,0780-0,3990)	
	LTCD4+	0,021	0,088	0,063
		(0,0110-0,2810)	(0,0590-0,3750)	
	LTCD8+	0,021	0,060	0,625
		(0,0180-0,4470)	(0,0110-0,2530)	
IL-13	LTCD3+	0,010	0,000	0,125
		(0,0-0,0940)	(0,0-0,0220)	
	LTCD4+	0,023	0,000	0,125
		(0,0-0,0430)	(0,0-0,0380)	
	LTCD8+	0,015	0,003	0,438
		(0,0-0,0690)	(0,0-0,0440)	

En cada población celular el valor superior corresponde a la mediana y el inferior entre paréntesis al rango.

Tabla 8. Frecuencia de LT citocina+ estimulados con SEB

SEB		
CITOCINAS	LT	%
TNF-a	LTCD3+	4,070
		(2.660-9.510)
	LTCD4+	6,370
		(2.400-11.60)
	LTCD8+	1,150
		(0.4550-3.610)
IL-2	LTCD3+	3,470
		(1.220-6.920)
	LTCD4+	5,210
		(1.370-8.620)
	LTCD8+	0,5350
		(0.0700-1.720)
IFN-g	LTCD3+	2,610
		(1.250-4.720)
	LTCD4+	2,560
		(0.7210-4.820)
	LTCD8+	2,480
		(1.380-7.220)
IL-13	LTCD3+	0,0840
		(0.0180-0.3640)
	LTCD4+	0,1070
		(0.0580-0.5520)
	LTCD8+	0,0479
		(0.0090-0.1830)

En cada población celular el valor superior corresponde a la mediana y el inferior entre paréntesis al rango.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se exploró el efecto de la IL-2, IL-12 y del DGKi- α sobre la frecuencia de los LT-RV CD69+ secretores de citocinas con el fin de evaluar la presencia de LT anérgicos. Se observaron incrementos significativos en las frecuencias de LT-RV IFN- γ + en presencia de IL-2 y de LTCD8+ IFN- γ + en los cultivos con IL-12; sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa en los cultivos con DGKi- α .

La IL-2 es un importante factor de crecimiento de los LT y se ha reportado que su ausencia induce LT anérgicos (Choi and Schwartz, 2007). Los ensayos de reversión de anergia con IL-2 en humanos han sido realizados en la mayoría de los casos con líneas o clones de LT con resultados variables en cuanto a proliferación, secreción de citocinas y especificidad (Boon et al., 2005; Lyngstrand et al., 2002); sin embargo el estímulo breve *ex vivo* de LT de sangre periférica muestra resultados diferentes en el sentido de revelar los LT anérgicos circulantes presentes en un individuo. Usando esta metodología en pacientes infectados con VIH se observó que las frecuencias de LTCD4+IFN- γ + aumentaron en presencia de IL-2 (Gu et al., 2007); sin embargo, en el mismo estudio se observó que la mayoría de LT específicos de tetrámeros de *gag* no secretaban IFN- γ , indicando posiblemente una respuesta inespecífica (Gu et al., 2007). En el presente estudio, es posible que entre los LT-RV IFN- γ + revelados en presencia de IL-2, existan LT no específicos del virus; una observación que apoyaría esta idea es que en los cultivos con dializado más IL-2 también se observó un incremento de la frecuencia de LT-IFN- γ +, lo que quiere decir que la IL-2 por si sola fue capaz de inducir secreción de citocinas; en efecto, se ha observado que el cultivo de CMSPs en presencia de IL-2 y sin estímulo antigénico muestra un incremento en la secreción de TNF- α e IFN- γ después de un día de incubación (Sereti et al., 2000).

En presencia de IL-12 no se observaron cambios significativos en las frecuencias de LTCD3-RV ni de LTCD4-RV en los cultivos de CMSP de adultos, pero sí de los LTCD8-RV IFN- γ +. Los resultados en los LTCD3+ son similares a los observados en cultivos de CMSP de adultos

estimulados con virus de sarampión en los cuales ni la IL-12 ni un coctel de IL-12/IL-15 indujo un aumento de los LT-IFN γ + (Gans et al., 2008); sin embargo en este estudio no se analizaron los LTCD4+ y LTCD8+ de manera independiente. El incremento de los LTCD8-RV IFN- γ + observado en el presente estudio está de acuerdo con hallazgos publicados sobre el papel de IL-12 en la expansión, activación y diferenciación de los LTCD8+ (Mescher et al., 2006) y de la reversión del estado de hiporespuesta de LTCD8+ infiltrantes de carcinoma de pulmón (Broderick et al., 2006; Simpson-Abelson et al., 2009).

El análisis de la reversión de anergia en LT-RV puede ser particularmente importante en el caso de los niños en los cuales se ha reportado un defecto en las CPAs (Krumbiegel et al., 2007; Velilla et al., 2006); por lo tanto, aunque la IL-12 no ejerció efecto sobre la frecuencia de los LT-RV de adultos no se puede descartar la hipótesis de que esta citocina pudiera aumentar las frecuencias de LT-RV en los niños. Al respecto es interesante la observación del incremento de LT-IFN- γ específicos de sarampión inducidos en cultivos de CMSP de niños en presencia de IL-12 junto con la IL-15 (Gans et al., 2008).

La exposición de los cultivos de CMSP humana al DGKi no evidenció mayor frecuencia de LT-RV. Estos resultados pueden ser atribuidos al aumento de la frecuencia de LT IFN- γ + inespecíficos como se observó en los controles realizados con dializado más DGKi que pueden haber enmascarado un aumento de las células específicas de RV. Otra posible explicación para este resultado es que otras vías de señalización intracelular estén involucradas en el estado anérgico.

La DGK- α es una enzima que se sobre-expresa en LT anérgicos y recientemente se observó que el gen que la codifica es uno de los blancos del factor de transcripción Egr2, inductor clave del estado anérgico, al menos en modelos de anergia inducida con anti-CD3, SEB ó tumores; sin embargo en ratones con regulación negativa del gen Egr2 no se observó aumento en la respuesta inmune contra los Ags menores de histocompatibilidad, la

infección por *Toxoplasma gondii* ni el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV); es decir que es posible que Egr2 no sea un regulador universal de anergia y que otros factores de transcripción y otras vías de señalización como se mencionó anteriormente estén involucradas en la anergia de los LT específicos de otros Ags (Zheng et al., 2012). En modelos murinos se ha observado que los LT anérgicos presentan un fracaso en la fosforilación de la PLC- γ (Srinivasan and Frauwirth, 2009) ó que la anergia de ratones que sostienen una infección persistente por *Staphylococcus aureus* revierte con PMA, activador directo de la PKC (Ziegler et al., 2011). Hacen falta entonces muchos estudios para identificar los inductores centrales de anergia así como sus genes blanco en LT específicos de diferentes Ags en modelos animales experimentales así como en humanos.

El incremento en la frecuencia de LT-IFN γ + ó TNF- α inespecíficos observados en los cultivos estimulados con dializados de RV más IL-2, IL-12 ó DGKi podría atribuirse a activación de los LT independiente del TCR. Se ha observado por ejemplo, que en ausencia de CPA, la flagelina y los imidazoquinoles, ligandos para TLR5 y TLR7/8 respectivamente, actuaron de manera sinérgica con la IL-2 para inducir la producción de IFN- γ por los LTCD4+ de memoria CCR7- en mayor proporción que por los LTCD4+ de memoria CCR7+, lo que sugiere que los LT que han entrado en contacto con el Ag y que migran a los tejidos periféricos son más sensibles al estímulo mediado por TLR independiente de TCR (Caron et al., 2005). Sería interesante descartar que en dializado de RV existan moléculas con potencial activador de los LT en una forma independiente de Ag.

El aumento de LT-IFN γ + ó TNF- α inespecíficos observados en este trabajo requiere experimentos adicionales para detectar los LT específicos de RV; por ejemplo, la tinción de los LT con tetrámeros de péptidos de RV y moléculas del CMH clase I y II podrían contribuir a aclarar la verdadera contribución de IL2, IL-12 y DGKi en la reversión del estado anérgico de los LT-RV.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 10, 131-144.

Angel, J., Franco, M.A., and Greenberg, H.B. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol* 5, 529-539.

Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8, 411-420.

Blutt, S.E., Kirkwood, C.D., Parreno, V., Warfield, K.L., Ciarlet, M., Estes, M.K., Bok, K., Bishop, R.F., and Conner, M.E. (2003). Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet* 362, 1445-1449.

Blutt, S.E., Matson, D.O., Crawford, S.E., Staat, M.A., Azimi, P., Bennett, B.L., Piedra, P.A., and Conner, M.E. (2007). Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med* 4, e121.

Boon, A.C., de Mutsert, G., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., and Rimmelzwaan, G.F. (2005). Functional profile of human influenza virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity is influenced by interleukin-2 concentration and epitope specificity. *Clin Exp Immunol* 142, 45-52.

Broderick, L., Brooks, S.P., Takita, H., Baer, A.N., Bernstein, J.M., and Bankert, R.B. (2006). IL-12 reverses anergy to T cell receptor triggering in human lung tumor-associated memory T cells. *Clin Immunol* 118, 159-169.

Butcher, E.C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L., and Briskin, M. (1999). Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 72, 209-253.

Caceres, D.C., Pelaez, D., Sierra, N., Estrada, E., and Sanchez, L. (2006). [Burden of rotavirus-related disease among children under five, Colombia, 2004]. *Rev Panam Salud Publica* 20, 9-21.

Caron, G., Duluc, D., Fremaux, I., Jeannin, P., David, C., Gascan, H., and 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. *J Immunol* 175, 1551-1557.

Chappert, P., and Schwartz, R.H. (2010). Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance. *Curr Opin Immunol* 22, 552-559.

Choi, S., and Schwartz, R.H. (2007). Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin Immunol* 19, 140-152.

Coombes, J.L., and Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8, 435-446.

Deal, E.M., Jaimes, M.C., Crawford, S.E., Estes, M.K., and Greenberg, H.B. (2010). Rotavirus structural proteins and dsRNA are required for the human primary plasmacytoid dendritic cell IFN α response. *PLoS Pathog* 6, e1000931.

Dure, M., and Macian, F. (2009). IL-2 signaling prevents T cell anergy by inhibiting the expression of anergy-inducing genes. *Mol Immunol* 46, 999-1006.

Dybul, M., Mercier, G., Belson, M., Hallahan, C.W., Liu, S., Perry, C., Herpin, B., Ehler, L., Davey, R.T., Metcalf, J.A., *et al.* (2000). CD40 ligand trimer and IL-12 enhance peripheral blood mononuclear cells and CD4⁺ T cell proliferation and production of IFN- γ in response to p24 antigen in HIV-infected individuals: potential contribution of anergy to HIV-specific unresponsiveness. *J Immunol* 165, 1685-1691.

Faria, A.M., and Weiner, H.L. (2005). Oral tolerance. *Immunol Rev* 206, 232-259.

Fathman, C.G., and Lineberry, N.B. (2007). Molecular mechanisms of CD4⁺ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol* 7, 599-609.

Gans, H.A., Maldonado, Y., Yasukawa, L.L., Beeler, J., Audet, S., Rinki, M.M., DeHovitz, R., and Arvin, A.M. (1999). IL-12, IFN- γ , and T cell proliferation to measles in immunized infants. *J Immunol* 162, 5569-5575.

Gans, H.A., Yasukawa, L.L., Zhang, C.Z., Wakim, R.H., Rinki, M., Dehovitz, R., and Arvin, A.M. (2008). Effects of interleukin-12 and interleukin-15 on measles-specific T-cell responses in vaccinated infants. *Viral Immunol* 21, 163-172.

Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., and Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 29, 464-475.

Gu, X.X., Yue, F.Y., Kovacs, C.M., and Ostrowski, M.A. (2007). The role of cytokines which signal through the common gamma chain cytokine receptor in the reversal of HIV specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell anergy. *PLoS One* 2, e300.

Hilkens, C.M., Kalinski, P., de Boer, M., and Kapsenberg, M.L. (1997). Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 90, 1920-1926.

Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J.L., Berg, P.L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B., *et al.* (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* 205, 2139-2149.

Jaimes, M.C., Rojas, O.L., Gonzalez, A.M., Cajiao, I., Charpilienne, A., Pothier, P., Kohli, E., Greenberg, H.B., Franco, M.A., and Angel, J. (2002). Frequencies of virus-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes secreting gamma interferon after acute natural rotavirus infection in children and adults. *J Virol* 76, 4741-4749.

Johansson, C., and Kelsall, B.L. (2005). Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin Immunol* 17, 284-294.

Krumbiegel, D., Zepp, F., and Meyer, C.U. (2007). Combined Toll-like receptor agonists synergistically increase production of inflammatory cytokines in human neonatal dendritic cells. *Hum Immunol* 68, 813-822.

Kunkel, E.J., and Butcher, E.C. (2002). Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 16, 1-4.

Liu, Y.J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306.

Lundgren, O., and Svensson, L. (2001). Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect* 3, 1145-1156.

Lyngstrand, S.T., Wurtzen, P.A., Odum, N., Nissen, M.H., and Ropke, C. (2002). IL-15 induces unspecific effector functions in human peptide-specific CD8+ T-cell cultures. *Scand J Immunol* 56, 602-610.

McRae, B.L., Semnani, R.T., Hayes, M.P., and van Seventer, G.A. (1998). Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J Immunol* 160, 4298-4304.

Mesa, M.C., Gutierrez, L., Duarte-Rey, C., Angel, J., and Franco, M.A. (2010). A TGF-beta mediated regulatory mechanism modulates the T cell immune response to rotavirus in adults but not in children. *Virology* 399, 77-86.

Mesa, M.C., Rodriguez, L.S., Franco, M.A., and Angel, J. (2007). Interaction of rotavirus with human peripheral blood mononuclear cells: plasmacytoid dendritic cells play a role in stimulating memory rotavirus specific T cells in vitro. *Virology* 366, 174-184.

Mescher, M.F., Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Casey, K.A., Gerner, M., Hammerbeck, C.D., Popescu, F., and Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8⁺ T cells. *Immunol Rev* 211, 81-92.

Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.

Nagler-Anderson, C., and Shi, H.N. (2001). Peripheral nonresponsiveness to orally administered soluble protein antigens. *Crit Rev Immunol* 21, 121-131.

Narvaez, C.F., Angel, J., and Franco, M.A. (2005). Interaction of rotavirus with human myeloid dendritic cells. *J Virol* 79, 14526-14535.

Offit, P.A., Hoffenberg, E.J., Pia, E.S., Panackal, P.A., and Hill, N.L. (1992). Rotavirus-specific helper T cell responses in newborns, infants, children, and adults. *J Infect Dis* 165, 1107-1111.

Olenchock, B.A., Guo, R., Carpenter, J.H., Jordan, M., Topham, M.K., Koretzky, G.A., and Zhong, X.P. (2006). Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell energy. *Nat Immunol* 7, 1174-1181.

Pabst, O., Bernhardt, G., and Forster, R. (2007). The impact of cell-bound antigen transport on mucosal tolerance induction. *J Leukoc Biol* 82, 795-800.

Parashar, U.D., Gibson, C.J., Bresee, J.S., and Glass, R.I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12, 304-306.

Parashar, U.D., Hummelman, E.G., Bresee, J.S., Miller, M.A., and Glass, R.I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9, 565-572.

Radziejewicz, H., Ibegbu, C.C., Hon, H., Bedard, N., Bruneau, J., Workowski, K.A., Knechtle, S.J., Kirk, A.D., Larsen, C.P., Shoukry, N.H., *et al.* (2010). Transient CD86 expression on hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in acute infection is linked to sufficient IL-2 signaling. *J Immunol* 184, 2410-2422.

Ramig, R.F. (2007). Systemic rotavirus infection. *5*, 591-612.

Rescigno, M. (2011). The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 32, 256-264.

Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is

regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 507-514.

Rodriguez, L.S., Narvaez, C.F., Rojas, O.L., Franco, M.A., and Angel, J. (2012). Human myeloid dendritic cells treated with supernatants of rotavirus infected Caco-2 cells induce a poor Th1 response. *Cell Immunol* 272, 154-161.

Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., and Levings, M.K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182, 68-79.

Rott, L.S., Rose, J.R., Bass, D., Williams, M.B., Greenberg, H.B., and Butcher, E.C. (1997). Expression of mucosal homing receptor alpha4beta7 by circulating CD4+ cells with memory for intestinal rotavirus. *J Clin Invest* 100, 1204-1208.

Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-334.

Scott, C.L., Aumeunier, A.M., and Mowat, A.M. (2011). Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol* 32, 412-419.

Sereti, I., Gea-Banacloche, J., Kan, M.Y., Hallahan, C.W., and Lane, H.C. (2000). Interleukin 2 leads to dose-dependent expression of the alpha chain of the IL-2 receptor on CD25-negative T lymphocytes in the absence of exogenous antigenic stimulation. *Clin Immunol* 97, 266-276.

Simpson-Abelson, M.R., Purohit, V.S., Pang, W.M., Iyer, V., Odunsi, K., Demmy, T.L., Yokota, S.J., Loyall, J.L., Kelleher, R.J., Jr., Balu-Iyer, S., *et al.* (2009). IL-12 delivered intratumorally by multilamellar liposomes reactivates memory T cells in human tumor microenvironments. *Clin Immunol* 132, 71-82.

Srinivasan, M., and Frauwirth, K.A. (2009). Peripheral tolerance in CD8+ T cells. *Cytokine* 46, 147-159.

Szkaradkiewicz, A., Jopek, A., and Wysocki, J. (2005). Effects of IL-12 and IL-18 on HBcAg-specific cytokine production by CD4 T lymphocytes of children with chronic hepatitis B infection. *Antiviral Res* 66, 23-27.

Torres-Aguilar, H., Aguilar-Ruiz, S.R., Gonzalez-Perez, G., Munguia, R., Bajana, S., Meraz-Rios, M.A., and Sanchez-Torres, C. (2010). Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J Immunol* 184, 1765-1775.

Upham, J.W., Rate, A., Rowe, J., Kusel, M., Sly, P.D., and Holt, P.G. (2006). Dendritic cell immaturity during infancy restricts the capacity to express vaccine-specific T-cell memory. *Infect Immun* *74*, 1106-1112.

Velilla, P.A., Rugeles, M.T., and Chougnet, C.A. (2006). Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clin Immunol* *121*, 251-259.

Wells, A.D. (2009). New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. *J Immunol* *182*, 7331-7341.

Worthington, J.J., Czajkowska, B.I., Melton, A.C., and Travis, M.A. (2011). Intestinal dendritic cells specialize to activate transforming growth factor-beta and induce Foxp3+ regulatory T cells via integrin alphavbeta8. *Gastroenterology* *141*, 1802-1812.

Ylikoski, E., Lund, R., Kylaniemi, M., Filen, S., Kilpelainen, M., Savolainen, J., and Lahesmaa, R. (2005). IL-12 up-regulates T-bet independently of IFN-gamma in human CD4+ T cells. *Eur J Immunol* *35*, 3297-3306.

Yu, J., Chen, H., Horton, H., Bansal, A., McElrath, J.M., Reichman, R., Goepfert, P., and Jin, X. (2006). Interleukin-2 reconstitutes defective human immunodeficiency virus (HIV), and cytomegalovirus (CMV) specific CD8+ T cell proliferation in HIV infection. *J Med Virol* *78*, 1147-1157.

Zha, Y., Marks, R., Ho, A.W., Peterson, A.C., Janardhan, S., Brown, I., Praveen, K., Stang, S., Stone, J.C., and Gajewski, T.F. (2006). T cell anergy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase-alpha. *Nat Immunol* *7*, 1166-1173.

Zheng, Y., Zha, Y., Driessens, G., Locke, F., and Gajewski, T.F. (2012). Transcriptional regulator early growth response gene 2 (Egr2) is required for T cell anergy in vitro and in vivo. *J Exp Med* *209*, 2157-2163.

Ziegler, C., Goldmann, O., Hobeika, E., Geffers, R., Peters, G., and Medina, E. (2011). The dynamics of T cells during persistent *Staphylococcus aureus* infection: from antigen-reactivity to in vivo anergy. *EMBO Mol Med* *3*, 652-666.

Mononuclear Cells) were cultured with TLPs (1 μ g/ml) of RRV or dialyzed (negative control) in the presence of monoclonal Anti- Acs CD28 and CD49d and anti IL -2r (0 , 50 and 100UI/ml) , IL-12 (5ng/ml) or DGKi- α (25 μ M) for 10h in the presence of brefeldin A and monensin 5 μ g/ml 5 μ g / ml (last 5h) . The percentages of Tcell- RV producing cytokines TNF- α , IL-2, IFN- γ ó IL-13 were assessed by staining with fluorescent monoclonal Ac and flow cytometry.

Results: -RV LTCD8 IFN significant increases were observed at frequencies of CD3 + Tcell , CD3 + CD4 + T cells and LTCD3 + LTCD8 + specific RV secreting IFN- γ + in the presence of 100UI/ml of IL -2r (recombinant IL-2) and 5 ng / ml of IL - 12r (recombinant IL -2) , no significant differences were observed in the cultures with DGKi- α . Both IL-2 and IL -12 and DGKi also increased the frequency of IFN- γ + Tcell nonspecific.

Conclusion : The increased frequency of secreting IFN- γ + T cell in cultured PBMC stimulated with RV in the presence of IL - 2R or IL- 12R suggest the possible existence of specific anergic LT virus , but these findings require confirmation of such specificity