



Facultad de Química – PE.DE.CI.BA Química
Universidad de la República

Tesis de Doctorado en Química
Agosto 2013

Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como base para nuevas inmunoterapias contra *Streptococcus pneumoniae*

Lic. Natalia Muñoz Wolf

Supervisor: Prof. Dr. Alejandro Chabalgoity

Tribunal Evaluador:
Dra. Patricia Esperón
Dr. Gualberto González
Dr. Marcelo Hill

*“Wisdom is to have dreams that are big enough
not to lose sight when we pursue them”*

Oscar Wilde

A Iris, mi abuela, que estaría orgullosa.

Agradecimientos

Son muchos quienes me han acompañado en este camino, que no ha sido únicamente parte de mi carrera, sino más bien de mi vida. Muchos a quienes agradecer.

Comienzo por Alejandro, mi tutor y mi jefe, quien dejó que me desarrollase con libertad en su laboratorio y fuera de él, permitiéndome conocer la ciencia de otras partes del mundo, experiencias que me hicieron crecer en lo profesional y personal y que seguramente contribuyeron mucho para abrir el camino que elegí continuar hoy.

A todos los miembros del tribunal por aceptar evaluar este trabajo.

A mis compañeros y colegas del LVR, a todos ellos.

Quiero agradecer especialmente a Analía y a Juan Martín, los fundadores del “equipo neumo”, quienes me apoyaron desde el comienzo, enseñándome a trabajar y más importante aún a pensar, quienes fueron solidarios con su tiempo y sus conocimientos y que muchas veces me ayudaron a encontrar la motivación para seguir adelante.

A Andrea, Aracé, Marichu y Rosina, mis grandes amigas dentro y fuera del laboratorio, gracias por tan lindos momentos!!

A María, Yuyu y a Laura, por la ayuda de todo tipo, con el citómetro y tantos temas de microbiología.

A Josema, por animarse a ser mi primer estudiante, y por toda la paciencia que ha debido tener para aguantarme!

A Jean-Claude, un apoyo fundamental para el desarrollo de mi tesis, quien además me recibió en su laboratorio y junto con Julien, Delphine, Laurye y todo el equipo hicieron que cada estadía en Lille fuera como estar en casa.

A Daniela Lens, Sofí, Mariela Bolatti, Martín Rossotti, y Carlos Guzmán, quienes colaboraron con mis experimentos en varias oportunidades.

A Ceci Casaravilla, quien ha sido uno de los pilares de mi carrera y mi ejemplo profesional, pero antes que todo una de mis mejores amigas.

A mis amigos fuera del Instituto, que han sabido entender cada una de mis ausencias y han seguido siempre ahí.

A Rodolfo y a Ruth que me dieron un pedacito de hogar estando lejos.

A Gastón, mi amor y compañero indispensable, que desde el comienzo ha sido un apoyo inconmensurable en todo, incluida la culminación de esta etapa en la que estuvo a cada momento hasta para corregir capítulo a capítulo.

A Mati, mi hermano y amigo, que ha estado desde siempre, que me ha ayudado miles de veces en el transcurso de toda mi carrera y quién también me ayudó con las correcciones y dudas lingüísticas.

Por último, quiero agradecer a Loreley, mi madre, pilar fundamental de mi vida, quien cada día ha dado todo para que pudiera alcanzar todos los objetivos y sueños de mi vida. Mujer que es mi ejemplo a seguir, de increíble fortaleza y aún más dulzura. Mi madre, quien me enseñó el significado del compromiso absoluto y el amor por lo que uno hace; quien creyendo en mí cada día, me enseñó a confiar en mí misma y me mostró que alcanzar las grandes metas no es solo planificar y trabajar, sino también tener fe en que todo llegará en el momento más oportuno. A ti Mamá, gracias!

A todos, gracias!!

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	5
LISTA DE ABREVIATURAS	7
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	8
I.1. Infecciones del tracto respiratorio: Neumonía adquirida en la comunidad y el estado actual del problema.....	8
I.1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> : principal agente etiológico de la NAC.....	9
I.1.2. Respuesta inmune durante la neumonía neumocócica.	13
I.2. Desarrollo de terapias anti-infecciosas basadas en el empleo de ligandos de Receptores de Reconocimiento de Patrón.	19
I.2.1. Receptores de Reconocimiento de Patrón.....	20
I.3. Flagelina, un ejemplo de reconocimiento redundante.	25
I.4. Terapias anti-infecciosas basadas en el empleo de ligandos de Receptores de Reconocimiento de Patrón.	27
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	31
Objetivo general:	31
Objetivos específicos:.....	31
CAPÍTULO III: MATERIALES & MÉTODOS.....	32
III.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	32
III.1.1. Preparación del stock madre y de trabajo.	32
III.2. Agonistas de PRRs & Proteínas.	34
III.2.1. Flagelinas.....	34
III.2.2. Lipopéptido Activador de Macrófagos 2 (MALP-2) y S-[2,3-bispalmitoiloxi-(2R)-propil]-R-cisteinil-amido-monometoxil polietilenglicol (BPPcysMPEG).	36
III.2.3. CpG ODN 1826.....	36
III.2.4. Ácido cíclico 3', 5'-diguanílico (c-di-GMP)	36
III.2.5. Ácido poliinosínico-policitidínico (poli(I:C)).....	36
III.2.6. α -galactosilceramida, variante peguilada (α -GalCer-MPEG).....	37
III.2.7. Lipopolisacárido (LPS).....	37

III.2.8. Ovoalbúmina (OVA) y toxoide de neumolisina PLYt.	37
III.3. Animales	38
III.3.1. Infección intranasal con aislados clínicos de <i>S. pneumoniae</i>	38
III.3.2. Determinación de la carga bacteriana en órganos y tejidos.	38
III.3.3. Administración sublingual de compuestos.	39
III.3.4. Depleción de células Gr1 ⁺	39
III.3.5. Transferencia adoptiva de linfocitos purificados de ratones OT-II.	40
III.4. Células.....	40
III.4.1. Cultivo de la línea celular A549.	40
III.4.1. Purificación de neutrófilos humanos y ensayos de activación de estallido respiratorio.	41
III.4.2. Aislamiento de células dendríticas de médula ósea.	41
III.5. RT-qPCR:	42
III.6. Citometría de flujo.	44
III.7. Histología.....	45
III.8. ELISA.	46
III.9. Análisis estadístico.....	47
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	48
IV.1. Puesta a punto de un modelo murino de neumonía neumocócica	48
IV.1.1. Optimización de las condiciones de cultivo, mantenimiento de cepas de <i>S. pneumoniae</i> e infección experimental en ratones por ruta intranasal.....	50
IV.1.2. Caracterización del modelo de neumonía invasiva en ratones	52
IV.1.3. Discusión Sección IV.1.....	60
IV.2. Evaluación de agonistas de PRRs como herramientas terapéuticas contra la neumonía neumocócica	65
IV.2.1. Evaluación de <i>MAMPs</i> como agentes terapéuticos para el tratamiento de la neumonía neumocócica invasiva.....	67
IV.2.2. Caracterización de la protección mediada por administración i.n. de flagelina de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium.	70
IV.2.3. Discusión Sección IV.2.....	77
IV.3. Bases celulares y moleculares de la protección mediada por flagelina frente a la neumonía neumocócica.	84
IV.3.1. Cambios en el perfil transcripcional de pulmones inducidos por la administración intranasal de flagelina durante la neumonía neumocócica.	85

IV.3.2. Impacto del tratamiento local con flagelina sobre las poblaciones celulares residentes en el pulmón y reclutadas desde la periferia.	88
IV.3.3. Poblaciones celulares implicadas en la protección.	93
IV.3.4. Importancia de la señalización por TLR5 y NLRC4.	96
IV.3.5. La instilación local de quimioquinas de la familia ELR-CXC evoca el patrón de reclutamiento celular característico de flagelina e induce protección frente a la neumonía neumocócica.	96
IV.3.6. Respuesta de las células epiteliales de pulmón (neumocitos tipo II) y neutrófilos humanos a la estimulación con flagelina.	98
IV.3.7. Discusión Sección IV.3.	105
IV.4. Rutas alternativas de administración mucosa para el tratamiento de la neumonía neumocócica: Inmunoterapia Sublingual.	110
IV.4.1. Puesta a punto del modelo de administración sublingual de flagelina.	112
IV.4.2. Efectos en los pulmones de la terapia sublingual con flagelina.	114
IV.4.3. Relevancia de los receptores TLR5 y NLRC4 durante la inmunoterapia sublingual con flagelina.	118
IV.4.4. Discusión Sección IV.4.	119
IV.5. Flagelina como adyuvante en vacunas de aplicación sublingual.	122
IV.5.1. Efecto de flagelina en la respuesta humoral específica de antígeno tras la vacunación sublingual: evaluación a nivel sistémico.	124
IV.5.2. Importancia de la señalización por TLR5 y NLRC4 en el efecto adyuvante de flagelina.	125
IV.5.3. Efecto del uso de flagelina como adyuvante en la estimulación de linfocitos T vírgenes: comparación de las rutas sublingual y nasal.	126
IV.5.4. Efecto de flagelina sobre el procesamiento antigénico.	129
IV.5.5. Estudios preliminares:	133
IV.5.4. Discusión Sección IV.5.	136
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN GENERAL & PERSPECTIVAS	139
Agonistas de PRRs como agentes terapéuticos de aplicación intranasal contra la neumonía neumocócica.	139
Mecanismos de protección implicados en el empleo de flagelina como agente terapéutico por ruta intranasal y sublingual.	141
Flagelina como adyuvante para vacunas de aplicación sublingual.	147
Conclusión final.	152

BIBLIOGRAFÍA	153
PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA & TÉCNICA ASOCIADA A LA TESIS	170
Publicaciones derivadas de la Tesis:	170
Publicaciones Asociadas:.....	170
Patentes Asociadas:.....	170
Presentaciones Dictadas:.....	170
Presentaciones en Congresos:	171
Manuscritos en Preparación:.....	171

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae (neumococo) continua siendo el principal agente etiológico de la neumonía adquirida en la comunidad en el mundo entero. Las defensas innatas son esenciales para la detección del neumococo y el control de la infección, en especial en etapas tempranas de la neumonía. Sin embargo, la bacteria ha desarrollado mecanismos de evasión que le permiten escapar de la inmunidad natural, resultando muchas veces en la progresión de la enfermedad. La creciente aparición de cepas resistentes a antibióticos, sumado al alto costo de los tratamientos y estrategias de profilaxis hace imperativo el desarrollo de nuevos tratamientos que puedan complementar los ya disponibles.

Este trabajo se ha enfocado en el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento contra la neumonía neumocócica basadas en el uso de inmunoestimulantes del sistema innato, administrados por ruta mucosa. Partiendo de la hipótesis de que la activación de las defensas innatas es suficiente para impedir la progresión de la enfermedad, se evaluó la capacidad de diferentes agonistas de receptores innatos de conferir protección frente a la neumonía invasiva en ratones, empleando cepas clínicas de *S. pneumoniae*. Se demostró que la protección puede ser conferida tanto empleando agonistas de receptores activados normalmente por neumococo, como empleando agonistas de receptores que no son activados por neumococo durante una infección natural. Sin embargo, no todos los receptores activan respuestas protectoras y la estimulación por ciertas vías puede llegar incluso a tener consecuencias negativas.

Flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, ligando de TLR5/NLRC4-NAIP5, fue uno de los agonistas estudiados. Flagelina confirió mayor protección que cualquiera de los otros agonistas probados, al ser administrado por ruta intranasal por lo que se realizó la caracterización de los mecanismos moleculares y celulares asociados a su capacidad de inducir protección contra la neumonía neumocócica. Los resultados sugieren que el efecto protector requiere del reclutamiento de neutrófilos hacia los espacios alveolares, lo que se logra a través de la secreción de citoquinas de la familia ELR-CXC por parte de las células epiteliales de la mucosa respiratoria y es independiente de células B, T y anticuerpos. La protección mostró ser dependiente de la presencia del motivo de unión a TLR5 en la molécula pero no de la región de interacción con NLRC4-NAIP5, sugiriendo que los efectos observados dependen del reconocimiento extracelular de flagelina a través de TLR5 pero no del inflamasoma. La terapia demostró ser eficaz contra dos serotipos diferentes de neumococo.

En segunda instancia, se realizó la puesta a punto de un modelo de inmunoterapia sublingual y se evaluó la capacidad de flagelina de conferir protección frente al desafío intranasal con neumococo administrada por esta ruta, obteniéndose un buen grado de protección. Al igual que en el modelo de instilación intranasal, la protección inducida por administración sublingual de flagelina, requirió reclutamiento de neutrófilos y de la activación de la vía TLR5, pero no de la activación de inflamasoma vía NLRC4-NAIP5.

Como último tema se estudió la capacidad adyuvante de flagelina en vacunas de aplicación sublingual. Empleando ovoalbúmina como antígeno modelo se comprobó que la administración de flagelina en conjunto con el antígeno incrementa la respuesta de anticuerpos específicos en suero, observándose un perfil de subclases mixto con predominio del perfil Th2. Empleando un modelo de transferencia adoptiva de células T transgénicas para el receptor T y condicionada para reconocer el fragmento 323-339 de la ovoalbúmina en contexto MHC-II, se estudió la capacidad de flagelina de inducir su proliferación en respuesta a una única inmunización sublingual y se determinó la localización anatómica de la respuesta. Se estudió además la contribución de los receptores TLR5 y NLRC4-NAIP5 confirmándose que la señalización a través de uno solo es suficiente para el efecto adyuvante observado. Por último, se analizó la capacidad de flagelina de promover procesamiento antigénico y expresión de moléculas estimuladoras en células dendríticas derivadas de médula ósea.

En suma, este trabajo destaca las ventajas de la potenciación de la inmunidad innata en mucosas mediante el empleo de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento y profilaxis de las infecciones respiratorias, y en particular las causadas por *S. pneumoniae*.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -GalCer: α -galactosilceramida
ADNc: Ácido Desoxirribonucleico copia
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero
CD: del inglés, *Cluster of Differentiation*
CPAs: Células Presentadoras de Antígenos
FACS: del inglés, *Fluorescence Activated Cell Sorting*
FliC: Flagelina
ICE: del inglés, IL1- β converting enzyme
i.n.: Intranasal
i.p.: Intraperitoneal
i.v.: Intravenoso
IL: Interleuquina
iNKT: del inglés, *invariant Natural Killer T*
ITR: Infecciones del Tracto Respiratorio
LBA: Lavado broncoalveolar
MAMP: del inglés, *Microbe Associated Molecular Pattern*
MDL: Mínima Dosis Letal
NAC: Neumonía Adquirida en la Comunidad
NF κ B: del inglés, Nuclear Factor Kappa B
NLR: del inglés, *Nod Like Receptor*
NLR4: del inglés, *NLR Family, CARD domain containing*
PMA : del inglés, phorbol myristate acetate
PMN: del inglés, *Polimorphonuclear Neutrophils*
PRR: del inglés, *Pattern Recognition Receptor*
RT-qPCR: del inglés, *Retro transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction*
s.c.: Subcutáneo
s.l.: Sublingual
SEM: del inglés, *Standard Error of the Mean*
Sp: Streptococcus pneumoniae
STING: del inglés, *Stimulator of Interferon Genes*
TCR: del inglés, *T-Cell Receptor*
TGF- β : del inglés, Transforming Growth Factor beta
Th: del inglés, *T helper*
TLR: del inglés, *Toll Like Receptor*
TNF- α : del inglés, *Tumoral Necrosis Factor alpha*
UFC: Unidades Formadoras de Colonias

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I.1. Infecciones del tracto respiratorio: Neumonía adquirida en la comunidad y el estado actual del problema.

La mayoría de los patógenos humanos invaden el organismo a través de las superficies mucosas, particularmente a través de la mucosa respiratoria. La mortalidad y morbilidad causada por las infecciones del tracto respiratorio (ITR) son un serio problema para la salud pública a nivel mundial, afectando a todos los rangos etarios de la población y a los niños y adultos mayores de manera más importante [1].

Dentro de las ITRs se encuentra la neumonía adquirida en la comunidad (NAC), la cual se define como la infección aguda del parénquima pulmonar que afecta a pacientes no hospitalizados [2]. Cuando la NAC progresa a casos graves provoca, además de falla respiratoria severa, septicemia e incluso la muerte [3]. Esta enfermedad es la primera causa de muerte por infección en el mundo desarrollado y la sexta causa de muerte en general [3,4]. Es una de las infecciones más frecuentes de la infancia, observándose entre 1000 y 4000 casos cada 100.000 niños al año [2] y continúa siendo la principal causa de muerte en menores de 5 años en todo el planeta [5,6]. Se estima que alrededor de 1.4 millones de niños mueren anualmente por esta enfermedad. Este número resulta alarmante considerando que la cantidad de muertes causadas únicamente por neumonía, supera a aquéllas causadas por malaria, tuberculosis y VIH consideradas en conjunto [6].

Los patógenos bacterianos más comúnmente asociados con la NAC son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, estreptococos de grupo A y *Moraxella catarrhalis*. Otros patógenos que causan NAC con menos frecuencia (NAC atípica) son *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente, bacilos Gram negativos dentro de los que se han identificado *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* y algunos virus [3]. En muchos casos la NAC se presenta como no clasificable dado que no logra aislarse el agente etiológico [2,3].

La aparición de las vacunas conjugadas, en particular la vacuna contra *H. Influenzae* tuvo un impacto muy importante en el control de las infecciones respiratorias causadas por ese patógeno, que hasta entonces representaba el primer agente etiológico de la NAC. Sin embargo, ese nicho ha sido ocupado por otros microorganismos [7,8].

Aunque la mortalidad asociada a la NAC ha descendido desde la introducción de los antibióticos hace 6 décadas, hasta ahora no han surgido nuevas terapias de eficacia comparable capaces de reducir el índice de mortalidad. El éxito de las terapias antimicrobianas se ve comprometido por la emergencia de cepas resistentes a los antibióticos principalmente *S. pneumoniae* y *S. aureus*. Las características clínicas de la NAC no permiten establecer un diagnóstico etiológico de neumonía con adecuada sensibilidad, especificidad y rapidez lo que repercute de modo importante en la salud del

paciente, ya que la mejoría depende de que el mismo reciba la terapia adecuada en etapas tempranas de la infección (primeras 48 horas) [2,3]. Por esto, actualmente el tratamiento de la NAC se inicia de forma empírica con una combinación de antibióticos que cubra los agentes etiológicos más comunes de la NAC típica y atípica según la epidemiología de cada región [2,3]. Sin embargo, este tipo de terapia aumenta la probabilidad de desarrollo de resistencia múltiple y puede no ser eficaz frente a agentes ya resistentes. Por esto, existe urgencia en desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas para el tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad así como vacunas más eficaces.

I.1.1. *Streptococcus pneumoniae*: principal agente etiológico de la NAC.

Generalidades & Epidemiología.

S. pneumoniae, es una bacteria gram positiva perteneciente al grupo de los α -estreptococos, que se presenta usualmente en forma de diplococos capsulados.

Tanto en Latinoamérica como en el resto del mundo, el principal agente etiológico de la NAC es *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) [1,3,9]. Además de ser el agente etiológico de la neumonía neumocócica, esta bacteria puede causar otras enfermedades invasivas y no invasivas. Las infecciones no invasivas más importantes causadas por neumococo pueden manifestarse en forma de otitis media, sinusitis y neumonía no bacteriémica. La principal característica de estas infecciones es que permanecen confinadas a la mucosa y son de menor gravedad que las invasivas. Las manifestaciones invasivas de la enfermedad neumocócica son graves y pueden causar la muerte, incluyen meningitis, septicemia y neumonía invasiva.

A partir de la incorporación de la vacuna conjugada contra *H. influenzae tipo b*, el neumococo ha permanecido como el principal causante de las infecciones bacterianas invasivas, particularmente neumonías en niños y es el segundo agente etiológico de las meningitis bacterianas [5-8]. El neumococo ha sido identificado como el patógeno más común causante de neumonía en pacientes adultos, hallándose en el 35% de los casos de NAC en países latinoamericanos, incluyendo los países del MERCOSUR [10].

En 2005 la Organización Mundial de la Salud estimó que cada año en el mundo mueren 1.6 millones de personas a causa de enfermedad neumocócica, dentro de los que casi dos tercios son niños menores de 5 años, mayoritariamente de países en vías de desarrollo [11].

La infección por neumococo comienza con la adhesión de la bacteria al epitelio del tracto nasofaríngeo, el cual es colonizado asintóticamente. Se cree que desde allí puede diseminarse

directamente al medio interno causando la bacteriemia y en un número más limitado de casos se desarrolla meningitis. La neumonía ocurre por aspiración de la bacteria desde la nasofaringe al tracto respiratorio bajo [12]. La colonización no solo constituye el paso inicial de la infección, sino que también representa el reservorio natural de la bacteria. En la nasofaringe neumococo puede permanecer de forma asintomática durante meses y desde allí transmitirse entre los individuos [13,14]. La activación del sistema inmune tanto innato como adaptativo, permite eliminar la colonización que normalmente se produce por un único serotipo a la vez. Durante la colonización nasofaríngea puede darse la generación de anticuerpos específicos para el polisacárido capsular u otros componentes de la bacteria como ser proteínas [12,15].

Aunque el ser humano es considerado el hospedero natural de la bacteria, se han reportado aislamientos equinos que corresponden a cepas de serotipo 3 [16].

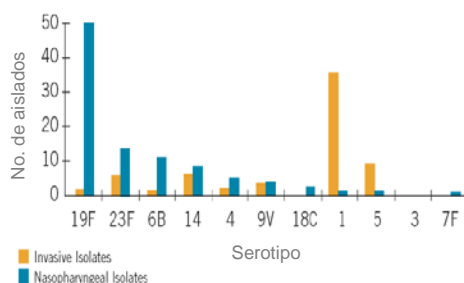


Figura I.1.1: La prevalencia de serotipos varía entre la colonización y enfermedad invasiva. El grafico muestra la prevalencia de los serotipos según aislamientos obtenidos de nasofaringe o de pacientes con enfermedad invasiva. Los resultados muestran que los datos obtenidos de la vigilancia de la colonización nasal pueden no ser un indicador de los serotipos responsables de la enfermedad invasiva, especialmente en regiones con alta prevalencia para serotipos 1 y 5. Tomado de Valles, X. et al. *Trop Med Int Health* 2006; 11(3).

Los polisacáridos de la cápsula que envuelven la bacteria son el principal factor de virulencia en la enfermedad invasiva, y según las diferencias en su composición se han determinado 40 serogrupos diferentes que comprenden más de 93 serotipos de neumococo. La prevalencia de los serotipos varía con la región geográfica y edad de la población. Sin embargo, existen 20 serotipos que se asocian con más de un 70% de los casos de enfermedad invasiva (Figura I.1.1) [1,17]. Los serotipos 1, 5 y 14 en conjunto son responsables del 28 al 43% de los casos de enfermedad invasiva a nivel mundial. Los serotipos 23F y 19F ocupan el segundo lugar causando del 9 al 18% de los casos de enfermedad invasiva mundial [18]. En nuestro país, los serotipos más comúnmente aislados de pacientes pediátricos con neumonía son 14, 1, 5, 3, 9V, 6V y 7F (en orden de prevalencia decreciente) [8].

Hace ya más de 3 décadas que existen vacunas para prevenir la enfermedad neumocócica. Actualmente, se emplean 2 tipos de vacunas contra el neumococo: vacunas a polisacárido purificado y vacunas conjugadas.

La vacuna 23-valente (PPV23) disponible desde principios de 1980, está basada en polisacáridos purificados de 23 serotipos diferentes. Incluye los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Es una vacuna parenteral que se administra como una sola dosis intramuscular o subcutánea. Si bien esta vacuna es efectiva en adultos inmunocompetentes, la naturaleza T-independiente de los polisacáridos hace que su inmunogenicidad sea pobre o nula en niños <2 años de edad. Su eficacia también es baja en adultos mayores o inmunocomprometidos. Esta vacuna genera inmunidad protectora asociada al aumento de

los anticuerpos anticapsulares únicamente contra los serotipos incluidos y no induce inmunidad en mucosas [11,13,18].

Las vacunas conjugadas logran inducir inmunidad en niños ya que la conjugación del polisacárido a un transportador proteico, como por ejemplo la proteína CRM197 de difteria, toxoide tetánico o proteína D de *H. influenzae* los convierte en antígenos T-dependientes. El principal problema de estas vacunas es que incluyen un número limitado de serotipos dadas las limitaciones inherentes a la conjugación y a que el aumento del número de serotipos no siempre se asocia con una respuesta inmune eficiente contra cada uno. La primera vacuna conjugada (PCV7) incluye polisacáridos contra 7 serotipos diferentes, entre ellos: 4, 9V, 14, 19F, 23F, 18C, y 6B. En 2010 fue sustituida por la PCV10 que incorpora los serotipos 1, 5 y 7F. Más tarde se incorporaron los serotipos 3, 6A y 19A que dieron lugar a la PCV13. Las vacunas conjugadas inducen cierto grado de protección contra la colonización, sin embargo se ha observado remplazo por otros serotipos no contenidos en las vacunas que comprometen su eficacia [13,18].

Factores de virulencia.

Además de la cápsula polisacáridica, neumococo presenta un gran número de factores de virulencia que se expresan de manera coordinada para que la bacteria sea capaz de colonizar o invadir los tejidos del hospedero (*Figura 1.1.2*). La cápsula polisacáridica es el factor de virulencia más importante. Esta estructura está compuesta por monosacáridos conectados por enlaces glicosídicos que a su vez se conectan al peptidoglicano de la pared [17]. La cápsula previene el reconocimiento de muchas proteínas por parte del sistema inmune, funcionando como un escudo. Además previene la opsonofagocitosis principalmente interfiriendo con la acción del complemento. Adicionalmente participa de la adhesión de la bacteria al epitelio [17,19].

Neumococo también cuenta con otros importantes factores de virulencia que están constituidos por diversas proteínas. A continuación se describen algunos de los más destacados, una lista más completa se presenta en la *Tabla 1.1.i*.

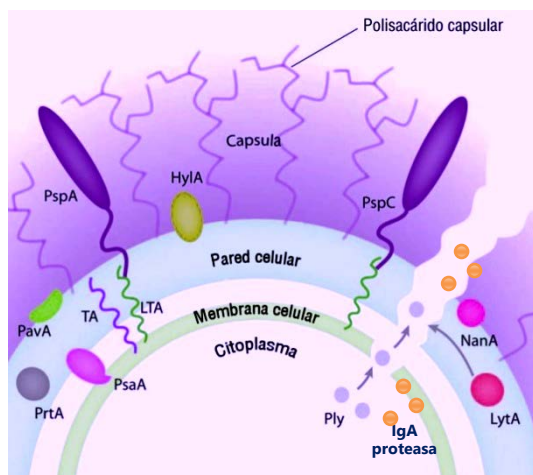


Figura 1.1.2: Representación esquemática de los principales factores de virulencia de neumococo. La cápsula se representa en violeta con los polisacáridos como estructuras ramificadas del mismo color. El resto de las estructuras representan: Serín proteasa (PrtA); Adhesina de superficie (PsaA); Factor de virulencia y adhesión (PavA); Proteína de superficie A (PspA); Hialuronidasa (HylA); Proteína de superficie C (PspC); Neuraminida (NanA); Neumolisina (Ply). LTA: ácido lipoteicoico; TA: ácido teicoico. Tomado y adaptado de Nieto, P. et al., *Curr Gene Ther.* 2013, 13(1).

TABLA I.1.i: Factores de virulencia de *S. pneumoniae* (Tomado de van der Poll, Lancet 2009; 374) y adaptado. [5]

Factor de virulencia	Mecanismo de acción.
Cápsula polisacáridica	Previene eliminación de la mucosa, antifagocítica, inhibe unión de complemento e inmunoglobulinas por impedimento estérico.
Neumolisina	Lisis celular, inhibe batido ciliar, estallido respiratorio y activación de complemento, activa inflammasoma de NALP3.
PspA	Bloqueo de unión de C3b –Factor B, unión a epitelio.
PspC	Inhibe fijación de C3b por unión a Factor H, invade epitelio por unión a plgR (Receptor Polimérico de Inmunoglobulinas)
Polisacáridos de la pared	Activa complemento, proinflamatorio.
PsaA	Unión de zinc y manganeso, brinda protección contra estrés oxidativo.
Ácido lipoteicoico	Unión a PafR (Receptor Activador de Plaquetas), unión a TLR2 y actividad proinflamatoria.
Autolisina LytA	Autólisis, liberación de componentes intracelulares como neumolisina, etc.
Hialuronidasa	Degradación de ácido hialurónico de la matriz extracelular.
Enolasa	Unión a fibronectina.
Sortasa A	Unión de proteínas de superficie a la pared celular.
Pili	Inhibe la fagocitosis, promueve invasión.
PavA	Unión a plasminógeno.
PiaA y PiuA	Transportadores de hierro.
Bacteriocina	Inhibidor de la competencia bacteriana.
Neuraminidasas	Remoción de ácido siálico y mucinas para adhesión de la bacteria.
Biofilm y competencia	Regula positivamente al péptido de competencia CCSP y contribuye al desarrollo de neumonía y meningitis por genes de competencia.
Proteasa de IgA	Degrada IgA1.
Fosforilcolina	Unión a PafR.
PsrP	Promueve invasión tisular.
Proteína de unión a Colina	Función desconocida, pero relevante en infección en sangre y pulmones.

Neumolisina (Ply) es una citolisina de 53 kDa altamente conservada que es expresada virtualmente por todos los aislados clínicos de *S. pneumoniae*. Neumolisina es liberada al medio extracelular tras la autólisis de la bacteria. Los monómeros de neumolisina se ensamblan sobre las membranas ricas en colesterol pudiendo provocar la lisis de las células eucariotas [20]. Neumolisina inhibe la deposición de complemento e interfiere con la activación de la vía clásica [21].

Neumococo expresa residuos de fosforilcolina en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular. La fosforilcolina colabora en el anclaje a la pared celular de diferentes proteínas que se conocen como proteínas de unión a colina, entre ellas PspA, PspC y LytA. Por su parte LytA, la autolisina, provoca la liberación de diversos productos inflamatorios además de la neumolisina. PspC y PsaA son dos proteínas muy estudiadas por sus propiedades antigénicas. PspC (del inglés: *Pneumococcal surface protein C*) se encuentra unida a la pared celular y une al factor H del complemento, inhibiendo la activación del mismo sobre la bacteria. PsaA (del inglés: *Pneumococcal surface adhesin A*) se encuentra en la membrana bacteriana y media la adhesión de la bacteria al epitelio. Adicionalmente, neumococo expresa una serie de proteínas líticas que degradan la matriz extracelular, glicolípidos y oligosacáridos del hospedero entre ellas hialuronidasas (HylA), neuraminidasas (NanA, NanB, NanC) y serinproteasas (PrtA). [5,22].

1.1.2. Respuesta inmune durante la neumonía neumocócica.

La mucosa respiratoria está constantemente expuesta a antígenos externos y microorganismos, muchos potencialmente patógenos. El intercambio gaseoso ocurre en el alvéolo, una estructura formada por una delgada pared de células epiteliales de tipo I y II que están íntimamente conectadas (separadas por apenas 0.2 μm) con una red de capilares. El alvéolo permite la difusión de gases pero esta vía representa también una puerta de acceso al medio interno para los microorganismos que alcanzan el tracto respiratorio bajo [23]. El tracto respiratorio posee un completo sistema de defensa, que incluye desde barreras mecánicas y químicas, hasta una compleja red de células inmunes capaces de asegurar la defensa frente a la infección. Los primeros mecanismos de defensa consisten en defensas no específicas como ser, el reflejo de la tos, batido ciliar y producción de mucus, secreción de compuestos antimicrobianos por parte del epitelio como ser lactoferrina, lisozima, defensinas y surfactante [24,25].

La respuesta inmune en las vías respiratorias debe desarrollarse bajo estricto control, de manera de lograr la eliminación del agente patógeno sin que se vea comprometida la función de intercambio gaseoso [23,26].

Los eventos de la respuesta inmune que tienen lugar durante la neumonía neumocócica han sido bien caracterizados. En función de la magnitud de la infección, la respuesta por parte del sistema inmune será diferente. Así es que la defensa frente a la infección con bajas cargas de neumococo se basa principalmente en la eliminación de las bacterias por parte de los macrófagos alveolares que las fagocitan; en cambio, la respuesta frente a un mayor número de bacterias requiere la participación de varios factores humorales y celulares adicionales para la eliminación efectiva del patógeno. A continuación se describen brevemente los sucesos más destacados de la respuesta temprana y tardía durante la neumonía neumocócica.

Cuando ocurre la aspiración de neumococo y éste alcanza las vías respiratorias bajas, los mecanismos defensivos se activan, pero lo hacen de forma muy regulada. Ante el ingreso de una baja carga bacteriana, el principal mecanismo de eliminación será la fagocitosis por parte de los macrófagos alveolares. Los macrófagos alveolares son células residentes de las vías aéreas altamente especializadas en la fagocitosis y también en la regulación de la respuesta inflamatoria. Se caracterizan por su larga vida (con tasas de recambio en el pulmón normal del orden de 3 meses, en los seres humanos) y la capacidad de realizar varios eventos sucesivos de fagocitosis. Su función dual en la defensa frente a los microorganismos invasores y el mantenimiento de la homeostasis, hace que sean capaces de eliminar bajas cargas bacterianas sin provocar la activación de la respuesta inflamatoria. De este modo, se evita reclutamiento leucocitario hacia los espacios alveolares y se preserva la función de la mucosa respiratoria.

Tal caso se observa durante la neumonía neumocócica subletal en ratones, donde ocurre la eliminación de las bacterias sin que se produzca la liberación de citoquinas proinflamatorias. Por el

contrario, cargas infectivas mayores determinan el inicio de la respuesta inflamatoria aguda, producción de citoquinas y reclutamiento leucocitario [27-30].

El importante rol de los macrófagos alveolares en la regulación de la respuesta y mantenimiento de la homeostasis ha sido puesto en evidencia mediante experimentos de depleción. La eliminación de estas células promueve la generación de inflamación mediada por células T, frente a antígenos que normalmente inocuos [31]. Este efecto se ha vinculado con su capacidad de suprimir la presentación antigénica en células dendríticas y de suprimir la migración hacia los ganglios [32,33]. Se ha propuesto que la capacidad presentadora de los macrófagos alveolares es en general pobre. Tampoco se ha descrito su migración hacia los ganglios, por lo que se piensa que no tienen un rol central en la activación de células T específicas de antígeno [26]. En cambio, se ha propuesto que podrían tener un rol activo en la inhibición de la respuesta T antígeno-específica [30].

Recientemente, una serie de estudios han descrito un complejo proceso de supresión activa de la función de los macrófagos, que implica a las células epiteliales alveolares. En este mecanismo de regulación, el íntimo contacto de los macrófagos con las células epiteliales induce la expresión de TGF- β en estas últimas, que lo liberan como una citoquina inactiva en asociación con un péptido LAP (del inglés: *Latency-associated peptide*) del cual debe dissociarse para ejercer su función. La integrina de membrana $\alpha v \beta 6$ expresada en las células alveolares es responsable de la activación de TGF- β , el cual ejerce su efecto supresor sobre los macrófagos [34-37].

A pesar de la estricta regulación, los macrófagos retienen su capacidad de ser activados en respuesta a la producción de citoquinas o tras el reconocimiento bacteriano. Cuando la carga bacteriana supera un umbral, los macrófagos no continúan con la fagocitosis, sino que comienzan a producir citoquinas inflamatorias, secretando principalmente TNF- α e IL8. Éstas, a su vez promueven la síntesis de otras citoquinas inflamatorias y actúan como factores quimiotácticos para el reclutamiento linfocitario [38,39]. La eliminación de mayores cargas de neumococo requiere de la acción concertada de otros tipos celulares y más tarde, de componentes de la inmunidad adaptativa.

La secreción de estas citoquinas induce cambios en el endotelio, favoreciendo el aumento de moléculas de adhesión que intervienen en el proceso de rodamiento, adhesión y extravasación de los neutrófilos, las primeras células reclutadas hacia los espacios alveolares (revisado en [40] y [32]). Los neutrófilos son células cruciales en la defensa contra neumococo [41,42]. Esto ha quedado evidenciado por la mayor susceptibilidad frente a la enfermedad neumocócica de pacientes neutropénicos y en modelos animales en los que se emplean estrategias de depleción para eliminar estas células de la circulación [43-46].

El pulmón es un órgano enriquecido en neutrófilos en comparación con otros. En él se alojan neutrófilos maduros. Si bien se desconoce el motivo por el que permanecen secuestrados allí, se ha postulado que tienen una función de vigilancia y que se encuentran "patrullando" la vasculatura pulmonar. Esto además les permite un rápido ingreso hacia los espacios alveolares cuando son requeridos allí [47,48].

Dado el gran potencial microbicida de estas células, su activación consiste en un proceso de dos pasos, que implica la preactivación mediante citoquinas proinflamatorias como TNF- α o IL1- β , o contacto con las células endoteliales activadas. La preactivación es un requisito necesario para la activación de la NADPH oxidasa y la producción de especies tóxicas del oxígeno [49]. Existen varias quimioquinas capaces de activar a los neutrófilos, pero las de la familia ELR-CXC (que presentan un motivo glutamato-leucina-arginina antes del motivo cisteína-aminocido-cisteína) son las más potentes [50]. Entre las citoquinas ELR-CXC se destacan CXCL8 (o IL8) en humanos y sus homólogos en ratón CXCL1 (o KC), CXCL2 (también llamada MIP2 α) y CXCL5 (o LIX). La producción de estas citoquinas puede ser inducida en respuesta a TNF- α o IL1- β en el epitelio pulmonar [51].

Las quimioquinas ELR-CXC señalizan a través del receptor CCR-2 y promueven la adhesión de los neutrófilos al endotelio. Los quimioatrayentes de neutrófilos son variados y adicionalmente a las quimioquinas, otros factores solubles del hospedero y de los patógenos pueden promover su reclutamiento. Ejemplo de otros quimioatrayentes son el leucotrieno B4, el componente C5a del complemento, péptidos formilados de las bacterias (fMLP). Los quimioatrayentes tienen diferente potencia y pueden clasificarse en intermedios y tardíos, siendo los últimos los más potentes [52].

La segunda señal necesaria para la activación completa y activación de todos los mecanismos microbicidas de los neutrófilos, está en general dada por el reconocimiento de componentes bacterianos a través de los receptores de reconocimiento de patrón.

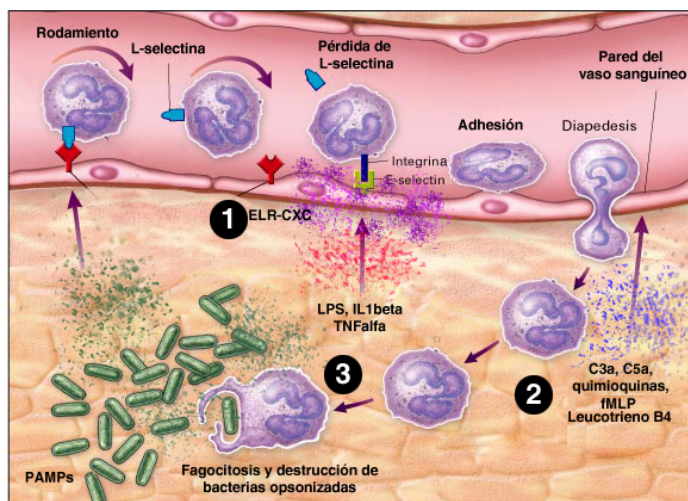


Figura 1.1.3: Cascada de eventos durante el reclutamiento de neutrófilos. 1) Los neutrófilos comienzan el rodamiento mayormente dependiente de selectinas. La adhesión y trans migración dependen principalmente de interacciones entre integrinas. Las quimioquinas TNF- α e IL1- β producidas por el epitelio en respuesta a la infección, alcanzan la luz del endotelio y forman gradientes que atraen a las células y las preactivan. También inducen la secreción de otros factores entre ellos las quimioquinas ELR-CXC que refuerzan el reclutamiento. 2) El rodamiento se ralentiza al detectarse los quimioatrayentes terminales que promueven la diapédesis y la migración a través del endotelio. 3) La detección de los productos bacterianos a través de los receptores innatos otorga la segunda señal, que provoca la activación completa y destrucción del patógeno por fagocitosis y/o liberación del contenido de los gránulos y de especies tóxicas del oxígeno. Tomado y adaptado de Delves, J. N. *Engl J Med* 2000; 343:37-49.

La activación de los neutrófilos y de los otros tipos celulares, depende de que ocurra el reconocimiento de los patógenos a través de receptores innatos codificados en la línea germinal. En conjunto estos receptores reciben el nombre de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs, del inglés: *Pattern Recognition Receptors*; una descripción detallada se presenta en la siguiente sección de este capítulo).

Neumococo presenta varios componentes que son reconocidos por los PRRs (*Figura 1.1.3*), en particular por los miembros de la familia de los receptores de tipo Toll (TLRs, del inglés: *Toll Like Receptors*) y también de la familia de los receptores de tipo NOD (NLRs, del inglés: *Nod Like Receptors*). Dentro de los ligandos de neumococo que son reconocidos por miembros de TLRs se destacan: ADN bacteriano por parte de TLR9 [53] y el ácido lipoteicoico a través de TLR2 [54]. Dentro de los NLRs se ha reportado que NALP3 reconoce a neumolisina [55], mientras que NOD2 reconoce al muramil-dipéptido, componente del peptidoglicano [56].

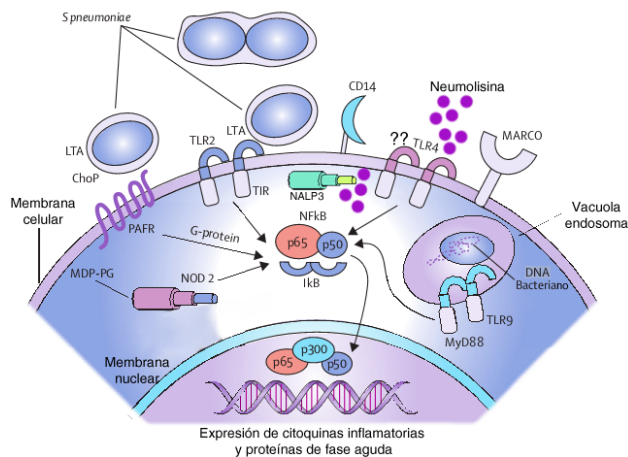


Figura 1.1.4: Representación esquemática del reconocimiento de neumococo por parte de algunos receptores del sistema inmune.. *S pneumoniae* es reconocido por diferentes receptores innatos. El receptor de tipo Toll (TLR) 2 reconoce el ácido lipoteicoico, TLR9 reconoce ADN bacteriano. Se ha propuesto que TLR4 reconoce a neumolisina, pero su rol es discutido. MARCO (de *Macrophage receptor with collagenous structure*) se expresa en macrófagos alveolares y contribuye a la respuesta innata. CD14 y PAFR reconocen a neumococo pero se cree que son empleados por la bacteria para invadir el tejido y la sangre. En el citoplasma, NOD2 y NALP3 reconocen al muramil dipeptido y neumolisina respectivamente. Las siglas corresponden a las siguientes abreviaturas en inglés: ChoP: *phosphorylcoline*; PAFR: *platelet-activating factor receptor*; TIR: *toll-interleukin-1 receptor domain*; MyD88: *myeloid differentiation primary response protein-88*; NFκB: *nuclear factor κB*; IκB: *inhibitor κB*. Tomado y adaptado de van der Poll, *Lancet* 2009; 374).

La importancia de la señalización a través de estos receptores, en particular de los receptores de la familia Toll, se ha puesto en evidencia por la mayor susceptibilidad que presentan los ratones deficientes en la molécula adaptadora MyD88 frente a neumococo. MyD88 es un intermediario crucial en las vías de señalización intracelulares de dichos receptores requerida para la activación y translocación nuclear de NFκB, el cual promueve la transcripción de genes que codifican para citoquinas inflamatorias [57,58]. La misma situación se ha observado en humanos que presentan polimorfismos para MyD88 o IRAK-4, una quinasa que actúa en la misma vía [59,60].

Otros receptores no pertenecientes a estas familias también reconocen al neumococo. Recientemente, se reportó que el TCR semi-invariante de células $V\alpha 14i$ NKT, reconoce

glicolípidos de esta bacteria [219]. Además el receptor STING se ha implicado en el reconocimiento de di-nucleótidos cíclicos como c-di-AMP y c-di-GMP, ampliamente empleados como segundos mensajeros en bacterias [61,62].

Por otra parte la proteína C reactiva también funciona como un receptor soluble reconociendo residuos de fosforilcolina. Adicionalmente, se ha demostrado la importancia del receptor MARCO, un receptor de tipo *Scavenger*, en el reconocimiento de neumococo [5].

El complemento juega un rol muy importante en la defensa contra neumococo, siendo que individuos con deficiencias en el sistema de complemento, tienen susceptibilidad aumentada frente la infección invasiva causada por neumococo [63]. Tanto la vía clásica del complemento como la alternativa son importantes durante la infección por neumococo. La activación de la vía clásica en estas etapas de la infección, donde aún no se han generado anticuerpos específicos, depende en gran medida de los

anticuerpos naturales del tipo IgM [64]. La activación del complemento y los anticuerpos naturales permiten la eliminación de neumococo mediante opsonofagocitosis por parte de los neutrófilos.

Otros tipos celulares han sido también implicados en la defensa frente a neumococo. Kadioglu y colaboradores reportaron un importante infiltrado de células T-CD4⁺ y células B durante la infección intranasal en ratones, que coincide temporalmente con el momento en que el crecimiento de la bacteria cesa [65]. El mismo autor mostró además que el reclutamiento de los linfocitos T-CD4⁺ es importante en la defensa frente a la neumonía, puesto que ratones deficientes en MHC-II y que por tanto carecen de estas células presentan susceptibilidad aumentada a la infección. Además observó que el reclutamiento de los linfocitos T-CD4⁺ está asociado a la expresión de neumolisina por parte de neumococo, ya que no se observa en ratones infectados con una cepa de neumococo deficiente en la citolisina [66]. Estas células T son del tipo efector y secretan cantidades importantes de IFN- γ capaz de activar a los macrófagos [30].

Las células T $\gamma\delta$ tienen un rol regulatorio sobre macrófagos y células dendríticas, y se postula que su efecto citotóxico tiene un rol importante en el restablecimiento de la homeostasis [30].

Si la eliminación de la infección es exitosa, tendrá lugar la terminación de la respuesta inflamatoria y la restructuración del tejido. La fase de resolución es activa e involucra la apoptosis de diferentes tipos celulares. En particular, la apoptosis de los macrófagos alveolares contribuye a la disminución en la producción de TNF- α y por tanto en el reclutamiento reducido de neutrófilos [67]. Los neutrófilos y las células T también sufren apoptosis. Los cuerpos apoptóticos y demás restos celulares son eliminados por eferocitosis o fagocitosis, favoreciendo la reconstrucción del tejido, mientras que parte de las células T sobrevivientes permanecerán en el alvéolo como células efectoras de memoria [30]. En la Figura I.1.5 se presenta un esquema que representa los principales eventos que tienen lugar durante la neumonía neumocócica ya descritos.

Por último cabe destacar que en los últimos años nuestro grupo de investigación ha estudiado el rol de las células Th17 durante la neumonía neumocócica. Este tema escapa al alcance de este trabajo, por lo que no se presenta una revisión del mismo en este capítulo. Un análisis detallado del tema puede encontrarse en la tesis de la Dra. Rial y en la publicación de Marques *et al.*, 2012 incluida en el Anexo de este trabajo [68,69].

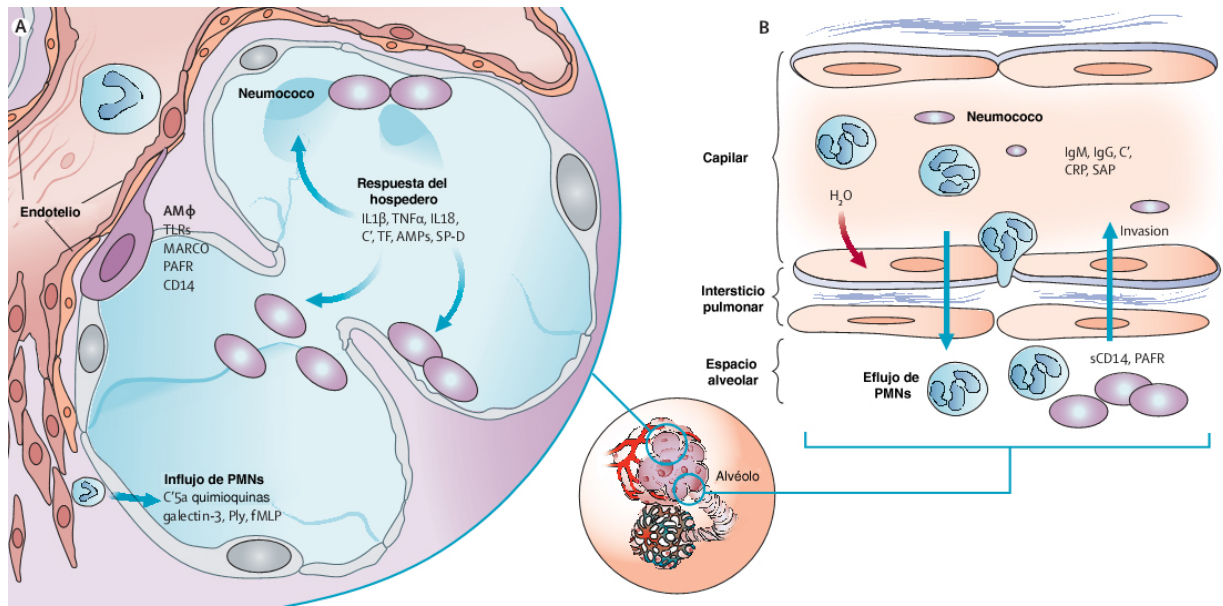


Figura 1.1.5: Principales eventos durante la neumonía neumocócica. (A) El neumococo que alcanza el tracto respiratorio bajo es reconocido mediante los PRRs en células epiteliales y macrófagos alveolares. A bajas dosis infectivas, las células epiteliales y los macrófagos alveolares se encargan de la eliminación de la bacteria sin que suceda el reclutamiento de neutrófilos. La secreción de citoquinas es baja y se producen otros factores como surfactante (SP-D), péptidos antimicrobianos (AMP) y complemento (C). Estos mediadores se inducen en altas dosis frente a cargas bacterianas mayores, promoviendo el reclutamiento de neutrófilos (PMNs), junto con otros quimioatrayentes, incluyendo C5a, galectina 3 y factores bacterianos como formil-metionil-leucina-fenilalanina (fMLP) y neumolisina (Ply). **(B)** Si los mecanismos de defensa son superados por neumococo, la invasión hacia la sangre puede ocurrir con participación del receptor activador de plaquetas (PAF-R) y CD14. En la sangre las defensas incluyen anticuerpos naturales del tipo IgM, la proteína C reactiva (CRP) y proteína amiloide sérica (SAP). TF=factor tisular. AMφ=macrófago alveolar. Tomado de *van der Poll, Lancet 2009; 374*.

I.2. Desarrollo de terapias anti-infecciosas basadas en el empleo de ligandos de Receptores de Reconocimiento de Patrón.

La introducción de las terapias antimicrobianas, representó un avance muy importante en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En particular, la generalización del empleo de los antibióticos tuvo un impacto muy significativo sobre la disminución de la mortalidad causada por infecciones bacterianas, entre ellas las del tracto respiratorio [3].

Sin embargo, a medida que más drogas comenzaron a utilizarse de forma habitual, ejercieron presión selectiva sobre los microorganismos que empezaron a desarrollar estrategias de resistencia para prevenir su propia desaparición. En las últimas décadas un número importante de bacterias causantes de enfermedades graves desarrolló resistencias a múltiples antibióticos. Dentro de las Gram-positivas se encuentran *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE) y *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina (PRSP). Mientras tanto, en las Gram-negativas se ha observado desarrollo de resistencia en base a beta lactamasas de amplio espectro (ESBL), carbapenemasas (CREs) y las enzimas llamadas amp-C, que pueden ser fácilmente transferidas entre especies de enterobacterias. Además, la situación se agravó con la aparición de cepas multi-resistentes extremadamente difíciles de tratar. Adicionalmente la generación de resistencias se ha observado en otros patógenos clínicamente relevantes como por ejemplo: *Neisseria gonorrhoeae*, *Clostridium difficile*, *Haemophilus influenzae* y *Mycobacterium tuberculosis*. También han aparecido resistencias a antifúngicos y antivirales [70].

Puesto que el desarrollo de nuevos antibióticos se ha enlentecido, en las últimas décadas han comenzado a explorarse alternativas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Los nuevos agentes antimicrobianos deberían idealmente controlar la infección en corto tiempo y promover múltiples mecanismos microbicidas simultáneamente, de modo de dificultar el desarrollo de resistencias o mecanismos de escape. La inmunidad innata se activa rápidamente y ejerce sus efectos a través de múltiples mecanismos microbicidas, que tienen como blanco un muy amplio espectro de patógenos. En ese entendido, el empleo de agentes capaces de potenciar la inmunidad innata es una alternativa interesante. Adicionalmente, la inmunidad innata colabora de modo importante en el desarrollo de respuestas adaptativas y de memoria inmunológica, por lo que los compuestos capaces de estimularla tienen gran potencial adyuvante.

En la última década, diversos agonistas de PRRs, derivados de microorganismos o desarrollados sintéticamente, han sido empleados en el tratamiento de enfermedades infecciosas de diferente etiología, además de otras como cáncer, alergias e incluso como inmunopotenciadores en vacunas (revisado en [71-73]). Dentro de los PRRs, los Receptores de Tipo Toll (TLRs), han sido los más estudiados y por tanto los más explotados para el desarrollo de terapias.

A continuación, se describen los aspectos más destacados de las dos familias más importantes de PRRs, los Receptores de Tipo Toll y los Receptores de Tipo Nod (NLRs). Se hace una breve reseña a los antecedentes de sus usos como antimicrobianos y adyuvantes, y se presenta en mayor detalle un agonista de PRRs, la flagelina.

I.2.1. Receptores de Reconocimiento de Patrón.

La activación de la inmunidad innata puede lograrse a través de un diverso conjunto de receptores codificados en la línea germinal, los PRRs. Estos receptores reconocen varios motivos comunes a microorganismos que se han denominado PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), o de forma más general MAMPs (de *Microbe Associated Molecular Patterns*). Los MAMPs son motivos moleculares conservados que se encuentran formando parte de estructuras esenciales para los microorganismos, siendo por ejemplo componentes estructurales de la pared celular, unidades de ensamblaje de los flagelos, parte del material genético, etc. Su función única en el microorganismo hace que la estructura se mantenga relativamente conservada y que no sea afectada de forma importante por las mutaciones.

Al presente se conocen cuatro clases de PRRs: los TLRs, que fueron los primeros receptores descritos de este tipo y han sido por tanto los más estudiados, los receptores citoplasmáticos NLR de “*Nucleotide binding oligomerization domain (NOD) Like Receptors*”, los receptores transmembrana de tipo lectina C o CLR y los receptores RLR, de “*Retinoic acid inducible gene (RIG) I Like Receptors*”, constituidos por helicasas de ARN localizadas en el citoplasma, que se especializan en el reconocimiento de virus [74,75].

Receptores de Tipo Toll.

El descubrimiento de los TLRs en los mamíferos data de la década del 90, cuando el grupo de Janeway y colaboradores describieron por primera vez el ortólogo humano para el receptor Toll de *Drosophila melanogaster*, implicado en la defensa antifúngica de ese insecto [76,77]. Estudios en una línea monocítica humana implicaron al receptor humano hTLR4 en la respuesta inmunitaria mostrando que era capaz de inducir la secreción de citoquinas inflamatorias y la expresión de CD80, molécula coestimuladora necesaria para la activación de células T vírgenes [77].

El descubrimiento de TLR4 permitió la identificación de un gran número de TLRs en diferentes especies, todos ellos capaces de reconocer diferentes estructuras presentes en microorganismos y exclusivas de ellos. A pesar de la variedad estructural y química de los ligandos de unión a TLRs, el análisis filogenético de los genes de TLRs en vertebrados, mostró que los mismos se agrupan en 6 familias que se caracterizan por reconocer un tipo general de PAMPs. Esto revela que la presión selectiva para mantener el reconocimiento de estos ligandos ha dominado su evolución. Los TLRs se

han dividido según el tipo de ligando reconocido en diferentes familias o subfamilias: subfamilia de TLR2 asociada a reconocimiento de lipopéptidos; familia TLR3 que reconocen ARN doble cadena; familia TLR4 para LPS; familia TLR5 para flagelina y la subfamilia TLR7 a 9 que reconocen ácidos nucleicos y grupos hemo [78].

En mamíferos se han identificado hasta ahora 13 TLRs pero solo se conocen ligandos para 10 de ellos (ver *Tabla 1.2.i*). Aunque los TLRs de TLR1 a TLR9 son conservados entre humanos y ratón, TLR10 no es funcional en ratón ya que presenta una inserción retroviral y los TLRs del 11 al 13 no se encuentran en el genoma humano.

TABLA 1.2.i: Principales agonistas de los receptores de tipo Toll descritos en mamíferos.
Adaptado de: Kawai, T., *International Immunology*, 2009, Vol. 21, No. 4.

Receptor	Co-receptor	Ligando	Localización
TLR1/TLR2	CD14	Tri-acil-lipopéptidos	Membrana celular
TLR2/TLR6	CD14/CD36	Di-acil-lipopéptidos, Zymosan, Ácido lipoteicoico	Membrana celular
TLR2	ND	Peptidoglicano, Lipoarabinomanano, Porinas, mucinas-tGPI, hemaglutinina	Membrana celular
TLR3	ND	ARN doble cadena/poly(I:C)	Endosomas
TLR4	CD14/MD2	LPS, proteínas de membrana virales, neumolisina (??)	Membrana celular
TLR5	ND	Flagelina	Membrana celular
TLR7	ND	ARN simple cadena/R-848	Endosomas
TLR8	ND	ARN simple cadena/R-848	Endosomas
TLR9	ND	CpG no metilado, ADN viral, hemozoína	Endosomas
TLR10	ND	ND	Membrana celular
TLR11	ND	Profilina	Endosomas
TLR12	ND	ND	Endosomas
TLR13	ND	ND	Endosomas

Los TLR son proteínas de membrana de tipo I, compuestas por tres dominios característicos: el ectodominio LRR (de *Leucin Rich Repeats*) que media el reconocimiento del PAMP, un dominio transmembrana y un dominio intracelular homólogo al del receptor de IL1 (IL-1R) que se denomina dominio Toll/IL-1R o dominio TIR, el cual es requerido para la señalización intracelular [79]. Si bien los TLRs están siempre asociados a membranas, pueden ubicarse en la membrana citoplasmática o en membranas endosomales (*Tabla 1.2.i*).

Expresión de los TLRs.

Los TLRs están expresados en todos los tejidos y diferentes tipos celulares, tanto células del sistema inmune como estromales. Gran parte de los análisis acerca de su localización se han realizado en base al estudio de mensajeros dada la poca disponibilidad de anticuerpos específicos para cada receptor.

Las mucosas son en general sitios de alta expresión de estos receptores. En particular, la mucosa intestinal y la mucosa respiratoria expresan muy altos niveles de ARN para los diferentes TLRs. El

pulmón es el órgano que presenta la mayor expresión de TLR5, con niveles que casi triplican los encontrados en el bazo. TLR3 es el segundo receptor más expresado en pulmones, seguido de TLR7, TLR2 y TLR1 [80]. De manera similar, TLR5 y TLR3 son los más expresados en el intestino humano.

En sangre periférica la expresión de los TLRs varía según los tipos celulares. Las células CD19⁺ expresan altos niveles de TLR9 y TLR10, mientras que las células mononucleares expresan principalmente TLR2, TLR4 y TLR8 [80].

Los monocitos presentan expresión constitutiva de TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 [81]. Por su parte los neutrófilos humanos expresan todos los TLRs a excepción de TLR3. TLR5, TLR7 y TLR8 son los que se expresan en menores niveles en estas células, mientras que TLR1, TLR2 y TLR4 son los que se expresan en mayor proporción [82].

La expresión en células B es variable. Las células B vírgenes presentan una expresión baja de todos los TLRs, mientras que las células de memoria expresan constitutivamente varios TLRs y responden proliferando y produciendo anticuerpos cuando son estimuladas con varios ligandos de TLRs. Llamativamente, ningún conjunto de células B expresa TLR5. En general todos los subtipos de células B (B1a, B1b, B de zona marginal y foliculares) presentan niveles altos de TLR9, TLR1, TLR2 y TLR7 (en orden decreciente) [83].

Por su parte las células T-CD4⁺ y T-CD8⁺ expresan todos los TLRs, siendo TLR3, 9, 10, 5 y 1 los más expresados en CD4⁺ y TLR3, 9, 10 y 1 en CD8⁺ (en orden decreciente) [80].

Otros tipos celulares como células NK también expresan diversos TLRs y son activadas en respuesta a sus ligandos [84].

El caso de las células dendríticas es más complejo, dada la cantidad de subtipos definidos para estas células. Muchos de los estudios se han realizado en ratones, por lo que gran parte de la información proviene de dicha especie. Los receptores TLR1, 2, 4, 6, 8 y 9 son expresados tanto por las células dendríticas plasmacitoides (caracterizadas por la baja expresión de CD11c y alta de B220), como por las células dendríticas mieloides o convencionales (que expresan altos niveles de CD11c, acompañado de CD4 o CD8). TLR3 se expresa selectivamente en las células dendríticas CD8 α ⁺, mientras que TLR5 aparece expresado mayoritariamente por las CD4⁺ que además expresan CD11b. TLR7 aparece tanto en las CD4⁺ como en las plasmacitoides [85].

Vías de Señalización.

La respuesta mediada por los TLRs se caracteriza por una cascada de fosforilación intracelular que determina en última instancia la transcripción de genes proinflamatorios que incluyen entre otros, los de las citoquinas IL6, IL12, TNF- α , quimioquinas de la familia CXC y varios genes implicados en la regulación del ciclo celular. Además se estimula la transcripción de genes codificantes para péptidos antimicrobianos y factores de reparación tisular [79,86]. La unión del ligando al TLR induce la

dimerización, que puede ocurrir entre dos receptores iguales o diferentes (como es caso de TLR2 /6 o TLR1/2). Esto permite el reclutamiento de diversos adaptadores moleculares por parte del dominio TIR. Los adaptadores descritos incluyen a las moléculas MyD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response 88*), TIRAP (*Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR) Domain Containing Adaptor Protein*), TICAM-1 y TICAM-2 (*Toll-like Receptor Adaptor Molecule -1, -2*), y SARM (*Sterile Alpha and TIR Motif Containing-1*) [75,79].

Las vías de señalización empleadas por los TLRs pueden, a grandes rasgos, dividirse en las vías dependientes de MyD88 o dependientes de TRIF. Resumidamente, la activación de la vía de MyD88 conduce al reclutamiento de adaptadores que conducen a la activación de quinasas capaces de fosforilar las MAP quinasas (*Mitogen-Activated Protein Kinase 1*) y el I κ B, inhibidor de NF κ B (*NuclearFactor κ B*). Cuando NF κ B es liberado, abandona su localización citoplásmica para pasar al núcleo y allí promover la transcripción génica. Los TLR5, 7, 9 y 11 emplean la vía de MyD88 exclusivamente, mientras que TLR1, 2, 4 y 6 emplean además TIRAP que hace de nexo con MyD88. TLR4 es particular en cuanto a que puede usar tanto la vía de MyD88 como de TRIF [79].

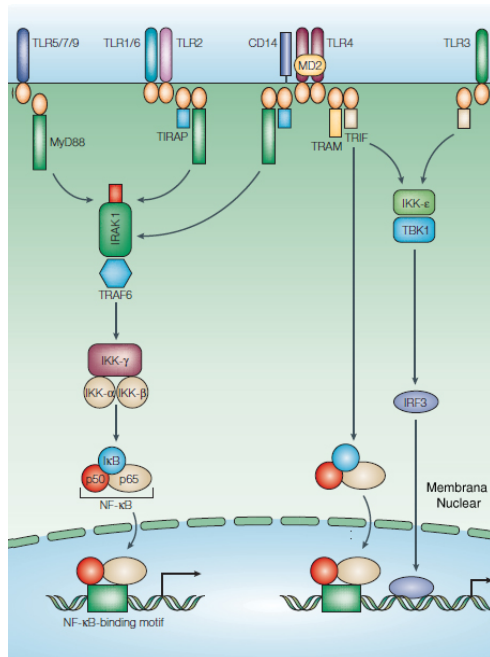


Figura 1.1.6: Vías de señalización a través de los TLRs. La unión del ligando a TLR desencadena la cascada de señalización. En la vía de MyD88, la molécula adaptadora recluta las quinasas de la familia IRAK que interactúan con TRAF-6. Esto conlleva a la activación de MAPK y la fosforilación de IKK, para promover la liberación de NF- κ B y posibilitar su translocación nuclear. TLR-3 y TLR-4 emplean la vía del adaptador TRIF. TLR4 puede señalar por ambas vías. TRIF activa TRAF-6 promoviendo la translocación de NF κ B pero también activa IRF-3 que induce la transcripción de IFN-I. Tomado de Akira, S., *Nat. Rev. Immunol.* 2004, 21(4).

La estimulación a través de TLR4 y TLR3 lleva a la activación de la vía de TRIF, que induce principalmente la producción de interferones de tipo I (IFN-I) además de citoquinas proinflamatorias.

La activación de los TLRs también está sujeta a regulación negativa, que permite a través de la expresión de una serie de genes regular la respuesta inflamatoria desencadenada por su activación y volver al estado de homeostasis. Entre los reguladores más destacados se encuentra A20 o TNFAIP3 (*TNF Alpha Induced Protein 3*), ATF3 o ZFP36. Éstos representan enzimas de modificación, factores de transcripción y un activador de nucleasas respectivamente, que ilustran la regulación a diferentes niveles [87].

Por último cabe destacar que los TLRs están sujetos a una compleja inter-regulación. Esto determina que durante la estimulación simultánea de varios receptores, los receptores puedan establecer interacciones sinérgicas que potencien la secreción de citoquinas. La inhibición recíproca de las vías o la inducción de tolerancia cruzada también tiene lugar (revisado en [88]). Este tipo de interacciones deberán ser tenidas en cuenta a la hora de desarrollar terapias que tengan como blanco la modulación de las vías de los TLRs.

Receptores de Tipo Nod.

Los Receptores de Tipo Nod, también conocidos como proteínas Caterpillar, constituyen otra familia capaz de mediar la activación de la inmunidad innata en respuesta al reconocimiento de los PAMPs. Los NLRs sirven (junto con las proteínas HIN-200) como plataforma de activación para el inflamasoma, un complejo multiproteico que media la auto-activación mediada por proximidad de caspasa 1. La composición del inflamasoma es dependiente del estímulo inicial y según sea el ligando reconocido, será ensamblado sobre los diferentes NLRs [89].

Los NLRs poseen una estructura que presenta 3 dominios bien definidos: un dominio C-terminal que presenta repetidos ricos en leucina LRR, esenciales para el reconocimiento microbiano; el dominio central constituye un dominio de auto-oligomerización que permite el reclutamiento de otros componentes tras la activación; por último presentan un dominio N-terminal variable [75].

En base a sus dominios efectores N-terminales, los NLRs se clasifican en subfamilias. Se reconocen 4 dominios de activación: el dominio de transactivación ácida, el dominio pirina, el dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) y los dominios tipo inhibidor de repetidos de Baculovirus (BIR). Si bien la nomenclatura empleada hasta ahora ha sido variada, se ha llegado a un consenso en el que los NLR que presentan dominios ácidos se denominan NLRA, NLRB para los que contienen dominios tipo BIR, los que presentan el dominio CARD se denominan como NLRC y por último los que contienen el dominio pirina se denominan NLRP, cada miembro de la subfamilia seguido de un número que lo identifica, por ejemplo NLRC4, NLRP3, etc. [90].

El inflamasoma que se ensambla mediante proteínas HIN-200 presenta la proteína AIM2 [91].

La activación de caspasa 1 mediada por el inflamasoma ocurre en diversos tipos celulares, pero ha sido principalmente observada en macrófagos, células dendríticas y células epiteliales. Los ligandos son muy variados, e incluyen componentes bacterianos, virales, parasíticos y varios componentes del propio hospedero que se reconocen como señales asociadas al daño (DAMPs, de *Danger Associated Molecular Patterns*), como por ejemplo ácido úrico o ATP. Algunos de los ligandos caracterizados incluyen el muramil-di-péptido de la pared celular por NLRC2 (NOD2), flagelina por NLRC4 (IPAF) o NAIP5, ácido-di-amino-pimélico por NLRC1 (NOD1), neumolisina por NLRP3 (NALP3) [75].

El ensamblaje del inflamasoma desencadena varios mecanismos efectores que participan en la eliminación de microorganismos y potencian la activación de la respuesta innata. De modo similar a lo descrito para los TLRs, la activación puede desencadenar la movilización de NFκB hacia el núcleo

promoviendo la secreción de citoquinas inflamatorias [92]. Los efectos mediados a través de caspasa 1 son muy variados y abarcan desde la activación de pro-IL1- β y pro-IL18, dos potentes citoquinas proinflamatorias que son sintetizadas en forma de precursores inactivos.

IL1- β actúa tanto a nivel local como sistémico en respuesta a la infección y daño tisular. Induce la respuesta febril, activa los linfocitos e induce su migración. Es la citoquina inflamatoria más potente que se conoce. IL18, aunque carece de actividad pirogénica, induce la secreción de IFN γ en células T activadas y NK en presencia de IL12. Regula además la polarización de las respuesta Th1 y Th17 [91].

Caspasa 1 desencadena otros mecanismos efectores además de la activación de las citoquinas mencionadas. Induce un tipo de muerte celular conocida como piroptosis que resulta crucial para la eliminación de ciertos patógenos intracelulares, como por ejemplo *Salmonella*, *Legionella*, entre muchos otros. Además contribuye en la activación de vías de reparación celular (una revisión completa del tema puede encontrarse en [91]).

A continuación se presenta en más detalle la descripción de un PAMP reconocido por múltiples PRRs, la flagelina, agonista de TLR5, NLRC4 y NAIP5.

1.3. Flagelina, un ejemplo de reconocimiento redundante.

Flagelina es la proteína estructural del flagelo bacteriano, una estructura característica de las bacterias móviles. Esta proteína se encuentra presente en un gran número de bacterias patógenas y no patógenas. Está codificada por diferentes genes según la especie, a los que se denomina FliC, FliA, FljB, etc. Las flagelinas de las diferentes especies varían ampliamente, presentando pesos moleculares diversos que van de 28 a 80 kDa. Sin embargo, presentan regiones conservadas de en las regiones amino y carboxilo terminales de aproximadamente 170 y 100 residuos. En adelante se describe la estructura tomando como modelo la flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

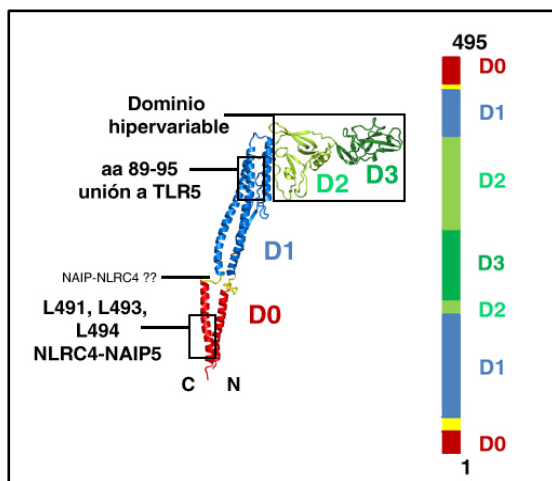


Figura 1.1.7: Estructura de Flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. La flagelina FliC, es una proteína de 495 aminoácidos, organizada en 4 dominios (D0-D3). La barra vertical simboliza la estructura lineal de la proteína y las regiones correspondientes a cada dominio. En rojo D0, azul D1, verde claro D2 y verde oscuro D3.

Se señalan las regiones propuestas de interacción con los receptores TLR5, NLRC4 y NAIP5. Con signos de interrogación se señala una región aún no identificada que podría participar de la formación del complejo FliC-NAIP5-NLRC4.

La flagelina de *S. Typhimurium* está compuesta por 495 aminoácidos que se organizan en 4 dominios D0 a D3. Los dominios N (160 aa) y C (90 aa) terminales forman estructuras en α -hélice que constituyen los dominios D0 y D1, los cuales se ubican en el *core* del filamento cuando se ensambla el flagelo. Estas regiones pierden la estructura cuando están en solución. La región variable, se organiza como hojas β plegadas y constituye los dominios D2 y D3. Esta es la región que queda expuesta al exterior cuando se forma el flagelo y por tanto es contra la que se generan normalmente los anticuerpos anti-flagelina. Es la más variable y constituye la base de la clasificación serotípica H en las enterobacterias [93].

Reconocimiento por TLR5

La flagelina en su forma monomérica media sus efectos proinflamatorios por TLR5 [94]. En base a los estudios de flagelinas de alfa y gama proteobacterias, se determinó que la región comprendida entre los aminoácidos 89 a 96 es requerida para la señalización por TLR5. Las bacterias como *Campylobacter* o *Helicobacter*, que presentan flagelinas incapaces de activar la vía de TLR5 muestran gran diferencia con la misma región de la flagelina de *S. Typhimurium*, FliC, la cual ha mostrado gran poder inflamatorio [95]. Aunque al presente no se ha cristalizado la estructura de flagelina con el TLR5 humano o de ratón debido a las dificultades para expresar el TLR5 de mamíferos, se ha propuesto un modelo de interacción a partir de la estructura cristalina del TLR5 del pez cebra con la flagelina FliC de *S. Typhimurium*. La estructura propone una interacción de heterodímeros TLR5-FliC en relación 1:1 que se ensamblan en complejos 2:2 cola con cola que se estabiliza por interacciones del dominio D1 con la superficie convexa del TLR5 opuesto a ella [96]. Otros estudios han mostrado evidencia de la interacción física de TLR5 y FliC mediante inmunoprecipitación [97].

Reconocimiento por NLRC4 y NAIP5.

Más recientemente se demostró que flagelina es reconocida por dos NLRs a través de los que activa el inflammasoma y caspasa 1. El dominio carboxilo terminal de flagelina interacciona con NLRC4 y NAIP5. Se ha propuesto que tres aminoácidos de leucina C-terminales, altamente conservados en las flagelinas de las diferentes especies son necesarios para la formación del complejo. Lightfield y colaboradores han propuesto que NLRC4 y NAIP5 interaccionan con la región comprendida en los 35 aminoácidos C-terminales. NLRC4 puede mediar la activación del inflammasoma en ausencia de NAIP5, pero los dos son requeridos para reconocer el péptido C-terminal de la proteína. Asimismo, este grupo ha planteado que el externo N-terminal de la proteína regula el requerimiento de NAIP5 para el ensamblaje del complejo [98,99].

Por otra parte, un estudio más reciente ha sugerido que la región N-terminal de 52 aminoácidos también estaría involucrada junto con la C-terminal, en la formación del complejo FliC-NAIP5-NLRC4. En el mismo trabajo proponen un modelo de asociación donde flagelina sería requerida para inducir un cambio conformacional en NAIP5 que permite posteriormente el ensamblaje de un complejo NAIP5-NLRC4 multimérico. Sin embargo, flagelina no pudo ser purificada en asociación con el mismo. Adicionalmente, mientras NLRC4 en ausencia de NAIP5 es capaz de desencadenar la muerte apoptótica de macrófagos, NAIP5 en ausencia de NLRC4 no induce dicho efecto [100].

En conjunto los estudios apoyen el reconocimiento por parte de los 3 receptores, siendo la interacción TLR5-FliC y FliC-NLRC4-NAIP5 independientes entre ellas. Resta por elucidar con mayor precisión el rol de NAIP5 en la activación de caspasa 1. De momento, la evidencia indica que sus efectos son en todos los casos dependientes de la presencia de NLRC4.

La unión de flagelina a TLR5 desencadenará la cascada de señales que involucra a la molécula adaptadora MyD88 y culmina en la translocación nuclear de NF κ B y por tanto la activación de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas involucradas en el reclutamiento y activación celular (revisado en [101] y [79,102]). Por su parte, la activación del inflammasoma de NLRC4 y NAIP5 generará activación de pro-IL1- β y pro-IL18 y muerte celular por piroptosis. Así es que TLR5 y NLRC4-NAIP5 podrían actuar conjuntamente de modo de potenciar la inflamación, siendo TLR5 una señal capaz de inducir la transcripción de pro-IL1- β y la activación de los NLRs la segunda señal requerida para la activación de dicha citoquina.

I.4. Terapias anti-infecciosas basadas en el empleo de ligandos de Receptores de Reconocimiento de Patrón.

La inmunidad innata cuenta con un sistema redundante de receptores de reconocimiento que, como ya se comentó anteriormente, permiten activar de forma rápida una serie de mecanismos efectores con amplia capacidad microbicida. Los receptores están distribuidos en prácticamente todos los tipos celulares, por lo que sus ligandos pueden ser empleados para desencadenar respuestas en diversos sitios anatómicos y a la vez mediados por varios tipos celulares. Estas características, hacen a la inmunidad innata un blanco muy interesante para el desarrollo de terapias anti infecciosas.

Además de la gran rapidez de activación y la variedad de mecanismos microbicidas que son puestos en marcha a través de la inmunidad innata, ésta presenta la ventaja adicional de ser una respuesta autolimitada. Como se mencionó antes, junto con el programa transcripcional que determina la expresión de genes proinflamatorios, la misma señal desencadena en simultáneo la activación de mecanismos reguladores que serán responsables de restablecer la homeostasis.

El concepto subyacente a las terapias anti-infecciosas basadas en la activación de la inmunidad innata, es generar una respuesta lo suficientemente potente como para ser capaz de superar los mecanismos de evasión de los microorganismos y al mismo tiempo autocontenida y autolimitada, de forma de evitar efectos deletéreos en el hospedero debidos a una inflamación descontrolada.

En la última década se han explorado diferentes terapias anti-infecciosas basadas en agonistas naturales y sintéticos de los receptores innatos, principalmente los TLRs. Además, estos compuestos han recibido atención dado su potencial como adyuvantes. A continuación, se presenta un breve resumen sobre los avances en este campo y de la experiencia a nivel clínico y preclínico del uso de potenciadores de la inmunidad innata para el tratamiento de las infecciones de distinta etiología.

Terapia anti-infecciosa.

La terapia anti-infecciosa mediante el empleo de ligandos de PRRs comenzó a explorarse incluso muchos años antes de que se describieran los TLRs. Diversos estudios mostraban en la década del 70 que la administración de endotoxina era capaz de conferir protección contra infecciones de etiología viral o bacteriana, cuando era administrada previo a la infección, en modelos animales [103]. Sin embargo, la experiencia luego demostró que el LPS purificado es extremadamente tóxico, motivo por el cual, el empleo de formulaciones que contengan el lípido A intacto no están aprobadas para su uso clínico [104]. Con el descubrimiento de los TLRs y la identificación de sus ligandos, el desarrollo de estrategias anti-infecciosas basadas en el uso de agonistas de PRRs comenzó a expandirse. Varios agonistas naturales fueron evaluados en modelos preclínicos de infección y concomitantemente comenzaron a desarrollarse análogos sintéticos de algunos ligandos.

Los análogos sintéticos del lípido A se emplearon con éxito para tratar infecciones de patógenos no relacionados (*Listeria monocytogenes* y virus influenza). Aunque el mecanismo preciso de estos análogos no se describió con precisión, se observaron efectos pleiotrópicos que involucraron la secreción de diversas citoquinas y quimioquinas [104]. Llamativamente, entre las citoquinas inducidas por el tratamiento, no se detectó IFN γ , una citoquina crucial para la eliminación de *Listeria*. De modo similar, la administración de la toxina sensible al calor LTK63 de *E. coli* confirió protección contra infecciones virales y fúngicas. En este caso la protección se asoció con la activación de células dendríticas y actividad incrementada de los linfocitos citotóxicos [105]. En otros ejemplos similares, el pretratamiento con el agonista de TLR9, CpG, brindó protección frente a la infección pulmonar con *Klebsiella pneumoniae* a través de la activación de células NK y T $\gamma\delta$, producción de citoquinas como IL12, IFN γ , TNF- α y quimioquinas de la familia ELR-CXC [106]. Por su parte flagelina, indujo protección frente a la infección por *Pseudomonas aeruginosa*, pero esta vez la protección se vio asociada a la producción del péptido antimicrobiano, CRAMP (*Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide*) [107].

Estos ejemplos ponen en evidencia dos características importantes de la terapia anti-infecciosa basada en la potenciación de la inmunidad innata: por un lado muestran la amplia variedad de mecanismos efectores que son activados tras la administración de un único tipo de molécula purificada, y por otro demuestran que tanto la potenciación de los mecanismos naturalmente activados por el patógeno, así como de otros no estimulados por la infección natural, son útiles para conferir protección.

Sin embargo, esto también nos demuestra que aún tenemos poco conocimiento sobre los mecanismos que controlan este tipo de respuestas y desconocemos las condiciones en que puede ocurrir una amplificación excesiva de la misma. Dado el gran potencial de este tipo de tratamientos es necesario seguir indagando sobre las vías de activación y regulación de la inmunidad innata y los efectos específicos de cada compuesto inmunomodulador en el contexto de una infección dada.

Vacunación en mucosas y adyuvantes.

El empleo de los agonistas de PRRs como adyuvantes en vacunas se ha desarrollado más que su potencial como agentes terapéuticos. Varios agonistas de TLRs incluyendo ligandos para TLR9, TLR4, TLR5, TLR7/8 están siendo evaluados en estudios clínicos y al menos 2 vacunas que emplean como adyuvantes ligandos de TLR4, han sido aprobadas para su uso en humanos (Fendrix y Supravax) [108,109].

Todas las vacunas actuales y la gran mayoría de las vacunas en desarrollo, son de administración parenteral. Si bien estas vacunas, inducen buena respuesta sistémica, las respuestas en mucosas son en general pobres [110-112]. Además, la aplicación de compuestos por vía parenteral tiene asociadas algunas dificultades como el requerimiento de agujas estériles, personal entrenado para su administración y estrictas condiciones de control de calidad para la manufactura. Otra estrategia para la inmunización masiva es la administración directa en mucosas. La vacunación mucosa ofrece muchas ventajas respecto a la parenteral en cuanto a la facilidad de aplicación, la mayor adhesión del paciente al tratamiento e incluso permite disminuir los costos asociados a la fabricación.

Hoy en día las vacunas de aplicación mucosa empleadas en humanos, son vacunas orales (contra la poliomielitis, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* y rotavirus), a excepción de una que es de aplicación intranasal (contra el virus de influenza). Todas ellas están basadas en patógenos vivos atenuados y/o vectores que contienen sus propias señales de peligro y expresan moléculas del patógeno que median la adhesión y entrada a través del epitelio [110,112,113]. Esto hace que las vacunas sean inmunogénicas y eficaces, pero al mismo tiempo más riesgosas en términos de reversión hacia una forma virulenta, lo que también limita su uso en la población inmunocomprometida.

El empleo de moléculas definidas (vacunas a subunidad) es una alternativa más segura, pero en general, los compuestos purificados no son lo suficientemente inmunogénicos. Es así que la principal limitante para el desarrollo de nuevas vacunas a subunidad de aplicación mucosa es la falta de adyuvantes.

La combinación adecuada de antígenos y adyuvantes puede promover tanto respuestas locales, como en mucosas distantes y a nivel sistémico. La vacunación mucosa estimula la producción de IgA secretoria, IgG y respuestas de linfocitos T citotóxicos y colaboradores [110-115]. Además, es versátil en términos de método y ruta de aplicación.

Uno de los desafíos más grandes del desarrollo de vacunas de aplicación mucosa, es el poder superar la “barrera tolerogénica” impuesta por la mucosa. Cabe recordar que, aunque las mucosas poseen todos los elementos para montar respuestas inmunes eficientes, dada su continua exposición al ambiente, mantienen un control estricto de la respuesta. Los adyuvantes empleados deberán poder superarla sin causar detrimento de su función. Los agonistas de PRRs son candidatos ideales a ser incluidos como adyuvantes puesto que tanto las células estructurales como las células residentes del sistema inmune, expresan altos niveles de dichos receptores.

Las estrategias de entrega para la inmunización son variadas. Puede hacerse por vía oral, intranasal, bucal, sublingual, vaginal, etc., ya sea en forma de soluciones, liofilizados, spray o gotas. Dentro de las vías más estudiadas se encuentran la ruta oral y la ruta intranasal [112,114]. La ruta oral ha sido la más empleada para las vacunas en mucosas, presenta la desventaja de requerir altas dosis de antígeno, sistemas de estabilización que los protejan de los bajos pH del sistema digestivo y no genera inmunidad a nivel del tracto respiratorio [112]. La ruta intranasal requiere dosis de antígeno mucho menores y es atractiva por la facilidad de aplicación. Sin embargo, existen antecedentes de asociación de la vacunación intranasal con el desarrollo de parálisis facial [116].

Otra alternativa para la administración de compuestos inmunoestimulantes es la ruta sublingual. La misma ha sido ampliamente utilizada para la administración de lisados bacterianos capaces de conferir protección contra las infecciones respiratorias recurrentes de diferente etiología [117-119], así como para el tratamiento de alergias y asma [120-125].

La utilidad de emplear agonistas de PRRs ya ha sido demostrada en la vacunación sublingual [126-128], pero aún resta evaluar mayor número de candidatos y avanzar en la comprensión de los mecanismos inmunes en la inducción de respuestas adaptativas por esta ruta, por lo que es un área a seguir explorando.

En suma, la potenciación de la inmunidad innata a través del empleo de ligandos de PRRs es una estrategia sumamente atractiva para el tratamiento y prevención de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, existe aún mucho por explorar, en particular todos los aspectos vinculados a los mecanismos inmunes que se desencadenan tras estas terapias, su regulación y su utilidad frente a diferentes infecciones. Continuar la investigación en este campo nos permitirá avanzar en la comprensión de aspectos básicos de la respuesta inmune que permitan desarrollar terapias de modo racional.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

Objetivo general:

Desarrollar nuevas estrategias de tratamiento y profilaxis contra la neumonía neumocócica basadas en la potenciación de las defensas innatas, a través de la administración mucosa de agonistas de Receptores de Reconocimiento de Patrón (PRRs).

Objetivos específicos:

- 1- Establecer un modelo murino de neumonía invasiva empleando cepas clínicas de *S. pneumoniae*, de alta prevalencia en Uruguay y en la región.
- 2- Definir un conjunto de agonistas de PRRs capaces de señalar por receptores implicados en el reconocimiento natural de neumococo (agonistas homólogos) y otro conjunto que active receptores no implicados en la infección natural (agonistas heterólogos) y comparar su capacidad de conferir protección contra la neumonía invasiva mediante la administración intranasal.
- 3- Caracterizar los mecanismos moleculares y celulares vinculados a la protección, empleando como modelo de un agonista heterólogo, la flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.
- 4- Poner a punto un modelo murino de inmunoterapia sublingual que permita investigar la eficacia del tratamiento con flagelina administrada por dicha ruta.
- 5- Estudiar la capacidad de flagelina de actuar como adyuvante de vacunas de aplicación sublingual.

CAPÍTULO III: MATERIALES & MÉTODOS

III.1. *Streptococcus pneumoniae*.

Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* empleadas en este trabajo se obtuvieron de la colección del Centro Nacional de Referencia del Ministerio de Salud Pública de Uruguay en el marco de una colaboración con la Dra. Teresa Camou, Directora del Centro.

Se seleccionaron dos aislados clínicos de serotipo 1 (E1585) y serotipo 3 (E1434), recuperados de de sangre y líquido pleural respectivamente de pacientes con diagnóstico de neumonía. Las principales características de las cepas determinadas en el Centro Nacional de Referencia, se presentan en la *Tabla III.1.i*.

TABLA III.1.i: Aislados Clínicos de <i>S. pneumoniae</i> empleados para la puesta a punto de un modelo de neumonía aguda en ratón. Cepas y datos de la Colección del Laboratorio de Referencia del Ministerio de Salud Pública.				
CEPA	SEROTIPO	FECHA AISLAMIENTO	ORIGEN	DIAGNÓSTICO
E 1585	1	15/10/2001	Sangre	Neumonía
E 1434	3	8/1/2001	Líquido pleural	Neumonía
SUSCEPTIBILIDAD (S) Y RESISTENCIA (R) A ANTIBIÓTICOS DETERMINADA POR DISCO DE DIFUSIÓN				
CEPA	OXACILINA	TRIMETOPRIM-SULFAMETOXASOL	ERITROMICINA	CLORANFENICOL
E 1585	S	S	S	S
E 1434	S	S	S	S
CEPA	TETRACYCLINA	RIFAMPICINA	LEVOFLOXACINA	CLINDAMYCINA
E 1585	S	S	S	S
E 1434	S	S	S	S
CONCETRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)				
CEPA	VANCOMICINA	PENICILINA	CEFTIOFUR	MLST (Multilocus Sequence Typing)
E 1585	S	0.016	0.016	ST 304
E 1434	S	0.03	0.008	ST 180

III.1.1. Preparación del stock madre y de trabajo.

Stock madre.

En todo momento las bacterias fueron manipuladas según técnica aséptica, con mechero o en cabina de flujo laminar acorde para trabajo con patógenos de nivel 2 de bioseguridad. El descarte de todo el material en contacto con las bacterias se realizó con previa descontaminación en solución de hipoclorito de sodio o esterilización en autoclave.

Los stocks de trabajo fueron preparados como ya se describió en [68,69,129], a partir de la adaptación de los protocolos del “Bacterial Respiratory Pathogen Reference Laboratory of the US NIH” Universidad de Alabama – Birmingham, USA, realizada por la Dra. Rial.

Brevemente, las bacterias se recibieron en placas frescas de Agar Tripticasa de Soja (Difco), suplementadas con 5% v/v (en adelante agar-sangre) sembradas el día previo e incubadas a 37 °C en atmósfera con 5% CO₂. Inmediatamente, 7 a 10 colonias aisladas fueron inoculadas en tubos de 15 ml conteniendo 10 ml de caldo Todd-Hewitt (Becton-Dickinson) 37 g/l suplementado con 5 g/l de extracto de levadura (Sigma). Los caldos se incubaron a 37°C en baño de agua con agitación lineal suave a moderada. Cuando se detectó turbidez en los tubos, tras 5 a 7 horas de incubación, se controló la densidad óptica para determinar el punto en que alcanzaron una densidad óptica de 0.2 – 0.4 a 600 nm. En este momento, se tomaron 2 ml de la parte superior de cada tubo y se adicionó igual volumen de caldo fresco y glicerol estéril al 12% v/v. Alícuotas de 1.2 ml se almacenaron en tubos estériles a -80 °C por hasta 18 meses.

Stock de trabajo.

Los stocks de trabajo se prepararon de forma similar, partiendo de placas de agar-sangre sembradas con ansa el día anterior a partir de los stocks madre (sin dejar que se descongelase, se tomó una porción del stock madre congelado con ansa estéril para la siembra y el stock fue nuevamente almacenado a -80 °C). Se procedió del mismo modo que como se describió para el stock madre, pero dejando que los cultivos alcanzaran una densidad óptica de 0.7 – 0.9 a 600 nm. Las alícuotas fueron almacenadas por hasta 3 meses a -80 °C. Antes de emplear las bacterias en cualquier experimento, luego de descongeladas, las alícuotas fueron centrifugadas a 2500 g por 5 minutos para descartar el medio de preservación, el pellet bacteriano se lavó con 1 ml de solución salina estéril y tras centrifugarse otra vez en iguales condiciones, se suspendió en un volumen adecuado de solución estéril. En general, con este método de preparación, cada alícuota de serotipo 1 presentó de 2 a 5x10⁸ UFC (unidades formadoras de colonia), mientras que el serotipo 3 presentó 2 – 8x10⁷ UFC por alícuota de 1.2 ml.

III.2. Agonistas de PRRs & Proteínas.

III.2.1. Flagelinas.

Todas las flagelinas, nativas, recombinantes o mutadas fueron diseñadas, producidas y purificadas en el Laboratorio del Dr. Jean-Claude Sirard del grupo *Lung Infection and Innate Immunity, Center for Infection and Immunity of Lille*, del Institut Pasteur de Lille, Francia.

Flagelinas con capacidad de señalización vía TLR5/NLRC4:

Se emplearon 3 tipos de flagelinas con capacidad de señalizar por los dos receptores.

1. **Flagelina nativa:** se obtuvo por purificación de los flagelos de de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, como se describió previamente en [130,131]. Brevemente, las bacterias se crecieron durante 16 horas en Luria Bertani (LB) a 37 °C, en agitación a 250 rpm. Para aislar los flagelos las bacterias se cosecharon por centrifugación y el pellet fue suspendido en Tris 500 mM, pH 8 y agitado vigorosamente por 1 minuto. Los restos bacterianos fueron removidos por centrifugación a 8000 g por 15 minutos y el sobrenadante fue adicionalmente purificado por filtración a través de mallas de 0.8 µm de tamaños de poro. Los flagelos se recuperaron por ultracentrifugación a 1x10⁵ g por 90 minutos y suspendidos en un volumen pequeño de NaCl 150 mM y los monómeros de flagelina fueron liberados por desnaturalización ácida por agregado de 10 mM HCl y agitación por 30 minutos. Los sobrenadantes fueron centrifugados por ultracentrifugación a 1x10⁵ g por 90 minutos y el pH equilibrado a 8.0 por agregado de Tris 50 mM y 10 mM NaOH.
2. **FliC Δ 174-400:** Esta flagelina mutante carece del dominio hipervariable pero presenta capacidad normal de señalizar vía TLR5/NLRC4. El mutante FliC Δ 174-400 fue producido como se indicó en [131]. Brevemente, a partir del gen *FliC* derivado de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC14028 flagellin *FliC*; #AAL20871) clonado en el plásmido pBR322 bajo el promotor natural de la proteína, se generó el mutante carente de la región hipervariable FliC Δ 174-400 empleando los primers AGCACCattcagcgtatccagacc y GCTGGTgctacaaccaccgaaaac (minúsculas= linker).
3. **FliC-6H-WT:** Esta flagelina se generó también a partir del gen nativo de FliC de *S. enterica* serovar Typhimurium (ATCC14028, flagellin *FliC*, #NP_460912; aa 1-495) y se expresó como fusión a cola de poli-histidina. Se produjo y se purificó como se describió antes con un paso adicional de pasaje por columna Ni-NTA (Pierce).

Mutantes deficientes en señalización vía TLR5:

Se emplearon dos mutantes con diferencias estructurales pero de características funcionales similares.

1. ***FliC Δ 174–400/89–96****: La generación del mutante FliC Δ 174–400/89–96* se realizó a partir de FliC Δ 174–400 con un paso adicional de mutagénesis dirigida sobre los residuos 89-96, para impedir la señalización vía TLR5. Las proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos de *Salmonella* recombinante como se describió anteriormente.
2. ***FliCTLR5mut***: Este mutante se generó a partir de FliC-6H-Wt y sustitución de los aminoácidos 90-97 (QRVRELAV) por el motivo (DTVKVKAT), lo que elimina su capacidad de activar la vía de TLR5. La proteína se expresó como fusión a cola de poli-histidina, producida y purificada como se describió con un paso adicional de pasaje por columna Ni-NTA (Pierce).

Mutante deficiente en señalización vía NLRC4:

1. ***FliCNLRCmut***: Este mutante se generó a partir de FliC-6H-Wt y porta una delección de los aminoácidos de la región C-terminal 493, 494 y 495 (LLR), lo que impide la señalización vía NLRC4. La proteína se expresó como fusión a cola de poli-histidina, producida y purificada como se describió con un paso adicional de pasaje por columna Ni-NTA (Pierce).

En todos los casos el LPS fue removido empleando columnas de polimixina B (Pierce) y los niveles residuales fueron chequeados en todos los lotes mediante el test de *Limulus*, siendo menores a 20 pg/ μ g. Adicionalmente, una fracción de las proteínas fue hidrolizada mediante tratamiento con tripsina y administradas *in vivo* o *in vitro*, de modo de descartar posibles efectos del LPS remanente. El protocolo de tripsinización consistió en la incubación de 2/3 de la solución de proteína en PBS (100 a 300 μ g/ml) con 1/3 de solución de tripsina 0.25 % (Gibco). Tras 1 hora de incubación a 37 °C, la tripsina fue inactivada por incubación a 70 °C por 30 minutos. La hidrólisis de los tripsinizados y la integridad de las proteínas no tratadas, se verificó por SDS-PAGE. Las proteínas se almacenaron en soluciones de concentración 1 a 10 mg/ml en PBS a -20 °C o -80 °C por hasta 6 o 12 meses. Para almacenaje prolongado las mismas fueron liofilizadas en PBS 0.5X y almacenadas a -80 °C.

En todos los casos, las flagelinas nativas y recombinantes fueron calentadas 5 minutos a 65 °C para liberar los monómeros de proteína y siempre se manipularon con guantes para prevenir la degradación y con material apirógeno para evitar contaminación con LPS.

A los efectos de facilitar la interpretación de resultados y dados los efectos equivalentes entre los miembros de cada conjunto de flagelinas, a lo largo del texto se emplea la denominación FliC para hacer referencia a todas las flagelinas capaces de señalizar por TLR5 y NLRC4, la denominación FliC Δ TLR5 para aquellas que no poseen capacidad de señalizar vía TLR5 y la denominación FliC Δ NLRC4 para el mutante deficiente en la señalización por NLRC4.

III.2.2. Lipopéptido Activador de Macrófagos 2 (MALP-2) y S-[2,3-bispalmitoiloxi-(2R)-propil]-R-cisteinil-amido-monometoxil polietilenglicol (BPPcysMPEG).

Los agonistas de TLR2/6 MALP-2 y BPPcysMPEG fueron preparados en el laboratorio del Dr. Carlos Guzmán.

MALP-2 fue obtenido a partir de *Mycoplasma fermentans* como se describió en [132], mediante una etapa de extracción en cloroformo:metanol (2:1) y extracción en detergente octil-glucósido y diálisis, seguida de purificación por cromatografía de alta performance (HPLC) de fase reversa. El compuesto purificado se suspendió en una mezcla de 2-propanol al 33% v/v en agua apirógena a una concentración de 5 mg/ml y se almacenó a -20 °C, siendo estable por años.

BPPcysMPEG fue preparado como se describió en la patente número de publicación WO2004/009125 A2 (26/11/2006), "New adjuvants on the basis of bisacyloxypropylcysteine conjugates and derivatives and their uses in pharmaceutical compositions", Ebsen T., Morr M., Guzman C.. A partir del compuesto liofilizado se preparó una solución 5 mg/ml en agua apirógena y se almacenó a -20 °C.

III.2.3. CpG ODN 1826

El CpG ODN tipo B de secuencia 5'-TsCsCsAsTsgsAsCsgsTsTsCsCsTsgsAsCsGsTsT fue obtenido de la compañía TIB Molbiol, Alemania. Se preparó solución en agua apirógena a 100 mg/ml y se almacenó a -20 °C.

III.2.4. Ácido cíclico 3', 5'-diguanílico (c-di-GMP)

La síntesis de c-diGMP se condujo como se describió en [133] en el laboratorio del Dr. Guzmán. Resumidamente, la síntesis partió de un protocolo estándar de ciclación y purificación del producto por cromatografía de alta performance de fase reversa. Seguidamente la forma sódica de c-di-GMP obtenida se purificó por cromatografía de intercambio iónico. La estructura se confirmó por espectrometría de masa y resonancia magnética nuclear. El compuesto liofilizado se almacenó a -20 °C por hasta 6 meses y se suspendió en agua apirógena a una concentración de 5 mg/ml.

III.2.5. Ácido poliinosínico-policitidínico (poli(I:C))

Poli(I:C) (tlrl-pic) fue obtenido de Invivogen y suspendido en agua apirógena a una concentración de 25 mg/ml y tras homogeneizarse por pipeteo se calentó 10 minutos a 70 °C. Se almacenó a -20 °C.

III.2.6. α -galactosilceramida, variante peguilada (α -GalCer-MPEG)

La variante peguilada de (α -GalCer se generó como se describió en [134]. Para ello metil-PEG-COOH fue disuelto en diclorometano, hidroxibenzotriazol e di-isopropil-carbodiimida y mezclado con una solución de α -GalCer en diclorometano. El compuesto resultante tras incubación, se purificó por cromatografía en sílica y el compuesto final hidrogenado se sometió a purificación final por cromatografía en sílica con fase móvil de cloroformo/metanol.

El compuesto purificado se suspendió en agua apirógena a una concentración de 10 mg/ml.

III.2.7. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS de *E. coli* 0111:B4 fue obtenido de la empresa SIGMA y suspendido en agua estéril o medio de cultivo una concentración final de 1 mg/ml.

III.2.8. Ovoalbúmina (OVA) y toxoide de neumolisina PLYt.

La OVA purificada de clara de huevo de pollo grado V fue obtenida de la empresa SIGMA y suspendida a 50 mg/ml para los ensayos de vacunación. El contenido de LPS fue removido con columna de polimixina B (Pierce). Los experimentos de seguimiento *in vivo* del antígeno se realizaron empleando OVA previamente marcada con Cyto750-NHS ester (Cytodiagnostics) según instrucciones del fabricante.

El toxoide PLYt se obtuvo a partir de una cepa de *E. coli* de la colección del Laboratorio de Investigación en Vacunas. Esta cepa (W3110-056) fue transformada con el plásmido pPACIB9 portando el gen de la neumolisina truncada bajo promotor triptófano inducible por ácido β -indoleacrílico [135]. PLYt posee de actividad hemolítica reducida respecto de la nativa ya que carece del extremo C-terminal, región responsable de la polimerización en membranas eucariotas. Resumidamente, colonias aisladas de la cepa de W3110-056 crecidas por 16 horas en agar LB suplementado con ampicilina 100 μ g/ml, fueron empleadas para inocular caldos de LB-100 μ g/ml ampicilina que se incubaron durante 16 horas a 37 °C y agitación a 200 rpm. El cultivo fue diluido 1/100 en medio fresco y se incubó en idénticas condiciones por 3 horas, tiempo en el que se realizó la inducción del mismo con 25 μ g/ml de ácido β -indoleacrílico (Sigma). Tras 8 horas las células se cosecharon por centrifugación (15 minutos, 3500 g) y se procedió al aislamiento de los cuerpos de inclusión según [136], obteniéndose la proteína tras sonicado y pasos sucesivos de lavado en 10 mM Tris-HCl y 1mM EDTA, pH 7.2. Como paso final se realizó la solubilización de la fracción insoluble conteniendo PLYt en urea 8 M y finalmente se realizó la renaturalización por diálisis en PBS, pH 7.4.

III.3. Animales

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a la normativa vigente y habilitados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de Uruguay (protocolos N°: 08-05-10, 071140-000821-12, 071140-002275-12, y por el Institut Pasteur de Lille (N° A59107). En todos los experimentos se emplearon ratones hembras de entre 8 y 12 semanas de edad de las cepas BALB/c, C57/BL6, NMRI, SCID (C.B-17 SCID) y C57BL/6-Tg (TcraTcrb)425Cbn/J (en adelante OT-II) obtenidos de la División Nacional de Laboratorios Veterinarios, Janvier Labs, Institut Pasteur de Lille, Institut Pasteur de Montevideo o Helmholtz Center for Infection Research. Los animales se mantuvieron en aisladores, con régimen de comida y agua *ad libitum*.

III.3.1. Infección intranasal con aislados clínicos de *S. pneumoniae*.

El modelo de neumonía aguda invasiva en ratones se estableció empleando los protocolos descritos en [68,69,129]. Los animales se anestesiaron con 111 mg Ketamina y 5.6 mg Xilacina por kg de peso por inyección intraperitoneal (i.p.) y se dejaron descansar 10 minutos antes de la instilación del inóculo bacteriano preparado como se describió en la *Sección III.1.1*. Los protocolos de infección llevados a cabo en el Institut Pasteur de Lille se realizaron bajo anestesia inhalatoria (isoflurano 2% y 1.5% para ratones BALB/c y C57/BL6 respectivamente empleando sistema DRE-Biomedical). Tras la anestesia los animales recibieron el inóculo bacteriano en un volumen final de 50 µl en solución salina y se mantuvieron en posición vertical durante 1 minuto para asegurar que el inóculo alcanzara los pulmones.

Tras la infección los animales se controlaron diariamente. Los animales se manipularon siempre en instalaciones de nivel de seguridad 2, dentro de cámara de bioseguridad, manteniéndose en aisladores equipados con filtros HEPA.

La dosis infectiva del inóculo bacteriano se determinó tras realizar cada infección mediante siembra de diluciones seriadas en agar-sangre y recuento de UFC tras incubación por 16 a 18 horas en estufa a 37 °C y 5% CO₂.

III.3.2. Determinación de la carga bacteriana en órganos y tejidos.

La determinación de las UFC en órganos y tejidos se realizó a diferentes tiempos post-desafío según se indica más adelante en el texto y figuras. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical (o inyección letal con pentobarbital sódico en el caso de los protocolos realizados en el Institut Pasteur de Lille). Inmediatamente los pulmones y bazo fueron recuperados y colocados en 1 ml de solución salina estéril, manteniéndose en hielo hasta el momento de la homogeneización. La disrupción se realizó en cámara de flujo empleando un homogeneizador rotor/estator (IKA-Werke) a velocidad intermedia (10 a 12000 rpm durante 15 segundos). La carga bacteriana se determinó en

diluciones seriadas de los homogeneizados sembradas en placas de agar sangre, incubadas por 16 a 18 horas en estufa a 37 °C y 5% CO₂.

La presencia de bacterias en sangre se determinó por siembra de diluciones seriadas de sangre extraída del seno retro-orbital o por punción de la vena lateral de la cola, anticoagulada mediante adición de citrato de sodio 3.8% (1:10 en relación al volumen de muestra).

En todos los casos el número de UFC se determinó sembrando un volumen total de la muestra pura y de cada dilución 60 µl en 3 gotas de 20 µl cada una. No se realizaron pasos de enriquecimiento en ninguna oportunidad.

III.3.3. Administración sublingual de compuestos.

La entrega sublingual de compuestos se realizó bajo anestesia con Ketamina/Xilacina (111/5.6 mg respectivamente por kg de peso). Tras 10 minutos la boca del animal se mantuvo abierta empleando una micro pinza de cirugía, sosteniendo la cara dorsal de la lengua contra el paladar. Los compuestos fueron administrados en un volumen máximo de 10 µl, colocándose la mitad en el piso de boca y el resto en la cara ventral de la lengua (por detalles de la manipulación diríjase al *Capítulo IV.4*).

Los protocolos de tratamiento durante la neumonía neumocócica por administración sublingual de flagelina presentados en el *Capítulo IV.4*, se realizaron mediante una única aplicación de la proteína 12 o 2 horas antes de la infección.

Los protocolos de inmunización sublingual descritos en el *Capítulo IV.5* se realizaron bajo los regímenes de vacunación más 2 recuerdos. Las dosis y tiempos entre vacunación y cada recuerdo se indican en el capítulo mencionado.

III.3.4. Depleción de células Gr1⁺.

El objetivo de estos experimentos fue eliminar los neutrófilos circulantes mediante el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la molécula de superficie conocida como Receptor de Granulocitos 1 o Gr1 (del inglés: *anti-granulocyte receptor 1* o Ly6C-Ly6G), expresada principal pero no exclusivamente en estas células. Se emplea el término “depleción” para hacer referencia a este procedimiento. Si bien el mismo no existe en el Idioma Español, se emplea como un anglicismo comúnmente aceptado entre la comunidad de inmunólogos.

La depleción se realizó 24 horas antes del desafío bacteriano para asegurar la acción del tratamiento que consistió en una inyección i.p. de 100 µg de anticuerpo monoclonal clon RB6-8C5 en PBS, purificado a partir de sobrenadantes de cultivo del hibridoma en el Institut Pasteur de Lille. Como control se empleó la misma dosis del un anticuerpo del mismo isotipo (IgG2b de rata), clon HB152. La eficacia del tratamiento se comprobó en todos los casos mediante citometría de flujo empleando

los marcadores Gr1 y CD11b o Ly6C, Ly6G, confirmándose la depleción del 99% de los neutrófilos en sangre y lavados broncoalveolares.

III.3.5. Transferencia adoptiva de linfocitos purificados de ratones OT-II.

Estos ensayos se realizaron con el fin de evaluar el efecto adyuvante de flagelina administrada por ruta mucosa en conjunto con OVA en términos de su capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T vírgenes.

Los ratones OT-II presentan linfocitos CD4^{pos} portadores del receptor T transgénico capaz de reconocer específicamente el péptido 323-339 de OVA cuando es presentado en contexto del MHC-II (siglas en inglés para Complejo Mayor de Histocompatibilidad II). Los linfocitos totales fueron purificados a partir de homogeneizados mecánicos de bazo y ganglios de ratones OT-II vírgenes. Las células totales se filtraron por mallas de 70 y 40 μm y los linfocitos totales se recuperaron por gradiente de densidad Lympholyte (Cedarlane) realizado según instrucciones del fabricante. Los linfocitos OT-II se marcaron con CFDA-SE como se describió en [137]. La membrana celular es permeable al CFDA-SE el cual es cortado por las esterasas intracelulares a CFSE, que en el citoplasma celular reacciona con las proteínas y otros compuestos con grupos amina, formando conjugados fluorescentes que emiten señal en el canal verde y que permanecen en el citosol. Las células marcadas se transfirieron por ruta intravenosa a ratones singénicos vírgenes. A las 24 horas los ratones transferidos fueron vacunados por ruta sublingual o intranasal con OVA sola o con FliC y se dejaron transcurrir 4 días hasta la recuperación de los órganos (ganglios, bazo y pulmones). Si se produce el procesamiento y presentación eficiente de la OVA a las células T-CD4-OT-II, las mismas proliferan en respuesta al estímulo, fenómeno que se puede evidenciar por citometría de flujo como pérdida de la fluorescencia en el canal verde, por división del contenido citoplasmático entre la célula original y la nueva generación.

III.4. Células.

III.4.1. Cultivo de la línea celular A549.

La línea epitelial de pulmón A549 (ATCC CCL-185) fue seleccionada en base a que presenta varias de las características de los neumocitos II del pulmón [138] y así montar un modelo para el estudio de la activación del epitelio pulmonar por parte de los inmunoestimulantes, en particular flagelina. Las células fueron cultivadas en DMEM/FK12 (PAA), 10% v/v suero fetal bovino (FBS) (PAA) o RPMI (PAA), FBS 5% v/v. las células se mantuvieron a confluencia del 80-90% y se realizaron pasajes 1/5 cada 48-72 horas, refrescándose el medio 3 veces a la semana.

Para los ensayos, las células confluentes se despegaron del plástico mediante incubación con Tripsina-EDTA por 4 minutos a 37 °C, el efecto de la tripsina se neutralizó por dilución en medio fresco y pipeteo repetido. El número de células se determinó por recuento en cámara de Neubauer o Contador automático Countess (Invitrogen) en presencia de azul de Trypan (Invitrogen) y 2×10^5 células se colocaron en placas de 48 pocillos. Las células se dejaron adherir por 2 horas y se estimularon según se indica en las figuras presentadas en el *Capítulo IV.3*. Al cabo del tiempo de estimulación, el medio fue removido, se realizó un lavado con PBS estéril libre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y se lisaron directamente en Trizol (Invitrogen) según instrucciones del fabricante para posterior extracción del ARN total según se indica más adelante.

III.4.1. Purificación de neutrófilos humanos y ensayos de activación de estallido respiratorio.

Estos ensayos se condujeron con el fin de determinar si la flagelina era capaz de activar directamente neutrófilos, midiéndose la magnitud del estallido respiratorio como marcador de activación.

Se emplearon neutrófilos humanos aislados de sangre periférica de donantes voluntarios sanos. Se partió de 20 ml de sangre recolectada en tubos Vacutainer (BD) que fue procesada inmediatamente después de ser colectada. Los neutrófilos se purificaron mediante gradiente de densidad Histopaque 1077 y 1119 (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de la población aislada se confirmó por citometría de flujo empleando como referencia los parámetros de granularidad (SSC) y tinción positiva con CD45 o CD14. Los ensayos de estimulación con PMN se realizaron en RPMI+10% SBF (PAA) en ausencia de antibióticos. Previo a la estimulación, las células se incubaron con Dihidro-rodamina 123 (Sigma) durante 15 minutos según instrucciones del fabricante y se lavaron. Luego se incubaron con el estímulo (neumococo y/o flagelina o forbol-miristato-acetato) durante 45 minutos a 37°C, 5% CO_2 y agitación. Inmediatamente después se incubaron en hielo y la fluorescencia en verde fue analizada por citometría de flujo en FACS-Canto II y fue tomada como mitad del estallido respiratorio y activación de las células.

III.4.2. Aislamiento de células dendríticas de médula ósea.

Las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) fueron preparadas por el Lic. Martín Rossotti, según el siguiente protocolo:

Las células se aislaron de la tibia y fémur de ratones C57/BL6 de 6-8 semanas mediante inyección de PBS apirógeno. Tras filtración en malla de nylon, se realizó la lisis de eritrocitos y se determinó el número de células viables. Un total de 3×10^6 células se colocaron en placas de Petri (Greiner) con 10 ml de medio "DC" (RPMI, 10% suero fetal decomplementado, 2mM L-glutamina, 500 nM β -Mercaptoetanol, 100 U/ml penicilina/estreptomicina, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicina) con 20 ng/ml de GM-CSF recombinante, preparado en el Laboratorio de Inmunología-DEPBIO, Facultad de Química. Luego de

3 días se agregaron 10 ml de medio DC+GM-CSF fresco y al día 6 se cambió la mitad del medio por medio DC+GM-CSF fresco. Al día 7, $2-3 \times 10^6$ células fueron transferidas a placas de 96 pocillos (fondo en U) y fueron estimuladas por diferentes tiempos con distintas dosis de flagelina según se indica en las figuras o LPS de *E. coli* (SIGMA) 200 ng/ml. Al cabo del tiempo de incubación, las células se lavaron y se procedió al marcado como se indica en la *Sección III.6*.

Para evaluar capacidad de procesamiento antigénico, las células fueron estimuladas con FliC o LPS en presencia de 2 μ g de OVA-DQ (Invitrogen) por el tiempo indicado. Tras incubarse en hielo por 5 minutos para detener la fagocitosis se realizó el marcado con anticuerpos y análisis por citometría.

III.5. RT-qPCR:

La determinación de los niveles de mensajeros se realizó a partir de homogeneizados de pulmón o células en cultivo en Trizol (Invitrogen), seguido de extracción de ARN total y retrotranscripción (RT-PCR) empleando random hexamer primers y la retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen).

Los pulmones fueron homogeneizados en 1 ml de trizol empleando un homogeneizador rotor/estator y conservados a -80 °C hasta su procesamiento. La extracción de ARN a partir del homogeneizado en Trizol se realizó según protocolo descrito por el fabricante, con un paso de extracción con cloroformo, precipitación en alcohol isopropílico y lavado con etanol 75% v/v y posterior resolubilización en agua ultra pura incubándose a 60 °C durante 10 minutos. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó en Nanodrop (Thermo) a 260 nm y se registró el cociente de absorbancias a 260/280.

Para la RT-PCR se partió de 1 μ g de RNA total y se procedió al tratamiento con DNase-I (0.35 U) (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. La RT-PCR se realizó empleando 200 U de la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) en buffer provisto por el fabricante y en presencia de 200 ng de *random primers* (Invitrogen), dinucleótidos trifosfato 1mM de cada tipo, 400 U de RNase Out (Invitrogen) y DTT 20 mM en un volumen final de reacción de 20 μ l. La reacción se realizó siguiendo el siguiente programa: 10 min, 25 °C; 50 min, 37 °C; 15 min, 70 °C. El ADN copia fue diluido 1:5 antes de realizar la PCR en tiempo real (qPCR).

La qPCR se realizó empleando kit QuantiTect (Qiagen) según instrucciones del fabricante empleando los termocicladores en tiempo real 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem) o Rotor Gene-6000 (Corbett Life Sciences).

La reacción de qPCR se realizó empleando 2 μ l del ADN copia diluido según el siguiente protocolo: 15 min, 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 seg, 95 °C; 1 min, 60 °C (paso de adquisición de fluorescencia en el canal verde). Seguidamente se realizó curva de disociación de los productos según el siguiente protocolo: $60-95$ °C con aumentos de 1 °C cada 5 seg, con registro de fluorescencia en cada paso. Este protocolo se empleó para todos los genes excepto para los marcados con asteriscos en los que cambió el protocolo de amplificación y se mantuvo el de la curva de disociación.

Para el caso de 18s se empleó el protocolo siguiente: 15 min, 95°C y 40 ciclos de 15 seg, 94°C 30 seg, 60°C (con adquisición de fluorescencia); 30 seg, 72°C.

Para *Tnfaip3* el protocolo fue: 15 min, 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 seg, 94°C, 30 seg, 54°C (con adquisición de fluorescencia) y 30 seg a 72°C.

En todos los casos se emplearon los primers a concentración final de 0.9 µM.

El análisis de datos se realizó en los programas provistos por cada fabricante. Los datos se procesaron según el método descrito en [139]. Los genes de referencia endógenos se indican en las leyendas de las figuras para cada ensayo. Los resultados se expresan como incremento relativo respecto del grupo control indicado también para cada caso.

Tabla I.1.ii: Secuencia de primers murinos empleados en qPCR		
Nombre	Secuencia 5'-3'	Producto PCR (pb)
mB-actin_F	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	68
mB-actin_R	CGTCATCCATGGCGAACTG	
mCCL20_F	TTTTGGGATGGAATTGGACAC	69
mCCL20_R	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC	
mCXCL1_F	CTTGGTTCAGAAAATTGTCCAAAA	84
mCXCL1_R	ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT	
mIL-10_F	CATTTGAATTCCTGGGTGAGA	101
mIL-10_R	TGCTCCACTGCCTTGCTCTT	
mIL-23_F	GCCCCGTATCCAGTGTGAAG	78
mIL-23_R	CGGATCCTTTGCAAGCAGAA	
mIL-6_F	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	78
mIL-6_R	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	
mTGfbeta_F	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT	76
mTGfbeta_R	GAGTTTGTTATCTTTGCTGTCACAAGA	
mTNFalfa_F	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	63
mTNFalfa_R	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT	
mIL-17A_F	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC	69
mIL-17A_R	GGGTCTTCATTGCGGTGG	
mIL-17F_F	CCCATGGGATTACAACATCACTC	66
mIL-17F_R	CACTGGGCCTCAGCGATC	
mIFNg_F	TCAGCAACAGCAAGGCGAAA	143
mIFNg_R	CCGTTCTCTGAGGCTGGAT	
mFoxp3_F	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT	89
mFoxp3_R	TTCTCACAACCAGGCCACTTG	
mIL-4_F	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	95
mIL-4_R	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	
mLy6G_F	TGCTCTTGACTTTGCTTCTGTGA	79
mLy6G_R	TGCCCCTTCTCTGATGGATT	
mCxcl2_F	CCCTCAACGGAAGAACAAA	72
mCxcl2_R	CACATCAGGTACGATCCAGGC	
mIL22_F	TTTCCTGACCAAACCTCAGCA	68
mIL22_R	TCTGGATGTTCTGGTCGTCA	
mp35_II12_F	ATCACACGGGACCAAACCA	72
mp35_II12_R	CAGGCAACTCTCGTTCTTGTGTAGT	
mp40_II12_F	GCAAAGAAACATGGACTTGAAGTTC	74
mp40_II12_R	CACATGTCACTGCCCGAGAGT	
mIl1beta_F	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	152
mIl1beta_R	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	
mIL18_F	CAGGCCTGACATCTTCTGCAA	105
mIL18_R	TCTGACATGGCAGCCATTGT	
mS100a9-F	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT	95
mS100a9-R	TGTCATTTATGAGGGCTTCATTT	
mHamp-F	GATGGCACTCAGCACTCG	112
mHamp-R	CTGCAGCTCTGTAGTCTGTCTCA	
mLcn2-F	CCATCTATGAGCTACAAGAGAACAAT	89
mLcn2-R	TCTGATCCAGTAGCGACAGC	

Tabla I.1.iii: Secuencia de primers Humanos empleados en qPCR		
Nombre	Secuencia 5'-3'	Producto PCR (pb)
Ccl20-F	CAGTGCTGCTACTCCACCTC	53 variante 2 56 variante 1
Ccl20-R	GCAGTCAAAGTTGCTTGCTTCT	
Cxcl1-F	CGCCCAAACCGAAGTCATAG	114
Cxcl1-R	TTGGATTGTCACTGTTTCAGCAT	
Cxcl8-F	GCGCCAACACAGAAATTATTGTAA	108
Cxcl8-R	GCCCTCTTCAAAAATTCTCCAC	
DEFA1-F	CGGACATCCCAGAAGTGGTTG	77
DEFA1-R	GTTTTTCCTTGAGCCTGGATGCTTT	
DEFB1-R	GGAAGCCTCTGTCAGCTCAG	150
DEFB1-F	GTTACCACCTGAGGCCATCTC	
Foxp3-F	GCTGCAGCTCTCAACGGT	123
Foxp3-R	TTGAGGGAGAAGACCCCAAGT	
Ifng-F	TGCAGGTCATTTCAGATGTAGCG	82
Ifng-R	TTTTCTGTCACTCTCCTTTTCCAA	
Il10-F	GAGGCTACGGCGCTGTCAT	101
Il10-R	AGATGCCTTTCTCTTGGAGCTTATT	
Il12p35-F	ATAAAAATGTGGCCCCCTGG	138
Il12p35-R	CACAAGGAGGAGGCTGCG	
Il17a-F	AAACTCATCCATCCCCAGTTGA	76
Il17a-R	CAGTAGCAGTGACACCAATGAGG	
Il17f-F	TCACGTAACATCGAGAGCCG	52
Il17f-R	AAGTGACAGTGAATTCAGGGG	
Il18 -F	TGGAATCAGATTACTTTGGCAAGC	145
Il18-R	GTCCGGGGTGCATTATCTCT	
Il21-F	ACACAGACTAACATGCCCTTCAT	92
Il21-R	TCATCTTTTGGAGAAGTGATTTGAA	
Il22-F	CTCCTTCTTTGGCCCTCTTG	141
Il22-R	ATCAGCCAAGCTAGCCTCCTT	
Il23p19-F	ACTAGTGGGACACATGGATCT	139
Il23p19-R	CTGGTGGATCCTTTGCAAGC	
Il6-F	GGTACATCCTCGACGGCATC	50
Il6-R	CTTGTTACATGTCTCCTTTCTCAGG	
Nos2-F	GAGGGGACTGGGCAGTTCTA	117
Nos2-R	TCTTCACTGTGGGGCTTGCAG	
Tnfa-F	ATCTTCTCGAACCCCGAGTG	59
Tnfa-R	CAGCTTGAGGGTTTGCTACAAC	
ActB-F	CTACGAGCTGCCTGACGG	98
ActB-R	AGGACTCCATGCCAGGAA	
Tnfaip3-F**	CTGCCAGGAATGCTACAGATAC	100
Tnfaip3-R**	GTGGAACAGCTCGGATTTTCAG	
18s-F*	ACATCCAAGGAAGGCAGCAG	65
18s-R*	TTTTCGTCACTACCTCCCCG	

III.6. Citometría de flujo.

Pulmones y Lavado Broncoalveolar (BAL)

Para los análisis de citometría de flujo en pulmones los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Previo a recuperar los pulmones se realizó la perfusión de los mismos mediante inyección de PBS-1 mM EDTA en el ventrículo derecho del corazón. Seguidamente se realizó el lavado broncolaveolar por inoculación repetida de 1 ml de PBS- 1 mM EDTA a través de la tráquea. Los lavados se centrifugaron a 300 g, 4 min y se procedió al marcado como se describe más abajo.

Una vez extraídos los pulmones, se realizó la digestión con colagenasa/DNAseI según [140]. Las suspensiones celulares obtenidas fueron filtradas por malla de 100 y 70 μm , centrifugadas y suspendidas en 1 ml de PBS- 1mM EDTA-1% BSA. El recuento de células viables se realizó en contador automático Countess (Invitrogen) empleando Trypan Blue.

El marcado con anticuerpos monoclonales específicos y controles isotópicos (BD Pharmingen, e-Biosciences o Cedarlane) se realizó durante 30 minutos en hielo. En algunas ocasiones las células se fijaron con paraformaldehído 2% por 15 minutos a temperatura ambiente y tras ser lavadas se almacenaron a 4°C hasta el momento la adquisición.

Las células se analizaron en citómetro FACS Canto II o FACS Calibur (Becton-Dickinson). El análisis de datos se realizó en Cell Quest 3.3 (BD), FACS Diva (BD) o FlowJo V10 (Treestar). La estrategia de análisis y jerarquía de poblaciones se indica en cada caso.

Evaluación del estallido respiratorio en neutrófilos.

El estallido respiratorio en neutrófilos humanos se evaluó mediante el uso de Dihidro-rodamina 123 (DHR) (Sigma) según lo descrito en [141] y siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, se preparó una dilución 1/10 en PBS a partir del stock madre 10 mM DHR en dimetilsulfóxido, para generar el stock de trabajo. Luego $1-2 \times 10^6$ células fueron marcadas con 1 μl del stock de trabajo en 10 ml de PBS + 0.5% de suero fetal en oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente, en agitación continua. Se lavaron 1 vez en 10 ml de PBS y se estimularon con flagelina, LPS, neumococo o las combinaciones indicadas en las leyendas de las figuras y forbol miristato acetato (PMA) en el control positivo. Transcurrido el tiempo de incubación se analizó la fluorescencia emitida en el canal de FITC en FACS Canto II (BD).

Análisis de BMDC.

Las células preparadas como se describió antes fueron lavadas tras la estimulación y suspendidas en FACS-EDTA. El bloqueo de los receptores Fc se realizó empleando FC-block (BD) según instrucciones del fabricante. Seguidamente, se tiñeron con anticuerpos monoclonales según se indica en las figuras, durante 30 minutos en hielo. Por último se lavaron y analizaron en citómetro FACS-Canto II (BD) sin fijación previa.

III.7.Histología.

Los tejidos fueron fijados en PFA 4% y embebidos en parafina. Secciones de 5 μm fueron teñidas con hematoxilina-eosina y analizadas en microscopio óptico. Tres ratones por grupo fueron analizados, en un total de 6 secciones en doble ciego y procesadas posteriormente en el software NIS-Elements BR (version 3.0) (Laboratory Imaging).

III.8. ELISA.

Determinación de anticuerpos específicos contra OVA.

Se sensibilizaron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos con 20 µg/ml de solución de OVA en amortiguador fosfato 0.2M pH 6.5, 300 µl/pocillo y se incubaron 16-18 h a 4°C en cámara húmeda. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween-20 0.05% y se bloquearon 1 h a temperatura ambiente con PBS-leche descremada 1% (PBS-M), 300 µl/pocillo y se almacenaron a -20 °C hasta el momento de usarlas. Tras descongelarse, se lavaron 3 veces en PBS-Tw20 0.05% y se procedió a sembrar 100 µl/pocillo de las diluciones de sueros preparadas en PBS-M. Las muestras se incubaron por 2 h 30 a 37 °C o 16-18 h a 4 °C. Se lavó nuevamente 3 veces en PBS-Tw20 0.05%, y se incubó con la dilución apropiada del anticuerpo secundario biotinilado (anti-IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA o IgM específicos para ratón de Southern Biotechnologies). Tras lavar nuevamente se colocaron 100 µl/pocillo de Extravidina-PO (Sigma) y se incubó por 45 min a 37 °C. Tras 5 lavados, se agregaron 100 µl de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) y la reacción se detuvo por agregado de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2N. Se registró la absorbancia a 450 nm y con referencia a 620 nm en lector MRX II (Dynex Technologies).

En todos los casos, se empleó un suero positivo como estándar, el cual fue preparado por inmunización repetida de ratones con OVA y toxina colérica por ruta i.n.. Se construyó una curva de calibración en cada caso y el título de anticuerpos de las muestras problema se determinó según la ecuación de la curva. En todos los casos las diluciones se sembraron por duplicado y se sembraron al menos 3 diluciones de cada muestra.

Determinación de anticuerpos específicos contra PLYt.

Se sensibilizaron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos con 10 µg/ml de solución de PLYt en buffer carbonato 50mM pH 9.6, 50 µl/pocillo y se incubaron 16-18 h a 4°C en cámara húmeda. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween-20 0.05% y se bloquearon 1 h a 37 °C con PBS-BSA 1% (PBS-BSA), 100 µl/pocillo y se almacenaron a -20 °C hasta el momento de usarlas. Luego de descongelarse, se lavaron 3 veces en PBS-Tw20 0.05% y se sembraron 50 µl/pocillo de las diluciones de sueros preparadas en PBS-BSA 0.01% Las muestras se incubaron por 16-18 h a 4 °C. Se lavó nuevamente 3 veces en PBS-Tw20 0.05%, y se colocó la dilución apropiada del anticuerpo secundario biotinilado (anti-IgG específico para ratón de Southern Biotechnologies). Tras lavar nuevamente se colocaron 50 µl/pocillo de Extravidina-PO (Sigma) y se incubó por 45 min a 37 °C. Tras 5 lavados, se agregaron 100 µl de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) y la reacción se detuvo por agregado de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2N. Se registró la absorbancia a 450 nm y con referencia a 620 nm en lector MRX II (Dynex Technologies).

Nuevamente, se empleó un suero positivo como estándar, esta vez preparado por inmunización repetida de ratones con PLYt y toxina colérica por ruta s.c.. Se construyó una curva de calibración en

cada caso y el título de anticuerpos de las muestras problema se determinó según la ecuación de la curva. En todos los casos las diluciones se sembraron por duplicado y se sembraron al menos 3 diluciones de cada muestra.

III.9. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se analizaron por el test de log rank (Mantel-Cox).

Para comparación entre grupos se empleó test de Mann-Whitney de una vía a menos que se especifique lo contrario. Los análisis se realizaron para $p < 0.05$ y $p < 0.01$ y se indican con uno y dos asteriscos respectivamente.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

IV.1. Puesta a punto de un modelo murino de neumonía neumocócica

El ser humano es el hospedero natural del neumococo. Sin embargo, diferentes especies son susceptibles a la infección y/o colonización cuando son expuestas a este coco gram positivo en el laboratorio. Hace ya varias décadas se cuenta con diferentes modelos animales para el estudio de las distintas manifestaciones de la enfermedad neumocócica, que resultan útiles tanto para el estudio de la fisiopatología de la infección, como para el desarrollo de nuevas alternativas de profilaxis y tratamiento.

El modelo murino es el más empleado en la actualidad para el estudio de la enfermedad neumocócica. En comparación con otros modelos animales como conejo, rata o cobayos, el ratón presenta varias ventajas. Se destacan el bajo costo de los animales y de su manutención, disponibilidad de diferentes cepas endogámicas reportadas como susceptibles a la infección neumocócica, posibilidad de alojar un importante número de animales en un área reducida, mayor facilidad para adecuar las instalaciones a nivel de bioseguridad II, gran variedad de herramientas comercialmente disponibles para el estudio de diferentes parámetros de la respuesta inmune y extensa literatura disponible sobre la fisiopatología de la infección neumocócica en este hospedero. Los modelos murinos de neumonía neumocócica permiten, en tiempos razonablemente cortos, evaluar diferentes parámetros durante la infección como ser evolución de la carga bacteriana en pulmones, sangre y nasofaringe, respuesta celular y humoral contra la infección, sobrevivencia de los animales, entre otros, y han sido muy útiles en el desarrollo de terapias antimicrobianas y en la evaluación de nuevas vacunas antineumocócicas (revisado en [142]).

Existen dos rutas principales de infección empleadas para inducir neumonía en ratones: la ruta intratraqueal (i.t.) y la ruta intranasal (i.n.). La administración i.t. posibilita la entrega de hasta el 99% del inóculo bacteriano en los pulmones. Sin embargo, implica una intervención quirúrgica compleja en cada uno de los animales [142].

La administración i.n. puede realizarse por instilación de la suspensión bacteriana en las narinas del animal anestesiado o mediante el empleo de sistemas de nebulización, que generan un aerosol a partir del inóculo bacteriano que es aspirado por los animales mantenidos en una cámara de exposición cerrada. Ambos métodos de inoculación reproducen en gran medida la ruta natural de infección en humanos. Si bien el sistema de aerosol es conveniente para la infección simultánea de varios animales y no necesita anestesia, requiere de un equipo especial, no permite controlar con

precisión la carga bacteriana que alcanzan los pulmones de cada animal, puede facilitar la diseminación del patógeno al ambiente y muchas veces causa infecciones no deseadas, por ejemplo en los ojos, debido a que el animal entero se expone al aerosol de alta carga bacteriana [142,143]. Por el contrario, la instilación intranasal permite la entrega de un número más preciso de bacterias hacia las vías respiratorias, sin que sea necesaria la exposición de todo el cuerpo del animal a una alta carga bacteriana.

Uno de los aspectos claves en la puesta a punto del modelo de infección por instilación intranasal es el tipo y dosis de anestesia. Existen reportes que demuestran que el tipo de anestésico influye tanto en la patogénesis de la neumonía neumocócica como en la respuesta inmune frente a la infección en ratones [144]. Asimismo, la profundidad de la sedación es el factor clave para la entrega de una dosis precisa de bacterias en las vías respiratorias bajas.

El objetivo de esta primera etapa del trabajo consistió en generar condiciones estables para el cultivo y mantenimiento de aislados clínicos de *S. pneumoniae*, establecer la susceptibilidad de dos cepas endogámicas de ratones frente a la infección intranasal con dos serotipos de neumococo y caracterizar la evolución de la infección centrandó la atención en los aspectos básicos de la respuesta inmune en los pulmones durante la neumonía neumocócica invasiva. Por la facilidad de implementación y la mayor seguridad, se optó por el modelo de instilación intranasal. Cabe mencionar que esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Marqués y la Dra. Rial; información complementaria del modelo de infección puede encontrarse en la tesis doctoral de la Dra. Rial [69].

IV.1.1. Optimización de las condiciones de cultivo, mantenimiento de cepas de *S. pneumoniae* e infección experimental en ratones por ruta intranasal.

Cultivo y mantenimiento de S. pneumoniae para los protocolos de infección in vivo.

El punto de partida de este trabajo fue la puesta a punto de los cultivos de dos cepas de *S. pneumoniae* en un medio comercial, Todd Hewitt, enriquecido con extracto de levadura. Las cepas se seleccionaron según su relevancia clínica en nuestro país y la región [8,145]. Se eligieron dos aislados clínicos bien caracterizados de la colección del Laboratorio de Referencia del Ministerio de Salud Pública, procedentes de líquido pleural y sangre de pacientes con cuadros de neumonía neumocócica (*Tabla III.1.i, Materiales y Métodos*).

Los cultivos se realizaron como se describió en la sección *Materiales & Métodos* a partir de la adaptación de protocolos del “Bacterial Respiratory Pathogen Reference Laboratory of the US NIH” Universidad de Alabama – Birmingham, USA.

Durante la elaboración del stock madre y de trabajo, se apreciaron cambios que, sin afectar la viabilidad bacteriana, provocaron una disminución de la virulencia, lo que se tradujo en una menor susceptibilidad de los ratones a la infección. Si bien el fenómeno no se estudió de modo exhaustivo, la menor virulencia de las cepas se asoció a la menor expresión de cápsula en las colonias cultivadas en agar-sangre (inspeccionadas por observación macroscópica de las colonias), así como en un crecimiento más lento en caldo. A través de los sucesivos ensayos, se comprobó que la pérdida de virulencia estaba relacionada con el tiempo de almacenamiento de los stocks a -80°C ,

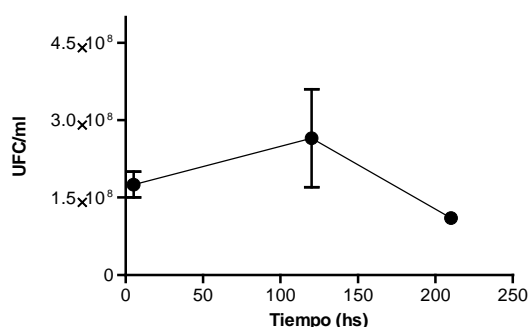


Figura IV.1.1: Variación de la viabilidad de suspensiones de *S. pneumoniae* serotipo 1 a 0°C en función del tiempo. Suspensiones bacterianas mantenidas a -80°C fueron descongeladas, lavadas, centrifugadas a 2500 g y resuspendidas en 1 ml de solución salina isotónica estéril. Las suspensiones bacterianas se mantuvieron en hielo y se tomaron alícuotas a los intervalos señalados para determinar unidades formadoras de colonias mediante plaqueo de diluciones seriadas en placas de agar sangre. Se muestra la media de los duplicados \pm SEM.

virulencia se estableció un tiempo máximo de almacenamiento a -80°C de 18 meses para los stocks madre y 3 meses para los stocks de trabajo. En vista de lo observado, se instauró la práctica de renovar los stocks de manera periódica.

Dado que los ensayos *in vivo* requieren a menudo de tiempos prolongados para realizar la infección de un cierto número de animales, se estudió la estabilidad de los stocks de trabajo en función del tiempo,

mantenidos en hielo. Se tomaron alícuotas de las suspensiones bacterianas y se realizó el recuento de UFC en placas de agar-sangre.

No se encontró una variación significativa en la viabilidad bacteriana de los stocks mantenidos en hielo por hasta 3.5 h (*Figura IV.1.1*), hecho que descarta variaciones en las dosis infectivas debidas al orden de inoculación de los animales durante el protocolo de infección.

Puesta a punto de la infección intranasal en ratones.

El primer paso en la puesta a punto de la infección experimental consistió en ajustar la dosis del anestésico elegido (una mezcla de Ketamina-Xilacina) para lograr la entrega en los pulmones de al menos el 80% del inóculo bacteriano contenido en un volumen de 50 μ l, instilado por ruta i.n.. La dosis estándar de Ketamina-Xilacina (200 mg/kg-10 mg/kg respectivamente) causa depresión respiratoria y bradicardia, pudiendo provocar hipoxia y detención de las contracciones cardíacas en pequeños animales [146]. Estos efectos adversos pueden verse agravados por la inoculación de la suspensión bacteriana en los pulmones de los animales sedados. Por este motivo se trabajó en ajustar la dosis del anestésico para lograr un grado de sedación moderado, minimizando los efectos adversos. Ratones BALB/c o C57BL/6 fueron sedados con una dosis 111 mg Ketamina y 5.6 mg Xilacina por kg de peso. Se procedió a la inoculación intranasal de 50 μ l de suspensión de neumococo con una cantidad conocida de UFC, preparada en solución salina estéril. La sobrevida se controló durante los 7 días siguientes y los experimentos se repitieron al menos tres veces. Los resultados mostraron que al emplear una menor dosis de anestesia había variaciones en la sobrevida de los animales desafiados

Se observó que al emplear la dosis menor de anestésico, existía mayor variación en el grado de sedación que alcanzaban los animales. Las diferencias en la sobrevida observadas parecían asociarse con la profundidad de la sedación que alcanzaba cada individuo al momento de la instilación de la suspensión bacteriana.

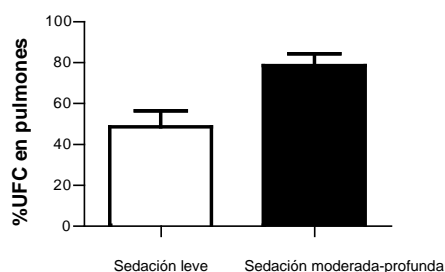


Figura IV.1.2: El grado de sedación determina la entrega eficiente del inóculo bacteriano en los pulmones. Ratones BALB/c, hembras de 8 semanas de edad, fueron anestesiadas con Ketamina (111mg/kg)/Xilacina (5.6mg/kg) administrada por ruta intraperitoneal. Los animales se dejaron reposar durante 2 minutos (sedación leve) o 10 minutos (sedación moderada-profunda) y seguidamente se administró el inóculo bacteriano mediante la aspiración de de gotas aplicadas en las narinas. Los animales se dejaron descansar en posición decúbito supino durante 5 minutos. Tras ser sacrificados, se removieron los pulmones y se prepararon homogeneizados en solución salina. El número de UFC de los homogeneizados y del inóculo fueron determinadas por plaqueo de diluciones seriadas en placas de agar sangre incubadas durante 16 hs. a 37°C y 5% CO₂. Las barras representan la media \pm SEM para un n=3. Resultados representativos de 2 experimentos independientes.

Se determinaron dos grados de sedación alcanzados con la dosis de 111 mg/kg-5.6 mg/kg de Ketamina-Xilacina tomando como indicio de sedación a la pérdida de movilidad y disminución del tono muscular: sedación leve que tiene lugar luego de 3 minutos de aplicada la anestesia e implica pérdida de movimiento pero sin relajación muscular completa y sedación moderada-profunda a partir de los 10 minutos de la aplicación de la anestesia, con pérdida total de movimiento y relajación muscular

completa. A continuación se determinó el porcentaje de bacterias vivas que alcanzaban los pulmones en función del grado de sedación al momento de la instilación intranasal. Tras recibir el anestésico los ratones se dejaron reposar 3 minutos (sedación leve), o 10 minutos (sedación moderada-profunda) antes de ser inoculados con la suspensión de neumococo serotipo 1 o 3. Transcurridos 5 minutos luego de administrado el inóculo de bacterias, los animales fueron sacrificados y se les extrajeron los pulmones para la preparación de homogeneizados en solución salina. La determinación de UFC en pulmones se realizó mediante siembra de diluciones seriadas del homogeneizado en placas de agar-sangre. Como se muestra en la *Figura VI.1.2*, los animales que recibieron el inóculo bacteriano bajo sedación moderada-profunda recibieron promedialmente cerca de un 80% del total de las bacterias administradas ($78.7 \pm 9.8\%$), mientras que en los inoculados bajo sedación leve no se alcanzó a recuperar el 50% del total de bacterias inoculadas ($48.7 \pm 13.5\%$). Concordantemente, a la misma dosis de inóculo bacteriano, los animales infectados bajo sedación moderada-profunda mostraron menor tasa de supervivencia que los infectados bajo sedación leve.

En base a estos resultados, todas las infecciones se realizaron estrictamente en animales bajo sedación moderada-profunda.

IV.1.2. Caracterización del modelo de neumonía invasiva en ratones

Susceptibilidad de ratones BALB/c y C57/BL6 a la infección respiratoria con serotipos 1 y 3 de *Streptococcus pneumoniae*.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la infección *in vivo*, se realizó la puesta a punto del modelo murino de neumonía neumocócica. En primer lugar se estudió la susceptibilidad de las cepas de ratones BALB/c y C57BL/6 frente al desafío intranasal con los dos serotipos de neumococo seleccionados, en términos de tasa de mortalidad frente al desafío con dosis infectivas crecientes, evolución de la carga bacteriana en pulmones y sangre, y caracterización del perfil transcripcional en pulmones y reclutamiento celular hacia las vías respiratorias.

En primera instancia se comparó la susceptibilidad de las dos cepas de ratones ante la infección intranasal con dosis crecientes de neumococo de serotipo 1 o 3. La supervivencia de los animales infectados se registró diariamente por un período de 7 días. Como ilustra la *Figura IV.1.3*, la cepa BALB/c resultó ser más susceptible a la infección, presentando una tasa de mortalidad mayor en comparación a la de la cepa C57BL/6 para la misma dosis infectiva de cada serotipo.

Se definió a continuación la mínima dosis letal (MDL) de neumococo capaz de causar un 100% de muerte en cada cepa de ratones y para cada serotipo bacteriano. La MDL para ratones BALB/c desafiados con *S. pneumoniae* serotipo 1 fue de 4×10^5 UFC/50 μ l. Para el caso del serotipo 3 en la misma cepa de ratones no fue posible definir una MDL con igual precisión ya que en los diferentes experimentos de desafío con la dosis de 4×10^5 UFC/50 μ l, la supervivencia varió entre el 0 y el 20%.

Cabe destacar que la *Figura IV.1.3 C* muestra el resultado representativo de la mayoría de los experimentos.

La cepa E 1434 se caracteriza por ser una cepa muy capsulada, lo que dificulta la recuperación del total de las bacterias por centrifugación, así como el recuento de las UFC en placa. Esto determina que la dosis infectiva para este serotipo no pueda ser calculada con igual precisión que para el serotipo 1. Sumado a la mayor susceptibilidad de la cepa BALB/c, esto podría explicar las diferencias observadas en los distintos ensayos de desafío.

Para el caso de la cepa C57BL/6 se definió como MDL la dosis de 4×10^7 UCF/50 μ l para el serotipo 1 y de 4×10^6 UCF/50 μ l para el serotipo 3.

En vista de los resultados, se optó por profundizar en la caracterización del modelo de neumonía invasiva empleando el aislado clínico E 1585 de serotipo 1 en ratones BALB/c. El serotipo 3 y la cepa C57BL/6 fueron empleados en comparaciones puntuales.

Una descripción detallada del modelo de neumonía aguda empleando la cepa E1585 serotipo 1 en la cepa C57BL/6, así como otros detalles de la infección por serotipo 3 se encuentran disponibles en el trabajo de Tesis de la Dra. Analía Rial [69], realizado paralelamente y en colaboración con el presente trabajo.

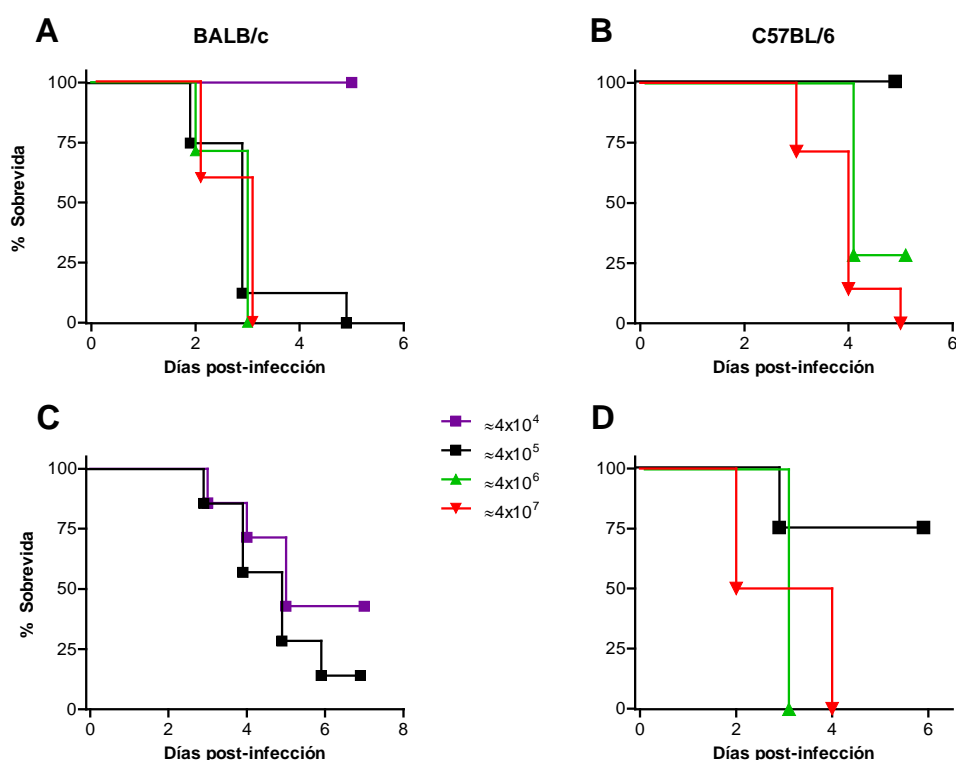


Figura VI.1.3: Susceptibilidad de ratones C57BL/6 y BALB/c a la infección intranasal con aislados clínicos de *S. pneumoniae* serotipos 1 y 3. Hembras de 8 semanas de edad, de las cepas BALB/c o C57BL/6, grupos de 4 a 8 animales, fueron anestesiadas con Ketamina/Xilacina por vía intraperitoneal e infectadas con diferentes dosis de neumococo serotipo 1 (A y B) o serotipo 3 (C y D) por instilación intranasal de 50 μ l de la suspensión bacteriana. La supervivencia fue monitoreada diariamente. Resultados representativos de al menos 3 experimentos diferentes.

Evolución de la carga bacteriana a nivel local y sistémico durante la infección con *S. pneumoniae* serotipo 1 en ratones BALB/C.

A continuación se estudió la evolución de la infección respiratoria aguda causada por la MDL de serotipo 1 en ratones BALB/c. Se realizó el monitoreo de la carga bacteriana en pulmones durante los primeros 60 minutos pos-institación (*Figura IV.1.4*), tiempo en el que no se registraron cambios significativos con respecto a la dosis infectiva administrada.

Posteriormente, se realizó el análisis a 1, 2 y 7 días post-infección, determinándose la carga bacteriana en homogeneizados de pulmones y la presencia de bacterias en sangre (a través de preparación de homogeneizados de bazo) de modo de comprobar la capacidad invasiva de la cepa. Como se aprecia en la *Figura IV.1.5*, transcurridas 24 horas de infección, la carga bacteriana en pulmones se duplicó y continuó creciendo hasta alcanzar valores en el entorno de las 10^9 UFC/pulmón a las 48 horas. Coincidentemente, a partir del segundo día de infección, *S. pneumoniae* fue aislado del bazo de los animales infectados. El aumento de la carga bacteriana en pulmones y bazo coincidió temporalmente con la muerte de los animales, que comenzó a partir del día 3 y continuó hasta el día 5 post-infección.

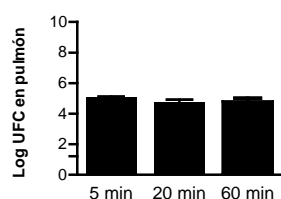


Figura IV.1.4: Evolución de la carga bacteriana en pulmones a tiempos tempranos. Hembras BALB/c de 8-10 semanas de edad fueron anestesiadas con Ketamina/Xilacina por ruta i.p. e infectadas por ruta i.n. con $\approx 4 \times 10^5$ UFC de *S. pneumoniae* E1585, serotipo 1. Los pulmones fueron extraídos y homogeneizados en solución salina estéril a los tiempos indicados y las UFC de neumococo fueron determinadas por siembra de diluciones seriadas en placas de agar sangre. Las barras representan la media \pm SEM (n=3).

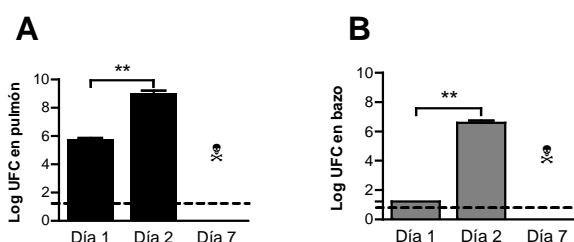


Figura IV.1.5: Evolución de la carga bacteriana en pulmones y en bazo durante la infección experimental con neumococo en ratones. Hembras BALB/c de 8-10 semanas de edad fueron anestesiadas con Ketamina/Xilacina por ruta i.p. e infectadas por ruta i.n. con $\approx 4 \times 10^5$ UFC de *S. pneumoniae* E1585, serotipo 1. Los órganos fueron extraídos y homogeneizados en solución salina estéril a los tiempos indicados en la figura. Las UFC de neumococo en pulmones (A) y bazo (B) fueron determinadas por siembra de diluciones seriadas en placas de agar sangre. El símbolo ☠ indica la muerte del 100% de los animales al tiempo señalado. Las barras representan la media \pm SEM (n=6) y los asteriscos diferencias significativas ($p < 0.01$) determinadas mediante test de Mann Whitney.

Perfil transcripcional en pulmones frente al desafío con la mínima dosis letal de *S. pneumoniae* serotipo 1.

Seguidamente, se realizó el análisis del perfil transcripcional en pulmones de ratones BALB/c tras el desafío con la MDL de *S. pneumoniae* serotipo 1. La cantidad de ARN mensajero de genes involucrados en la respuesta inmune se cuantificó por RT-qPCR de forma relativa al grupo tratado con solución salina, con previa normalización respecto del mensajero de β -actina.

En primera instancia se analizó la variación de los ARN mensajeros de *Il6*, *Tnfa*, *Ccl20*, *Cxcl1*, *Il17a*, *Il23*, *Il10* y *Tgfb* en pulmones a tiempos cortos post-infección: inmediatamente al desafío, 20 minutos, 1 hora o 4 horas después (*Figura IV.1.6*).

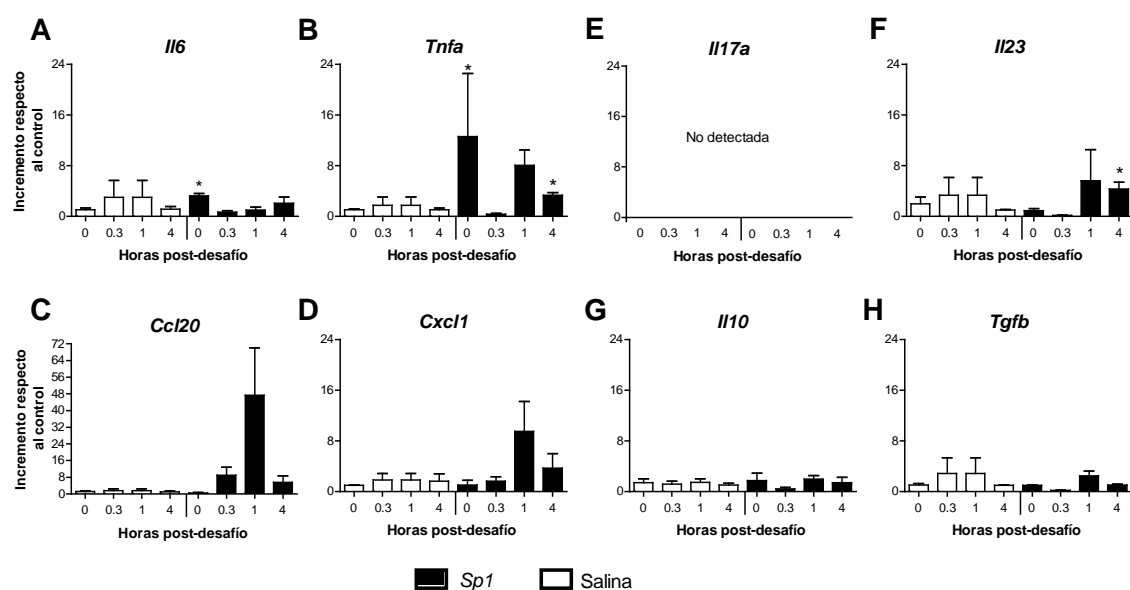


Figura IV.1.6: Etapas tempranas de la infección respiratoria con *S. pneumoniae* serotipo 1: perfil transcripcional en pulmones. Hembras BALB/c de 10-12 semanas de edad fueron infectadas por ruta i.n. con $\approx 4 \times 10^5$ UFC de serotipo 1. Los pulmones se extrajeron a los tiempos indicados para realizar extracción de mensajeros totales. El nivel relativo de RNAm para el gen de interés fue normalizado empleando como gen de referencia β -actina. Los resultados se expresan como cantidad de RNAm del gen de interés normalizado (barras negras), relativa al grupo control (barras blancas). Las barras representan la media \pm SEM (n=3); los asteriscos representan incrementos significativos respecto al grupo que recibió salina para cada punto temporal para valores de $p < 0.050$, según test de Mann Whitney de una vía.

Seguidamente, se completó el análisis para dichas citoquinas a las 24 horas post-desafío y se amplió el panel de mensajeros evaluados (*Figura IV.1.7*).

Como muestra la *Figura IV.1.6*, los mensajeros codificantes para las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL6 se incrementaron respecto del grupo control inmediatamente después de la instilación de las bacterias (*Fig. IV.1.6 A y B*) y continuaron elevados a las 24 horas post-desafío (*Fig. IV.1.7 A y B*). Los mensajeros de *Tnfa* mostraron el mayor aumento inmediatamente después de la instilación, mientras que los ARNm de *Il6* continuaron aumentando hasta las 24 horas, resultados concordantes con varios reportes que demuestran la inducción de dichas citoquinas en modelos experimentales de infección respiratoria con *S. pneumoniae* en ratones [27,28,69,147,148].

Los mensajeros de *Cxcl1* y *Ccl20*, codificantes para dos citoquinas quimiotácticas pertenecientes a las familias ELR-CXC y CC respectivamente, consideradas importantes mediadoras del proceso inflamatorio durante la neumonía neumocócica [38,39], también mostraron incrementos. Aunque el análisis estadístico no reveló diferencias significativas respecto al grupo control durante las primeras horas post-desafío, se observó una tendencia al aumento que alcanzó su máximo a los 60 minutos. La falta de significancia estadística en las primeras fases de la infección fueron seguramente consecuencia de variaciones interindividuales que, sumadas al pequeño número de individuos por grupo, afectaron la potencia del test estadístico aplicado. A las 24 horas las diferencias fueron menores aunque estadísticamente significativas respecto a la contraparte no infectada, confirmando el aumento de los mensajeros de estas quimioquinas. Adicionalmente, se observó incremento de los

mensajeros de *Cxcl2*, otra quimioquina relacionada de acción homóloga a *Cxcl1*, a las 24 horas del desafío (*Figura IV.1.7 E-G*).

Varios grupos de investigación, incluido el nuestro, han reportado la inducción de IL17 y de respuestas del tipo Th17 durante la infección neumocócica aguda, frente a la colonización nasofaríngea y durante la respuesta a la vacunación con antígenos de neumococo [68,69,149-153]. Estas respuestas se caracterizan por la producción de IL17 y de otras citoquinas relacionadas como IL21, IL22, IL23 y antimicrobianos como proteínas de la familia S100, MMP9 y lipocalinas [153-161]. Se observó la inducción de algunas citoquinas relacionadas con el perfil Th17 pero no se observó inducción de los mensajeros de *Il17a* en ninguno de los puntos temporales estudiados (*Figuras IV.1.6 E y IV.1.7M*). Tampoco se observó presencia de ARNm de *Il22* (*Figura IV.1.7 O*). Entre las citoquinas relacionadas a la respuesta Th17 que sí mostraron incrementos, se encontró el mensajero *Il23-p19*. Éste codifica para la subunidad p19 que junto con otra, p40, conforman el heterodímero conocido como IL23 [162]. Esta citoquina es producida por células presentadoras de antígenos (CPAs) y macrófagos activados en contexto pro-inflamatorio, ha sido fuertemente vinculada a la respuesta frente a infecciones mucosas causadas por bacterias gram-positivas y gram-negativas (revisado en [154]). Los mensajeros de *Il23-p19* mostraron un incremento significativo aunque modesto a las 4 horas del desafío, que ya no se observó a las 24 horas (*Figuras IV.1.6 F y IV.1.7P*). Otra citoquina que se ha relacionado con el desarrollo al fenotipo Th17 [163], cuyo mensajero mostró aumentos a 24 horas, fue IL21 (*Figura IV.1.7 N*). Esta citoquina de acción pleiotrópica, se ha vinculado con la amplificación del fenotipo, presentando también acción autócrina que además de inducir su propia producción, lleva a la expresión del receptor de IL23, lo que facilita el mantenimiento y estabilización del fenotipo Th17 [163]

Por otra parte, los mensajeros para la lipocalina 2 (*Lcn2*) se vieron incrementados a las 24 horas del desafío (*Figura IV.1.7 Q*). Lipocalina 2 es una proteína perteneciente a una superfamilia de proteínas de transporte que unen pequeñas moléculas hidrofóbicas, expresadas en la mucosa respiratoria durante procesos inflamatorios [164].

Por último, cabe mencionar que los mensajeros de *Il18*, *Il1b*, *Ly6g*, *Il4*, *Ifng*, *Il12-p35*, *Tlr5*, *Hamp*, *S100A9*, *Igj*, *Pigr*, *Il10*, *Foxp3* y *Tgfb*, no mostraron incrementos a ninguno de los tiempos estudiados.

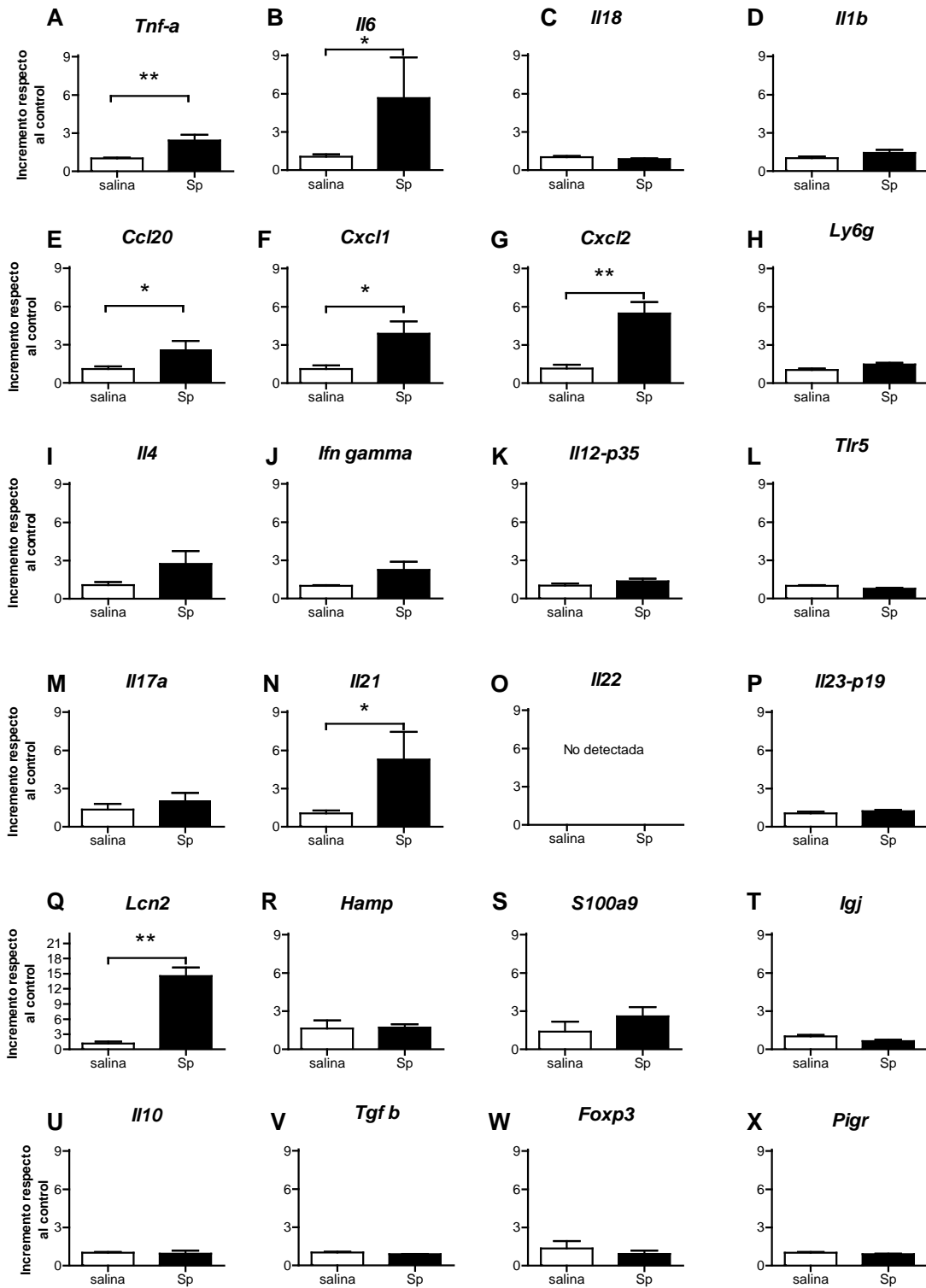


Figura IV.1.7: Perfil transcripcional en pulmones 24 horas post-infección con *S. pneumoniae* serotipo 1. Hembras BALB/c de 8-10 semanas de edad fueron infectadas por ruta i.n. con $\approx 4 \times 10^5$ UFC de serotipo 1 y sacrificadas a las 24 horas para realizar extracción de mensajeros totales a partir de pulmones. El nivel relativo de RNAm para cada gen fue normalizado empleando como referencia el gen de β -actina. Los resultados se expresan como cantidad de los RNAm normalizados relativa (barras negras) al grupo control (barras blancas). Las barras representan la media \pm SEM (n=5 para *Cxcl1*, *Ccl20*, *Il6*, *Il4*, *Il10*, *Tgf- β* , *Tnf- α* , *Il23*, *Ly6g*, *Cxcl2*, *Tlr5*, *Il18*, *Il1- β* , *PigR*, *Igj*, *Foxp3*, *Il17a*, o n=3 para *Lcn2*, *Hamp*, *S100a9*, *Ifn- γ* , *Il12p35*, *Il21* e *Il22*). Los asteriscos indican aumentos significativos, (*) para $p < 0.05$ y para (**) $p < 0.01$ determinadas mediante test de Mann-Whitney de una vía.

Caracterización de las poblaciones celulares en pulmones y vías aéreas durante la infección con serotipo 1.

Tras el análisis transcripcional, se procedió a estudiar el impacto de la infección a nivel de las poblaciones celulares y cambios anatómicos microscópicos en pulmones. Se realizó el análisis de las poblaciones celulares en pulmones y vías aéreas así como el análisis histológico de pulmones en ratones infectados con la MDL de serotipo 1, comparándose los con animales tratados con solución salina estéril.

La *Figura IV.1.8* muestra el resultado del análisis de las poblaciones celulares en parénquima pulmonar a las 24 horas del desafío. Los animales infectados fueron sacrificados y los pulmones se extrajeron con previa realización de lavados broncoalveolares para remover las células de las vías aéreas. El tejido fue sometido a disgregación mecánica y química obteniéndose suspensiones celulares que fueron teñidas con anticuerpos monoclonales contra epítopes de superficie conjugados a fluorocromos, fijadas y analizadas por citometría de flujo. Se comparó el porcentaje de cada uno de los tipos celulares definidos según se especifica en la figura respecto al número total de células en pulmón. De este análisis se concluye que a nivel del parénquima pulmonar, no se observaron cambios significativos respecto al grupo control en ninguna de las poblaciones celulares analizadas (linfocitos CD3 totales o T-CD4 y T-CD8, linfocitos B, células NK, células dendríticas plasmacitoides y mieloides, macrófagos y neutrófilos-PMN); los PMN mostraron un leve incremento, aunque no significativo.

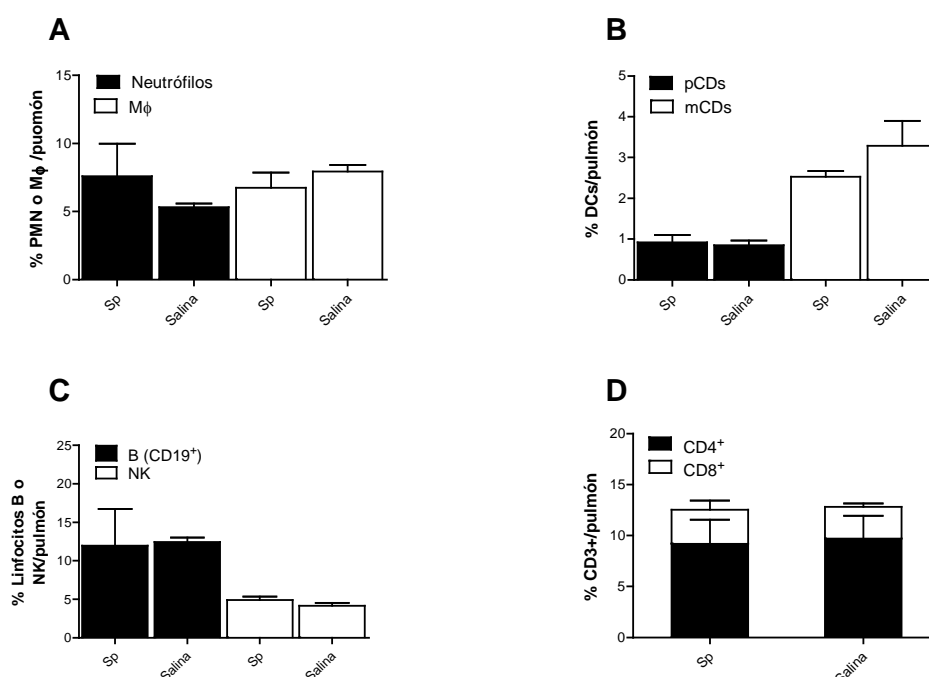


Figura IV.1.8: Perfil de las poblaciones celulares en pulmones durante la infección respiratoria aguda con la MDL *Streptococcus pneumoniae*. Ratones BALB/c de 10-12 semanas de edad fueron desafiados por ruta IN con la MDL de serotipo 1. Los animales fueron sacrificados a las 24 horas, tiempo en que se extrajeron los pulmones, previa realización de lavado broncoalveolar. A partir del parénquima pulmonar se prepararon suspensiones celulares y se realizó la tinción con anticuerpos monoclonales contra diferentes marcadores de superficie conjugados a fluorocromos. Los especímenes se analizaron por FACS. En base a los marcadores empleados se distinguieron las siguientes poblaciones celulares: neutrófilos (definidos como Ly6G^{allo};F4/80^{neg}), macrófagos (Mφ, definidos como: Ly6G^{neg};F4/80^{pos}), linfocitos T-CD4 (definidos como: CD3^{pos};CD4^{pos}; CD8^{neg}), linfocitos T-CD8 (definidos como CD3^{pos};CD4^{neg}; CD8^{pos}), células B y NK (definidas como: CD19^{pos}; CD49b^{neg} y CD19^{neg}; CD49b^{pos} respectivamente), células dendríticas mieloides (mCDs, definidas como: CD11c^{allo}; CD11b^{allo}; IAd^{allo}) y células dendríticas plasmacitoides (pCDs, definidas como: CD11c^{int-bajo};CD11b^{neg};IAd^{int}). Los resultados se muestran como media ± SEM (n=3). No se detectaron diferencias significativas mediante análisis de Mann-Whitney de dos vías para $p < 0.05$.

A continuación se realizó el análisis histológico de secciones de pulmón 24 horas post-desafío. El grupo control fue inoculado por ruta i.n. con el mismo volumen de solución salina estéril de modo de contemplar el daño tisular debido a la inoculación de un volumen importante de líquido en las vías aéreas. Como se muestra en la *Figura IV.1.9 A*, la infección con *S. pneumoniae* provocó inflamación evidenciada como infiltración de células hacia los espacios alveolares y desorganización general del tejido peri-bronquial (*Fig. IV.1.9 B, paneles c y d*), eventos que no se observaron en el grupo tratado con solución salina estéril. También se observó hemorragia en torno a la luz de los bronquios y bronquiolos de los animales infectados (*Fig. IV.1.9, panel c*).

El contenido del LBA fue analizado por FACS a diferentes tiempos, encontrándose un aumento significativo de los PMN (definidos como células Ly6G^{alto}; F4/80^{neg}) a las 24 horas del desafío respecto del grupo control, resultado concordante con lo observado a nivel histológico. El infiltrado neutrofílico disminuyó rápidamente reduciéndose a la mitad transcurridas 40 horas.

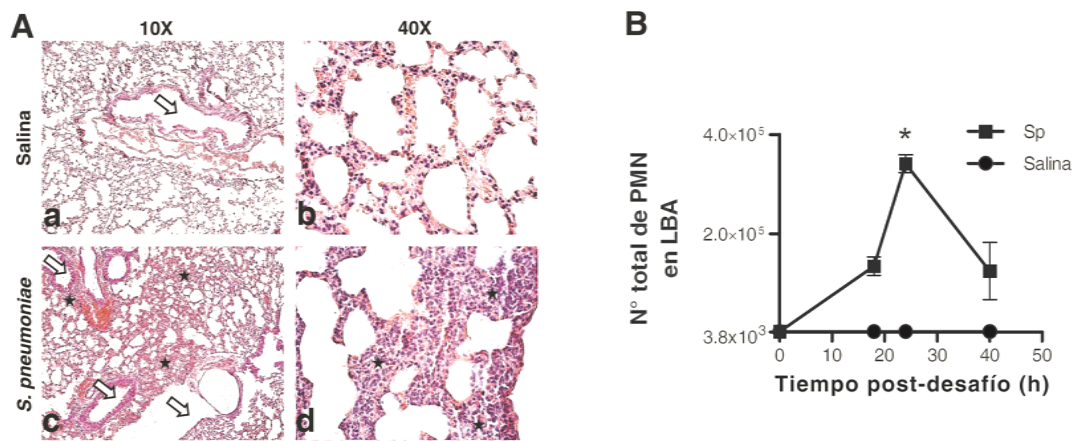


Figura IV.1.9: Análisis histológico y del contenido alveolar 24 h post-desafío con *S. pneumoniae* serotipo1. Ratones BALB/c de 10-12 semanas de edad fueron infectados por vía i.n. o inoculados con salina y sacrificados a las 24 h. **Panel (A):** Se obtuvieron cortes de pulmón a partir de bloques de parafina y se realizó tinción con hematoxilina-eosina. Los cortes se observaron bajo microscopio óptico (aumento ocular 10X), para n=3 y se analizaron en doble ciego. La estrella (★) señala el infiltrado celular, la flecha (↘) indica estructura correspondiente a los bronquios. **Panel (B):** Las células de los espacios alveolares fueron recuperadas mediante lavados broncoalveolares y analizadas por citometría de flujo empleando anticuerpos específicos para los marcadores de superficie Ly6G y F4/80 conjugados a fluorocromos. Los cuadrados representan la media para n=3 y las barras el error estándar (SEM); el asterisco indica diferencias significativas para p<0.05.

IV.1.3. Discusión Sección IV.1.

Hasta aquí, se presentaron los datos correspondientes a la puesta punto y caracterización del modelo de neumonía neumocócica invasiva en ratones con dos aislados clínicos de *S. pneumoniae*, E1585 y E1434 de la colección del Laboratorio de Referencia del MSP, correspondientes a serotipos 1 y 3 respectivamente.

En cuanto a los serotipos seleccionados, del estudio de datos epidemiológicos se concluye que son dos de los más relevantes en nuestro país y la región. Los serotipos 1 y 3, ocupan respectivamente el segundo y cuarto lugar dentro de los serotipos más aislados en nuestro país a partir de pacientes entre 0 y 14 años con cuadros de neumonía [8]. A nivel regional, siendo *S. pneumoniae* el agente bacteriano más frecuente de la NAC en Latinoamérica, los serotipos 1 y 3 están entre los 15 más frecuentes; el serotipo 1 es el segundo más aislado y el 3 ocupa el décimo lugar [9,165]. Cabe destacar, que además estos dos serotipos junto con el 5 son los más usuales en casos de neumonía con complicaciones como efusiones pleurales y enfermedad invasiva [8,9].

En lo que refiriere a las cuestiones prácticas que hicieron a la puesta a punto del modelo de infección intranasal en ratones, cabe destacar dos puntos: (1) el establecimiento de las condiciones apropiadas para el cultivo, almacenamiento y mantenimiento de las cepas bacterianas y (2) la determinación del grado de sedación de los animales al momento de la instilación. Se concluyó que la reproducibilidad de los resultados y evolución de la patología respiratoria dependen principalmente de la renovación periódica de los stocks madre y de trabajo, el mantenimiento del inóculo bacteriano a baja temperatura previo y durante el desafío de los animales y el tiempo transcurrido entre la administración del anestésico elegido y la instilación de las bacterias en las narinas del animal. Se establecieron las siguientes condiciones: (1) renovación de los stocks madre y de trabajo mantenidos a -80 °C cada 18 y 3 meses respectivamente, (2) empleo de una dosis de 111mg Ketamina y 5.6 mg Xilacina por kg de peso y (3) espera de al menos 10 minutos tras la administración del sedante antes de la inoculación i.n. de la suspensión bacteriana para asegurar la entrega de al menos el 80% de las UFC totales en los pulmones.

Los datos de sobrevida de ratones BALB/c y C57/BL6 desafiados por ruta i.n. con dosis crecientes de los dos serotipos, indicaron que la cepa BALB/c es la más susceptible. En cuanto a la virulencia de los aislados clínicos, el serotipo 1 resultó menos virulento que el serotipo 3 en ambas cepas de ratones. Los resultados obtenidos se oponen a los publicados en estudios anteriores, donde la cepa de BALB/c fue reportada como más resistente a la infección neumocócica en comparación a otras cepas incluida la C57/BL6 [166-168]. En dichos trabajos, la resistencia de ratones BALB/c con un mayor reclutamiento leucocitario en las vías respiratorias, en particular de neutrófilos, y a la mayor capacidad microbicida de macrófagos y neutrófilos en estos ratones [167,168]. Las diferencias entre los resultados encontrados en este trabajo y otros, pueden deberse a diversos factores. En primer lugar, deben considerarse diferencias entre las cepas bacterianas empleadas. Los diferentes

serotipos de neumococo presentan virulencia variable en una misma cepa de ratones, pero también ha de resaltarse que dosis infectivas iguales de neumococo del mismo serotipo capsular pero de diferente cepa, pueden también presentar distinta virulencia en la misma cepa de ratones. Lo anterior se evidenció en estudios como el de *Preston et al.* donde emplearon dos cepas diferentes de serotipo 3 para la infección i.n. en ratones, observando que mientras que el desafío con una de las cepas resultaba letal, la otra a la misma dosis no lo era [168]. Esto ilustra el hecho de que, a pesar de que las cepas bacterianas presentan el mismo polisacárido capsular, pueden diferir en otros factores de virulencia que son muy relevantes a la hora de determinar la capacidad invasiva, estimulación del sistema inmune del hospedero o influir en otros factores que determinen cuan letal resulta la bacteria en una cepa dada de ratones. Por otra parte, gran parte de la evidencia señala que variantes genéticas propias de cada cepa de ratón pueden contribuir al aumento de la susceptibilidad o resistencia ante determinadas infecciones, incluida la infección neumocócica (revisado en [169]). Concretamente en nuestro trabajo, es altamente probable que este último sea el caso. Las mismas cepas bacterianas fueron testeadas en ratones BALB/c y C57/BL6 de diferentes orígenes: provenientes del pie de cría de la División Nacional de Laboratorios Veterinarios (DILAVE), del Laboratorio Janvier – Francia y de laboratorios Jackson en Alemania. A igual dosis de serotipo 1 o 3 los ratones BALB/c provenientes de Laboratorios Janvier, mostraron ser más resistentes al ser infectados por ruta i.n. que los BALB/c del DILAVE o Laboratorios Jackson, mientras que los C57/BL6 de todos los orígenes mostraron susceptibilidad similar entre ellos. Debe tenerse en cuenta el estatus sanitario de las dos cepas de ratones evaluadas fue diferente, siendo los animales empleados en Uruguay convencionales y los provenientes de Laboratorios Janvier y Jackson libres de patógenos específicos.

En este trabajo, el modelo de neumonía invasiva se estableció mediante la inoculación de la menor dosis infectiva capaz de causar la muerte del 100% de los animales. Para el caso de la cepa BALB/c y el serotipo 1, la MDL fue de 4×10^5 UFC/ratón. En este modelo, la carga bacteriana en pulmones se mantuvo constante durante la primera hora de infección, duplicándose al cabo de 24 horas. La replicación bacteriana en pulmones continuó hasta alcanzar casi 4 órdenes de magnitud más que el inóculo inicial a las 48 horas; para ese entonces se detectaron bacterias en bazo confirmándose la capacidad invasiva de la cepa bacteriana de serotipo 1 en el modelo murino.

En cuanto al análisis de la respuesta inmune en pulmones durante la infección, se observó aumento de ARNm de varios genes proinflamatorios, reclutamiento leucocitario y daño tisular.

El reconocimiento de diversos componentes bacterianos por parte de los PRRs durante la infección por *S. pneumoniae*, desencadena la activación de varias cascadas de señalización que confluyen en la molécula adaptadora MyD88 y determinan en última instancia la activación del NF κ B y la transcripción de genes proinflamatorios. En particular, la infección pulmonar con *S. pneumoniae* de diversos serotipos se caracteriza por inducir la producción de TNF- α , IL1- β , IL6 y quimioquinas como CXCL1, CXCL2, entre otras [58,170]. Concordante con reportes previos

[23,27,28,68,69,166,171,172], el análisis del perfil transcripcional en pulmones durante la infección pulmonar con serotipo 1 reveló inducción de dichos mediadores inflamatorios.

En cuanto al rol de estas citoquinas en la defensa frente a la neumonía neumocócica, se ha establecido que TNF- α es crítico, hecho evidenciado por la mayor susceptibilidad de ratones deficientes en el receptor del TNF tipo I (TNFR) o tratados con anticuerpos neutralizantes anti-TNF- α . En estos animales se ha observado exacerbación de la bacteriemia y mayor mortalidad frente al desafío i.n. con neumococo [148,171,173]. Durante la infección respiratoria, TNF- α es producido en primera instancia por macrófagos alveolares. Esta citoquina facilita la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular mediante la inducción de moléculas de adhesión en células vasculares y promoviendo la permeabilidad del mismo [174,175]. Los neutrófilos y células fenotípicamente caracterizables como monocitos/macrófagos han sido identificadas como células productoras de TNF- α en etapas posteriores de la neumonía [148], teniendo por lo tanto un rol en la amplificación de la respuesta inflamatoria y su propio reclutamiento. Dada su gran capacidad inflamatoria, TNF- α se encuentra estrictamente regulado y su inducción suele ser temprana y por tiempos cortos. Sin embargo, el reclutamiento leucocitario al sitio de infección es mantenido posteriormente mediante la inducción de los genes que codifican para quimioquinas de las familias ELR-CXC y CC. En particular, CXCL1 y CXCL2 (homólogas a la IL8 humana), son inducidas tras la secreción de TNF- α y favorecen el reclutamiento de neutrófilos [176]. Estas citoquinas además de promover el reclutamiento de neutrófilos aumentan la actividad fagocítica de los PMN y macrófagos reclutados [23,177]. Por su parte las quimioquinas de la familia CC se asocian con reclutamiento de monocitos, macrófagos y linfocitos. Algunas quimioquinas de esta familia poseen actividad microbicida sobre bacterias gram-negativas y gram-positivas, tal y como es el caso de CCL20 [178,179]. Esta quimioquina, también inducida durante la neumonía neumocócica, podría por lo tanto tener un rol directo sobre la inhibición del crecimiento del neumococo en el pulmón además de contribuir en el reclutamiento celular.

Si bien la inducción de estas citoquinas en el modelo de neumonía invasiva presentado es concordante con datos de otros grupos, la respuesta observada difiere tanto en la cinética como en la magnitud [27,28]. Cabe destacar que estos otros estudios no solo han empleado cepas y tipos capsulares diferentes, sino que además las dosis infectivas empleadas fueron considerablemente más altas que la utilizada en el modelo de neumonía invasiva aquí presentado –empleando la mínima dosis letal. Comparando los resultados obtenidos en ratones BLAB/c, infectados con la MDL, contra el modelo de neumonía subletal en ratones C57/BL6 puesto a punto paralelamente a este trabajo por la Dra. Rial [68,69], se observa que la magnitud de la respuesta resulta semejante para varios de los ARNm analizados. Por el contrario, la magnitud en el aumento de los ARNm de las citoquinas proinflamatorias y de las quimioquinas mencionadas anteriormente es mucho mayor cuando se emplean dosis infectivas que superan en varios órdenes a la mínima dosis letal de este serotipo. Estos resultados sugieren que la magnitud y dinámica de la respuesta dependen en gran medida de la dosis infectiva empleada.

Nuestro grupo y otros han mostrado previamente que la respuesta inmune frente a la infección respiratoria con neumococo, induce el aumento de ARNm de *Il17a* y genes relacionados a la respuesta Th17, así como ARNm de *Ifng* y genes asociados a esta citoquina [68,69,149,180]. El análisis del perfil transcripcional con la MDL de serotipo 1 en la cepa BALB/c reveló incremento de los ARNm de genes vinculados a la respuesta de IL17, en particular IL23 e IL21. Sin embargo, la inducción de los ARNm de *Il17a* o *Il22* no fue detectada en los tiempos analizados, así como tampoco se detectaron cambios en los ARNm para *Ifng* o citoquinas relacionadas.

En cuanto al aumento de los ARNm, de *Il23* y *Il21* en ausencia de otras citoquinas vinculadas a la respuesta 17, podría especularse sobre roles independientes de estas citoquinas fuera del contexto de la respuesta Th17. En el contexto de la respuesta Th17, IL23 conforma dos ejes funcionales que operan en la respuesta inflamatoria frente a productos bacterianos en las mucosas. En particular, la activación del eje IL23/IL17 conduce al reclutamiento de neutrófilos y ha demostrado ser esencial en la defensa frente a diversos patógenos bacterianos incluido *S. pneumoniae* [181-185]. En el pulmón, la activación del eje IL23/IL17 en respuesta a productos de bacterias gram-positivas o gram-negativas media la respuesta innata temprana y además del reclutamiento de neutrófilos, induce un aumento de antimicrobianos como MMP-9 [160]. Por otra parte, el eje IL23/IL22 induce la producción de antimicrobianos dentro de los que se encuentran las proteínas de unión a calcio de la familia S100, y constituye una importante defensa frente a algunos patógenos extracelulares [155,161]. La ausencia de *IL17* e *Il22* podría sugerir que IL23 puede estar cumpliendo un rol independiente de estas citoquinas. Algunos estudios han demostrado que la administración exógena de IL23 induce la expresión de TNF- α en macrófagos peritoneales [186] y que la sobreexpresión del gen induce incrementos de esta citoquina en suero [187]. Sin embargo, estos estudios no establecen claramente si la inducción de TNF- α resulta de un efecto directo de IL23 o si la misma tiene lugar a través de un mecanismo indirecto. Por otra parte, podría postularse que, a pesar de haberse detectado mensajeros de *Il23-p19*, su traducción a proteína activa puede haber sido impedida por mecanismos post-transcripcionales que podrían afectar la estabilidad de los mensajeros de dicha interleuquina. De hecho, el mensajero de *Il23-p19* posee una larga región 3'-no traducida (3'-UTR, del inglés: *3'-untranslated region*) que contiene múltiples elementos ricos en adenosina/uridina (AREs, del inglés: *adenosine/uridine-rich elements*) a través de los que puede regularse la estabilidad de los mensajeros, habiéndose demostrado al menos la regulación negativa de los ARNm de IL23-p19 por parte de IFN- γ a través de la proteína TTP [188].

En cuanto a IL21, es una citoquina altamente expresada por células T colaboradoras tras estimulación vía TCR en presencia de IL6 [189]. En combinación con TGF- β , IL21 amplifica el desarrollo al fenotipo Th17 de manera independiente de IL6 y luego actúa de manera autócrina induciendo su propia producción y la expresión del receptor de IL23 que facilita el mantenimiento y estabilización del fenotipo Th17 [163]. Esta citoquina ha sido también relacionada con procesos de inflamación patológicos (Revisado en [190]). Además de su rol en la diferenciación de las células T-CD4, IL21 tiene un importante rol en la respuesta humoral. Por un lado, se propone que controla la generación de centros germinales indirectamente promoviendo la generación de células T-foliculares

[191,192] y por otra parte, induce el cambio de clase específicamente para la subclase IgG1 tras la inmunización de ratones con antígenos T-dependientes [193], e IgG1-IgG3 en humanos [194]. En el contexto de la infección neumocócica, la inducción de *I/21* podría entonces estar vinculada a la generación de respuestas humorales actuando como vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa en etapas tempranas de la infección más que estar jugando un rol en la diferenciación del linaje Th17.

En cuanto a los ARNm de los genes analizados que experimentaron aumento durante la infección, se observó el incremento del ARNm de lipocalina 2 (*Lcn2*). La lipocalina 2, también conocida como siderocalina o NGAL (de Neutrophil Gelatinase *Associated* Lipocalin) es miembro de una familia de proteínas transportadoras que han sido recientemente vinculadas a la inflamación en vías aéreas [164]. Diversas citoquinas regulan la expresión de *Lcn2*, entre ellas TNF- α [195]. La lipocalina 2 tiene un rol de defensa a través del secuestro de hierro de forma indirecta a través de la captura de sideróforos bacterianos como la enterobactina. Sin embargo no es claro aún cómo es que *Lcn2* podría contribuir en la defensa contra la infección aguda causada por *S. pneumoniae*, ya que esta bacteria no produce enterobactina [158].

En cuanto al perfil transcripcional, cabe finalmente destacar que no se observó inducción de los ARNm de *I/10* u otra citoquina anti-inflamatoria, lo que podría contribuir a un estado de inflamación exacerbado, que podría actuar en detrimento de la función de intercambio gaseoso de la mucosa respiratoria exacerbando la patología.

Los datos obtenidos del análisis de las poblaciones celulares e histología concuerdan con el perfil inflamatorio revelado tras el análisis transcripcional. Se observó infiltrado neutrofílico transitorio hacia los espacios alveolares que se hizo máximo a las 24 horas del desafío, pero no se observaron cambios significativos en otras poblaciones analizadas. En términos generales, se observó daño tisular, desorganización del tejido y hemorragia peribronquial en las secciones de pulmón de ratones infectados.

En suma, puede concluirse que la infección i.n. con la mínima dosis letal de serotipo 1 desencadenó una respuesta inflamatoria con inducción de varias citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y reclutamiento de PMN hacia los espacios alveolares. El carácter de la respuesta fue moderado en comparación a la magnitud desencadenada por mayores dosis infectivas de esta misma cepa en modelos desarrollados en paralelo en nuestro laboratorio. A pesar del reclutamiento leucocitario y la inducción de inflamación, la respuesta inmune no fue suficiente para contener la infección, teniendo lugar la replicación bacteriana local, diseminación sistémica, ocurriendo en última instancia la muerte de los animales.

IV.2. Evaluación de agonistas de PRRs como herramientas terapéuticas contra la neumonía neumocócica

La introducción de los antibióticos en la década del 50 significó un gran avance en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En el caso particular de la NAC, la introducción de la antibióticoterapia significó una importante reducción de la mortalidad asociada a infecciones bacterianas del tracto respiratorio. Sin embargo, las hospitalizaciones han continuado creciendo desde entonces [3].

El uso excesivo y a veces inadecuado de los antibióticos ha provocado que varios de los agentes etiológicos de la neumonía adquirida en la comunidad y entre ellos *Streptococcus pneumoniae*, desarrollaran resistencia a los tratamientos. La neumonía neumocócica ha sido clásicamente tratada con penicilinas. En 1963, en Estados Unidos, se identificó el primer aislado clínico de *S. pneumoniae* con resistencia moderada a este antibiótico. En los años posteriores, cuatro cepas con resistencia similar fueron aisladas en Australia y Nueva Guinea [196]. Quince años más tarde las primeras cepas de neumococo altamente resistentes a la penicilina se aislaron en Sudáfrica, convirtiéndose en la década del 80 en un problema mundial [197,198].

La prevalencia de cepas resistentes a la penicilina varía según la región geográfica. Corea del Sur es el país que presenta la mayor prevalencia de cepas de neumococo resistentes a la penicilina, habiéndose encontrado hasta un 89% de cepas resistentes en el total de los aislamientos [199]. Mientras tanto, países desarrollados como EE.UU. presentan tasas bajas del orden de 6% [7]. En Latinoamérica no existían datos representativos de serotipos y resistencia a antibióticos hasta que en la década del 90 se creó el Sistema Regional de Vacunas (SIREVA), un programa para la vigilancia de enfermedades invasivas por *S. pneumoniae* en Latinoamérica coordinado por la Organización Panamericana de la Salud [165]. Estadísticas recientes indican que las tasas de aislamientos de neumococo resistentes a la penicilina están en el entorno de 36% en Uruguay y Argentina, 18% en Brasil y 12% en Colombia [7].

Por otra parte, la situación se ha agravado por la aparición de cepas multirresistentes (que presentan resistencia a tres o más grupos de antibióticos) [200]. *S. pneumoniae* es capaz de intercambiar material genético muy fácilmente con otras cepas de neumococo e incluso también con otros *Streptococcus*, por ejemplo del grupo *viridans* [7]. Esto le permite adquirir fácilmente nuevas resistencias y adaptarse a la presión selectiva impuesta por los antibióticos de uso corriente, lo que dificulta cada vez más el tratamiento de las infecciones neumocócicas.

El sistema de salud se enfrenta a una situación crítica, donde las crecientes tasas de microorganismos resistentes a los antibióticos junto con el enlentecimiento en el descubrimiento de nuevos antimicrobianos, limita enormemente el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas

incluyendo la enfermedad neumocócica. Claramente, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas es necesario, pero para aumentar las chances de éxito y asegurar su eficacia a largo plazo, las mismas deben ser concebidas de un modo conceptualmente diferente a las actuales. Idealmente, nuevos agentes antimicrobianos deberían controlar la infección rápidamente, promover simultáneamente múltiples mecanismos microbicidas de modo de dificultar el desarrollo de resistencias o mecanismos de escape y por último promover respuestas a largo plazo que eviten infecciones recurrentes. En este sentido, la respuesta innata comparte muchas de estas características, por lo que la activación de este brazo de la respuesta inmune ofrece un gran potencial para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

En la última década, agonistas de los receptores innatos de reconocimiento de patrón (PRRs), denominados patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), y dentro de ellos en particular los agonistas de receptores de tipo Toll (TLRs), han sido empleados en el tratamiento de enfermedades infecciosas de diferente etiología, cáncer, alergias e incluso como inmunopotenciadores en vacunas. El éxito de los tratamientos basados en agonistas de TLRs ha llevado al desarrollo de varios estudios clínicos en humanos (revisado en [71-73]) y el tema continua siendo muy investigado tanto a nivel básico como aplicado.

En este capítulo y el siguiente se presentan resultados que demuestran la utilidad de la activación selectiva de las defensas innatas en el tratamiento de la neumonía neumocócica mediante el empleo de diferentes agonistas de PRRs. Se ha explorado la ruta mucosa como vía de administración de los inmunomoduladores, particularmente la ruta intranasal. El foco de los próximos dos capítulos se centra en la capacidad de la flagelina, un agonista TLR5/NLRC4 no relacionado con *S. pneumoniae*, de conferir protección en el modelo de neumonía invasiva presentado en el capítulo anterior. Se muestran resultados de la caracterización de sus efectos a nivel de la mucosa respiratoria, las vías de señalización requeridas para el efecto terapéutico, así como su utilidad para prevenir la re-infección. Parte de los resultados de los capítulos VI.2 y VI.3 fueron publicados bajo el título "*Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection*", en la revista arbitrada *Infection and Immunity*, 2010; 78 (10). Adicionalmente, el desarrollo de la presente investigación dio lugar a la colaboración con el grupo del Centro de Infección e Inmunidad del Instituto Pasteur de Lille, que resultó en la publicación asociada "*Key Role for Respiratory CD103⁺ Dendritic Cells, IFN- α , IFN- γ , and IL-17 in protection against Streptococcus pneumoniae infection in response to α -Galactosylceramide*"; *The Journal of Infectious Diseases*, volumen 206 del año 2012. Ambas publicaciones se adjuntan en el Anexo I de esta tesis. Por último, los resultados obtenidos posibilitaron el registro en EE.UU. de la patente WO2011/161491 "*Methods and pharmaceutical compositions for the treatment of respiratory tract infections*".

IV.2.1. Evaluación de *MAMPs* como agentes terapéuticos para el tratamiento de la neumonía neumocócica invasiva.

Efecto de la coadministración intranasal de MAMPs en el progreso de la neumonía neumocócica invasiva.

La cápsula polisacáridica convierte al neumococo en una bacteria resistente a la fagocitosis y a lisis mediada por complemento. Es así que la eliminación efectiva de este coco capsulado requiere de la generación de anticuerpos anticapsulares capaces de opsonizar la bacteria y así promover su fagocitosis por parte de los neutrófilos. Sin embargo, a menos que exista un evento de inmunización previo, estos anticuerpos anti-polisacárido no se encuentran presentes en las etapas tempranas de la infección. Una alternativa para mejorar el pronóstico de la infección pulmonar primaria ya establecida podría ser el empleo de inmunopotenciadores capaces de desencadenar mecanismos efectores de la inmunidad que superen en calidad y/o magnitud la respuesta naturalmente desencadenada por la bacteria y favorezcan la capacidad microbicida de los fagocitos aún en ausencia de anticuerpos anticapsulares específicos.

Trabajando bajo la hipótesis de que la activación de las defensas innatas es suficiente para impedir la progresión de la infección, se procedió a desafiar ratones BALB/c con la MDL de serotipo 1 y coadministrar por ruta i.n. diferentes agonistas de receptores innatos. Los agonistas se seleccionaron en base a dos criterios principales: que fuesen agonistas de receptores innatos naturalmente activados por neumococo (referidos como agonistas homólogos), o que fuesen agonistas de receptores innatos que hasta el momento no se hayan descrito como capaces de reconocer componentes de la bacteria durante la infección natural (referidos en adelante como agonistas heterólogos).

En base a estudios previos *in vivo* o *in vitro*, se seleccionó la dosis más adecuada para cada compuesto, habiéndose verificado previamente que ninguno de ellos ejercía por sí mismo efecto bactericida sobre el neumococo. En todos los casos se emplearon compuestos de alto grado de pureza y libres de endotoxina.

Los compuestos elegidos como agonistas homólogos fueron los siguientes:

- **Agonistas de TLR2/6:** lipopéptido activador de macrófagos 2 o MALP-2 (del inglés, *Macrophage-Activating Lipopeptide-2*) y S-[2,3-bispalmitoiloxi-(2R)-propil]-R-cisteinil-amidomonometoxil polietilenglicol, denominado en adelante BPPcysMPEG, que consiste en una variante sintética PEGilada derivada de MALP-2 que retiene la capacidad agonista de TLR2/6 y presenta mejores características fisicoquímicas como mayor solubilidad en agua. Ambos activan la cascada de señalización a través de MyD88/TIRAP que culmina con la translocación nuclear de NF κ B y producción de citoquinas inflamatorias. [201-204]

- **Agonista de TLR9:** CpG ODN 1826; un ODN tipo B específico para el TLR9 murino capaz de estimular fuertemente las células B a través de la vía MyD88/NF κ B, pero sin capacidad de inducir la secreción de IFN- α [106,205].
- **Agonista de STING:** ácido cíclico 3', 5'-diguanílico o c-di-GMP; es un ácido nucleico particular que fue primeramente identificado en *Gluconacetobacter xylinus* y constituye un mediador exclusivo de bacterias. Es reconocido por el receptor innato STING (del inglés, *Stimulator of Interferon Genes*), a través del cual activa la señalización vía TBK1 (del inglés, *Tank Binding Kinases 1*) y el factor de transcripción IRF3, terminando en la producción de IFN de tipo I [62,206].
- **Agonista del TCR semi-invariante V α 14⁺- β :** α -galactosilceramida (α -GalCer); un glicolípido originalmente derivado de la esponja marina *Agelas mauritanus* con interesantes propiedades inmunomoduladoras. Se empleó una variante PEGilada que presenta mejor solubilidad en agua y reportada como capaz de ser presentadas en receptor CD1d. Es reconocido en este contexto por el receptor TCR de células iNKT y desencadena la rápida producción de citoquinas proinflamatorias por parte de estas células [134].

Dentro de los agonistas heterólogos se seleccionaron:

- **Agonista de TLR3:** ácido poliinosínico-policitidínico o poli(I:C); es un análogo sintético al ARN doble cadena, compuesto por una cadena de poli-inosina y una cadena de poli-citidina, similar a un patrón molecular presentado por algunos virus. Desencadena la producción de IFN de tipo I a través de la vía TRIF/IRF3 (del inglés, *Interferon Regulatory Factor 3*) [207,208].
- **Agonista de TLR5/NLRC4-Naip5:** flagelina (FliC) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; una proteína componente del flagelo bacteriano que desencadena señalización a través de un PRR de membrana, el TLR5, y los PRR citosólicos de la familia de los NLRs, NLRC4 y Naip5 que al reconocer una región C-terminal, forman un complejo multiproteico que determina la activación de la vía MyD88/NF κ B y de caspasa-1 vía el inflamasoma, resultando en la producción de varias citoquinas y quimioquinas proinflamatorias [93,94,98,100].

La *Figura IV.2.1* muestra los resultados de la sobrevida de ratones BALB/c desafiados con la MDL de serotipo 1 y tratados al momento del desafío con los mencionados agonistas de PRRs por ruta i.n.. Excepto para el caso de poli(I:C), la coadministración de los agonistas al momento del desafío tuvo un efecto positivo prolongando la sobrevida de los animales tratados con respecto al grupo control.

Dentro de los agonistas homólogos, los dos agonistas de TLR2/6 confirieron protección pero en diferente medida. Se observó un 60% de protección en el grupo tratado con R-MALP-2 y un 37.5% de protección para el grupo tratado con el agonista sintético BPPcysMPEG. Cabe desatacar que la dosis de BPPcysMPEG empleada fue la mitad de la de R-MALP-2.

El agonista de TLR9, CpG ODN 1826, confirió un importante nivel de protección promoviendo la supervivencia del 60% de los animales tratados. De modo similar, el mensajero intracelular bacteriano o c-di-GMP protegió al 50% de los animales, mientras que el total de los controles murieron debido a la infección.

Por su parte α -galactosilceramida en su variante PEGilada, logró retrasar la muerte de los animales respecto del grupo no tratado pero no evitó la muerte de los mismos, siendo que al cabo de 6 días, 7 de los 8 animales tratados con α -GalCer-MPEG murieron tras el desafío. Estos resultados difieren de los obtenidos empleando el compuesto original no PEGilado. Tal y como se demostró en el trabajo asociado “*Key role for respiratory CD103(+) dendritic cells, IFN- γ , and IL-17 in protection against Streptococcus pneumoniae infection in response to α -galactosylceramide*” (*Journal of Infectious Diseases*. 2012 1;206(5):723-34), el tratamiento i.n. con 2 μ g de α -galactosilceramida no PEGilado 24 horas antes del desafío con 5 LD50 de la misma cepa de serotipo 1, protegió al 100% de los animales. El efecto protector de α -GalCer fue observado incluso cuando el compuesto se administró 3 o 7 días previos al desafío, aunque en menor medida en comparación a la pre-administración 24 horas antes de la infección (ver Figuras 4A y 4B de la publicación asociada en el Anexo I). Empleando ratones *J α 18^{-/-}*, deficientes en la expresión de la cadena invariante del TCR V α 14J α 281 por delección en el gen *J α 281* y por tanto deficientes en células NKT-V α 14, se comprobó que la protección conferida por α -GalCer requiere de este tipo celular (ver Figura 4A de la publicación asociada en el Anexo I). Además se demostró que células dendríticas del fenotipo CD11b^{neg}/CD103^{pos} pero no los macrófagos, son esenciales para la activación de las células iNKT y que la protección frente a la neumonía neumocócica invasiva mediada por α -GalCer depende de la producción de las citoquinas IL17 e IFN- γ (ver Figuras 3, 5 y 7 de la publicación asociada en el Anexo I).

Referido a los agonistas heterólogos, se observó protección del 100% para el caso de flagelina y 0% para el caso de poli(I:C).

Poli(I:C) fue el único agonista que no confirió protección frente al desafío con la MDL de serotipo 1. El caso de este agonista resultó además particular en el sentido de que además pareció acelerar la muerte de los animales respecto al grupo control ya que sistemáticamente el 100% de los animales tratados con Poli(I:C) murieron a las 48 horas de haber recibido el tratamiento y desafío.

La flagelina, FliC de *S. Typhimurium*, agonista de TLR5/NLRC4-Naip5 fue el MAMP capaz de inducir el mayor grado de protección (80-100% de protección en los diversos experimentos de supervivencia) administrada a una dosis baja en comparación a la utilizada para el resto de los agonistas. Cabe destacar que los animales tratados con FliC casi no presentaron signos de enfermedad, a excepción del pelo erizado al cabo de 24 horas de haber sido infectados y tratados. En todo momento los animales se mostraron activos. En cambio, los animales sobrevivientes tratados con otros agonistas que también confirieron importantes tasas de protección, caso de MALP-2 o c-di-GMP, se mostraron

letárgicos y con el pelo erizado durante los primeros 4 días, recuperando el comportamiento habitual al quinto día post-tratamiento.

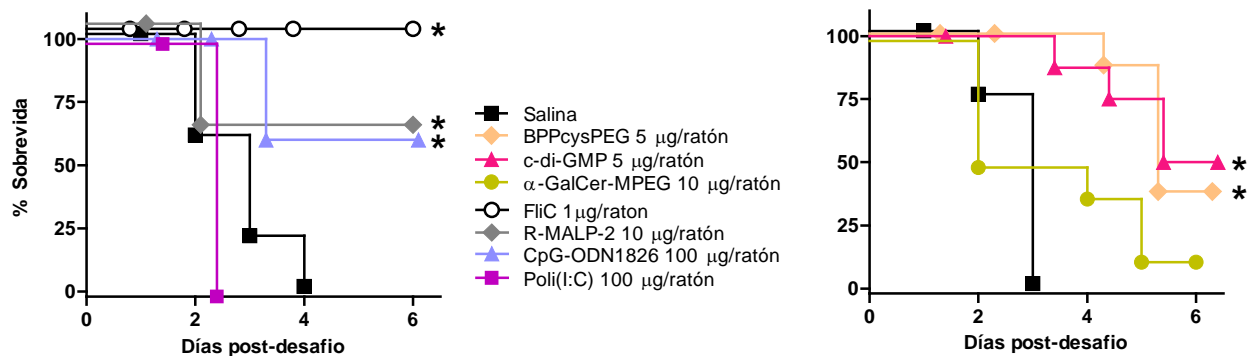


Figura IV.2.1: Protección frente a neumonía neumocócica inducida por tratamiento i.n. con diferentes MAMPs. Ratones BALB/c, hembras de 8 semanas de edad fueron desafiadas con la MDL de serotipo 1 y tratadas en simultáneo con diferentes compuestos bacterianos o agonistas sintéticos de PRRs a las dosis indicadas en la figura, o en solución salina estéril en el grupo control. La supervivencia se monitorizó diariamente durante 6 días. Se muestra el porcentaje de supervivencia para n=7-8 por grupo de tratamiento. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo tratado fueron comparadas respecto al grupo control mediante test de Log-rank (Mantel-Cox). Los asteriscos indican diferencias significativas para $p < 0.05$. Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

Finalmente, a fin de corroborar si los efectos de protección observados dependían de la estimulación específica de PRRs o si el efecto estaba simplemente ligado a la instilación de una molécula exógena, animales desafiados con la MDL de neumococo fueron tratados por ruta i.n. al momento del desafío con 1 o 10 µg de una proteína considerada inocua, la seroalbúmina bovina (BSA). Ninguno de los animales tratados con BSA sobrevivió al desafío sugiriendo que la protección depende de la capacidad del compuesto de estimular las vías innatas de la inmunidad.

Flagelina, fue el agonista que confirió la mayor protección y se seleccionó para efectuar una caracterización más profunda donde se evaluó el alcance de la protección a diferentes tiempos de administración, en distintas cepas de ratones y frente a otro serotipo de neumococo.

IV.2.2. Caracterización de la protección mediada por administración i.n. de flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Efecto de la dosis y tiempos de administración en la protección frente a neumonía invasiva mediada por flagelina.

Habiéndose demostrado que la administración de flagelina intranasal al momento del desafío brindaba alto grado de protección frente a la neumonía invasiva causada por serotipo 1, se procedió a evaluar si el mismo variaba de acuerdo al momento en que se realizaba el tratamiento y la dosis infectiva empleada.

Para estudiar la dependencia de la protección con el tiempo de administración de FliC respecto al desafío, ratones BALB/c fueron tratados con 1 μg de FliC por ruta i.n. 12 o 24 horas previas al desafío, al momento del desafío o 24 horas después de infectados con la MDL de serotipo 1. Como muestra el *panel A* de la *Figura IV.2.2*, la efectividad del tratamiento fue independiente del momento de la aplicación de FliC, mostrando tanto efectos profilácticos, como terapéuticos. Cabe destacar que la diferencia observada para la pre-administración a 12 horas no fue estadísticamente significativa respecto de los otros grupos que recibieron tratamiento, pero si fue significativamente mayor respecto al grupo control que no recibió FliC.

A fin de investigar el alcance de la protección mediada por FliC, la dosis de *S. pneumoniae* fue incrementada 10 veces con respecto a la MDL para serotipo 1 en la cepa BALB/c (de 4×10^5 a 4×10^6 UFC). Los animales fueron tratados al momento del desafío con 1, 5 o 10 μg de FliC y la sobrevivida fue monitoreada diariamente (*Figura IV.2.2 panel B*). Si bien la comparación de las curvas de sobrevivida de Kaplan-Meier mediante el test de Log-rank no fue significativa, los grupos tratados con 5 y 10 μg de FliC mostraron aumentos en sus tasas de sobrevivida del 20 y 40% respectivamente en comparación al grupo tratado con 1 μg , sugiriendo que el aumento de las dosis de FliC podría ser beneficioso frente a dosis infectivas mayores.

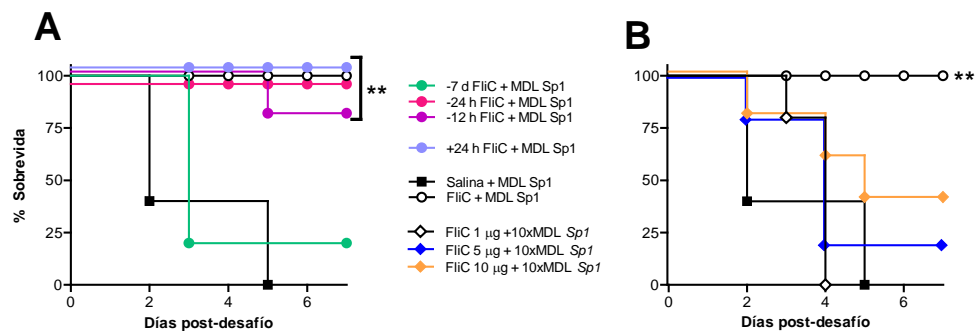


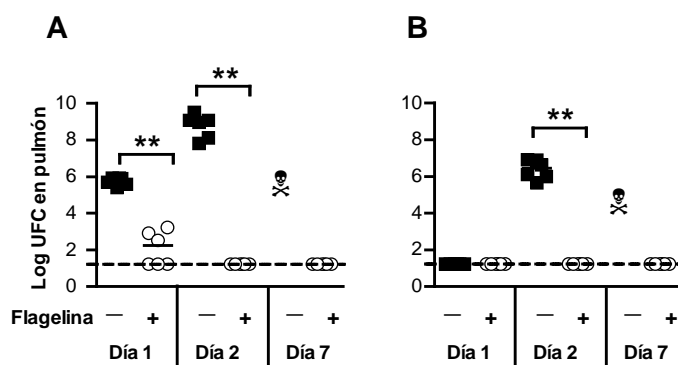
Figura IV.2.2: Influencia de la dosis de FliC, tiempo de administración y carga del inóculo bacteriano en la protección contra la neumonía neumocócica invasiva en ratones BALB/c. Hembras de 10-12 semanas de edad fueron desafiadas con diferentes dosis de serotipo 1 y tratadas con FliC por ruta i.n. **Panel A:** Los efectos profilácticos o terapéuticos de flagelina fueron evaluados administrando 1 μg de la proteína por ruta i.n. 7 días, 1 día, o 12 horas antes del desafío, o 24 horas después (n= 5/grupo). **Panel B:** La protección fue estudiada frente al desafío con una dosis infectiva mayor de serotipo 1 correspondiente a 10 MDL. Los animales fueron tratados al momento del desafío con 1, 5 o 10 μg de FliC, o salina como control (n= 5). En todos los casos la sobrevivida se monitoreó diariamente durante 7 días. Las curvas de sobrevivida de Kaplan-Meier para cada grupo tratado respecto a su control fueron comparadas mediante el test de Log-rank (Mantel-Cox). Dos asteriscos indican diferencias significativas para $p < 0.01$. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Impacto de la administración intranasal terapéutica y profiláctica de flagelina en la carga bacteriana en pulmones y bazo.

Seguidamente se estudió el impacto del tratamiento intranasal con flagelina en la evolución de la carga bacteriana a nivel local y sistémico durante la coadministración con las bacterias o en el modo terapéutico a 24 horas de establecida la infección pulmonar. Se enumeraron UFC en pulmones y bazo a fin de evaluar el impacto a nivel local y sistémico.

El tratamiento con flagelina al momento del desafío provocó una reducción significativa (tres órdenes de magnitud) de las UFC en pulmones respecto al grupo no tratado en el que aumentaron hasta alcanzar valores del orden de 10^9 UFC a las 48 horas (*Figura IV.2.3 panel A*). Para ese entonces los animales tratados con FliC habían eliminado totalmente la infección local. Flagelina evitó además la diseminación de la infección, no detectándose bacterias en los bazos de los animales tratados. En el grupo control la enfermedad cobró carácter invasivo detectándose un alto número de bacterias en bazo a las 48 horas del desafío (*Figura IV.2.3 panel B*). Al cabo de 7 días todos los animales que recibieron flagelina se encontraban en perfecto estado de salud, sin que pudiesen detectarse bacterias en sus pulmones o bazos, mientras que el total de los animales del grupo control murió debido a la infección al cabo de 4 días.

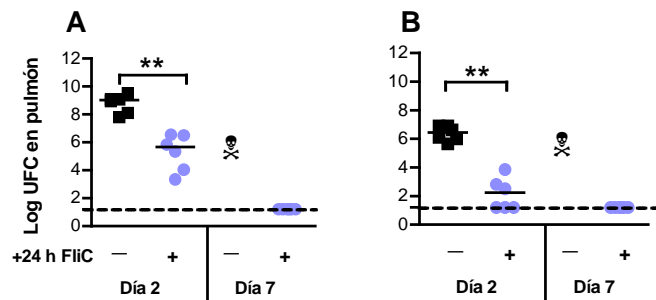
Figura IV.2.3: Efecto de la coadministración i.n. de flagelina en la evolución de la carga bacteriana en pulmones y en bazo. Hembras BALB/c de 8-10 semanas de edad fueron anestesiadas con Ketamina/Xilacina por ruta i.p. e infectadas por ruta i.n. con $\approx 4 \times 10^5$ UFC de *S. pneumoniae* E1585, serotipo 1 (cuadrados negros) o infectadas y tratadas al momento del desafío 1 μ g de FliC (círculos blancos). Los órganos fueron extraídos y homogeneizados en solución salina estéril a los tiempos indicados en la figura. Las UFC de neumococo en pulmones (A) y bazo (B) fueron determinadas por siembra de diluciones seriadas en placas de agar sangre. El símbolo ☠ indica la muerte del 100% de los animales al tiempo señalado. La línea punteada señala el límite de detección de la técnica. Las barras representan la media (n=5). Los dos asteriscos (**) señalan diferencias significativas para $p < 0.01$ según test de Mann-Whitney. Figura representativa de dos experimentos independientes.



A continuación, se realizó el mismo tipo de análisis para la administración terapéutica de flagelina 24 horas después de establecida la infección. Pulmones y bazos fueron recuperados a las 24 horas del tratamiento (48 horas post-desafío) y se contaron las UFC. Los resultados mostraron que el tratamiento de flagelina provocó la disminución de las UFC en pulmón en tres órdenes de magnitud en comparación al grupo control. De modo similar, los animales tratados mostraron una reducción de casi cuatro órdenes de magnitud en bazo. Al cabo de cuatro días todos los animales del grupo control murieron por la infección, mientras que los que recibieron flagelina sobrevivieron en su totalidad y ninguno mostró signos de infección local o sistémica al día 7 (*Figura IV.2.4*). Adicionalmente se investigó si el efecto protector de flagelina era dependiente del genotipo de la cepa de ratones empleada. Para ello, se realizó un análisis similar en la cepa C57/BL6 y en una cepa de ratones exogámicos, la cepa NMRI. Los ensayos en la cepa NMRI fueron realizados en

colaboración con el grupo del Dr. Jean Claude Sirard en el Institut Pasteur y llevados a cabo por la Dra. Laurye Van Maele.

Figura IV.2.4: Impacto de la administración terapéutica de flagelina en la carga bacteriana en pulmones y en bazo. Hembras BALB/c de 8-10 semanas de edad fueron anestesiadas con Ketamina/Xilacina por ruta i.p.e infectadas por ruta i.n. con $\approx 4 \times 10^5$ UFC de *S. pneumoniae* E1585, serotipo 1. A las 24 horas un grupo fue tratado con 1 μ g de FliC por ruta i.n.. A las 24 horas del tratamiento (día 2 post-desafío) los órganos fueron extraídos y homogeneizados en solución salina estéril. Las UFC de neumococo en pulmones (A) y bazo (B) fueron determinadas por siembra de diluciones seriadas en placas de agar sangre. El símbolo ☒ indica la muerte del 100% de los animales al tiempo señalado. Las líneas representan la media (n=5). Los dos asteriscos (**) señalan diferencias significativas para $p < 0.01$ según test de Mann-Whitney. Figura representativa de dos experimentos independientes.



Los ratones de la cepa C57/BL 6 fueron desafiados con 4×10^6 UFC, dosis muy cercana a la mínima dosis letal y tratados con 1 μ g de flagelina por ruta i.n. al momento del desafío o 12 horas antes. Como se muestra en el *panel A* de la *Figura IV.2.5*, el tratamiento con FliC al momento del desafío indujo cierto aumento en la sobrevida de los animales sin que el mismo fuese estadísticamente significativo. En cambio, la administración profiláctica, 12 horas antes del desafío promovió el aumento significativo de la sobrevida que fue de un 80% en comparación a un 20% para el caso del grupo control. La carga bacteriana en pulmones y bazo de los animales que recibieron el pre-tratamiento, se determinó 24 horas después del desafío (*Figura IV.2.5, panel B*). El grupo tratado con FliC mostró una reducción significativa de las UFC tanto en pulmón como en bazo en comparación al grupo control tratado con solución salina.

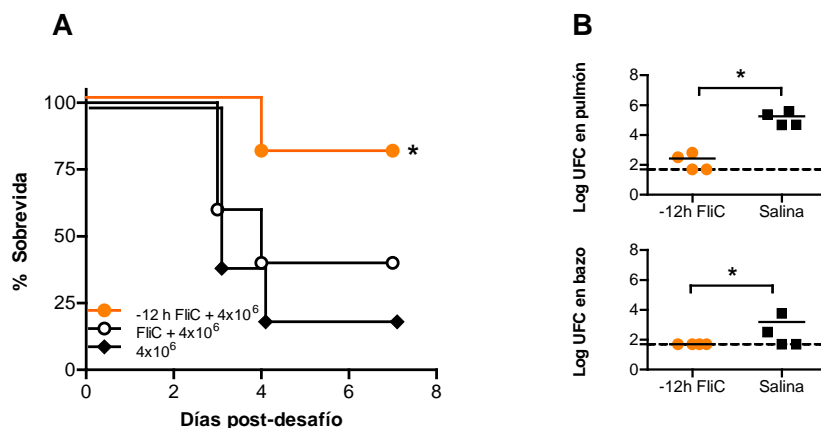


Figura IV.2.5: Efecto profiláctico de flagelina en la cepa C57/BL6. *Panel A:* Ratones C57/BL6, (n= 5) hembras de 8 semanas de edad fueron anestesiadas con Ketamina-Xilacina i.p. y desafiadas por ruta i.n. con 4×10^6 UFC de *S. pneumoniae* serotipo 1 y tratadas con 1 μ g de FliC por vía i.n. 12 horas antes del desafío, o en simultáneo al momento de recibir las bacterias. El grupo control recibió salina al momento del desafío. La sobrevida se registró diariamente por 7 días y las curvas de Kaplan-Meier fueron comparadas por el test de Log-rank (Mantel-Cox). Las diferencias significativas para $p < 0.05$ se indican con un asterisco (*). Resultados representativos de dos experimentos independientes. *Panel B:* El número de bacterias en pulmones y bazos fue determinado para el grupo que mostró una diferencia significativa en la sobrevida respecto al grupo control. Nuevamente, ratones C57/BL6, hembras, de 8 semanas, fueron tratadas con 1 μ g de flagelina i.n. y desafiadas 12 horas después con 4×10^6 UFC de serotipo 1. A las 24 horas del desafío, los pulmones y bazos fueron recuperados para determinar las UFC de neumococo por siembra de diluciones seriadas en agar-sangre. Las diferencias significativas se marcan con un asterisco (*) para $p < 0.05$. Las líneas enteras representan la media para n=4 y la línea punteada el límite de detección.

En cuanto a la evaluación de la capacidad protectora de flagelina en la cepa exogámica NMRI, en primer lugar se estudió la susceptibilidad de esta cepa a la infección intranasal con *S. pneumoniae* serotipo 1. Los resultados obtenidos mostraron que la susceptibilidad de los ratones NMRI es similar a la de la cepa C57/BL6, con un 80-100% de muerte a dosis infectivas de entre 4×10^6 y 4×10^7 UFC (Figura IV.2.6, panel A). A continuación, se investigó la capacidad de flagelina de conferir protección frente al desafío con 4×10^7 UFC, cuando era administrada al momento de la instilación de las bacterias por ruta i.n.. En este contexto, flagelina brindó protección a un 50% de los animales desafiados, valor significativo frente a la tasa de sobrevida del grupo control que fue del 8%. La protección se vio incrementada cuando FliC se administró de manera profiláctica, alcanzando valores de protección del 66% administrada 48 horas antes, hasta 100% cuando fue administrada entre las 32 y 6 horas previas al desafío. Contrariamente, la administración luego del desafío no fue efectiva, mostrando que flagelina no ejerce un efecto terapéutico en esta cepa de ratones.

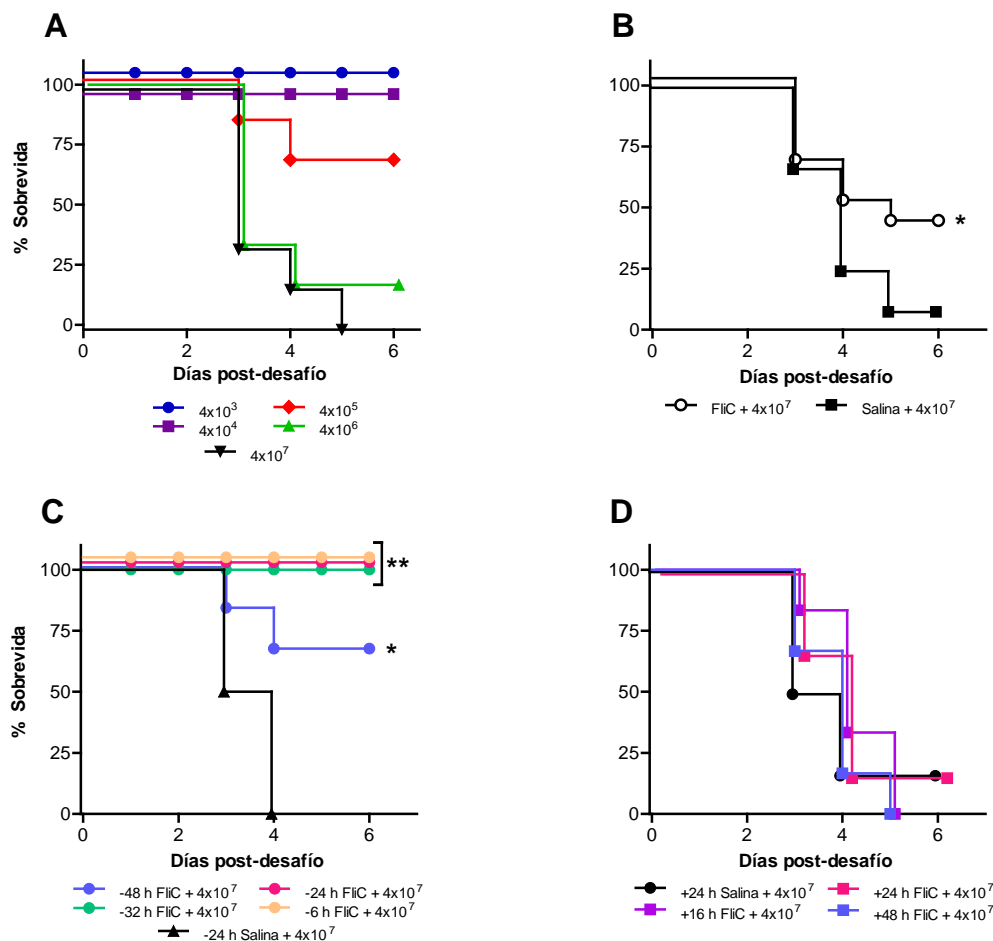


Figura IV.2.6: Evaluación de los efectos profilácticos y terapéuticos de flagelina en la cepa exogámica NMRI. **Panel A:** Ratones NMRI, (n= 6), hembras de 8 semanas de edad fueron anestesiadas con Ketamina-Xilacina i.p. y desafiadas por ruta i.n. con dosis crecientes de *S. pneumoniae* serotipo 1 y monitoreadas diariamente para determinar la susceptibilidad a la infección. **Panel B:** Los animales fueron infectados con la primera dosis 100% letal de serotipo 1 y 1 μ g de flagelina fue administrado por ruta i.n. al momento del desafío (n= 12). **Panel C:** Los efectos profilácticos del tratamiento con FliC se evaluaron administrando 1 μ g por ruta i.n. 48, 32, 24 o 6 horas antes del desafío con la MDL de serotipo 1 (n= 6). **Panel D:** La evaluación del alcance terapéutico se realizó administrando 1 μ g de FliC i.n. luego de establecida la infección a las 16, 24 o 48 horas (n= 6). En todos los casos la sobrevida se monitorió diariamente por 6 días y las curvas de sobrevida fueron comparadas con su respectivo control tratado con solución salina mediante test de Log-rank (Mantel-Cox). Las diferencias significativas se marcan con un asterisco (*) para $p < 0.05$ o dos asteriscos (**) para $p < 0.01$.

Estudio de la capacidad protectora de flagelina durante el desafío con serotipo 3.

La capacidad protectora de flagelina se investigó también frente al desafío con la cepa de serotipo 3 E1434, un serotipo altamente capsulado y más virulento que el serotipo 1 empleado hasta ahora. La protección conferida por coadministración de FliC al momento del desafío fue evaluada en ratones BALB/c expuestos a una dosis infecciosa próxima a la MDL para serotipo 3 (3.75×10^5 UFC) que provocó la muerte del 60% de los animales y a una dosis letal aproximadamente equivalente a 18 MDL (1.8×10^7 UFC) que provocó la muerte del 100% de los animales desafiados. El tratamiento con $1 \mu\text{g}$ de FliC al momento del desafío incrementó la tasa de supervivencia de los animales de 40 al 70% en los animales desafiados con la dosis de 3.75×10^5 UFC y de 0 a 30% para la dosis de 1.8×10^7 UFC de serotipo 3. A pesar del incremento observado, las diferencias no fueron significativas según el análisis estadístico realizado (Figura IV.2.7).

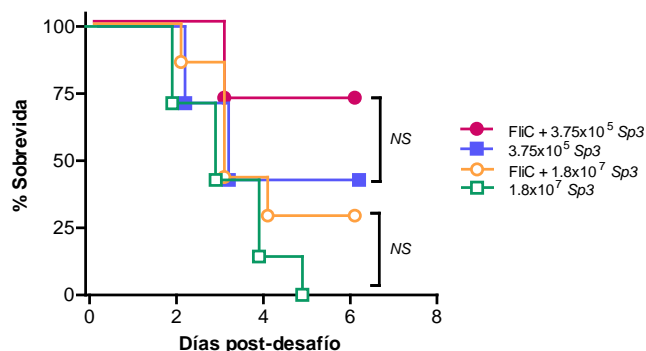


Figura IV.2.7: Evaluación del efecto protector de flagelina frente al desafío con *S. pneumoniae* serotipo 3. Ratones BALB/c de 8 a 10 semanas ($n = 7$) fueron infectados con serotipo 3 3.75×10^5 UFC o 1.8×10^7 UFC. La mitad de los animales fueron tratados con $1 \mu\text{g}$ de FliC al momento del desafío. La supervivencia se monitoreó diariamente por 6 días. Se muestran las curvas de Kaplan-Meier, analizadas mediante test de Log-rank (Mantel-Cox). NS: no significativo. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Protección frente al re-desafío en animales tratados con flagelina durante la primoinfección.

Datos generados en nuestro laboratorio en el marco de la tesis de la Dra. Rial, mostraron que la infección primaria con una dosis subletal es capaz de inducir inmunidad protectora frente al redeseño homólogo cuando se emplea el serotipo 1, pero no cuando las infecciones se realizan con serotipo 3 [69]. Estos antecedentes motivaron que se investigase si el tratamiento i.n. con FliC durante la primoinfección favorecía el desarrollo de protección frente a un desafío letal posterior con el mismo serotipo, en particular en el caso de la infección con serotipo 3.

Para esto, ratones BALB/c fueron desafiados con una dosis letal de serotipo 1 y 3 y tratados con flagelina al momento del desafío. Aquellos animales que sobrevivieron al primer desafío, fueron re-desafiados con una dosis cercana a 50 MDL de serotipo 1 y 20 MDL de serotipo 3 a los 7 días de la infección primaria. La supervivencia fue monitoreada durante 6 días. Como se muestra en la figura IV.2.8, los animales desafiados en primera instancia con serotipo 1 resultaron protegidos frente a la segunda infección causada por el mismo serotipo. Sin embargo, los animales tratados con FliC y que sobrevivieron al desafío primario con serotipo 3 no sobrevivieron al desafío secundario con el mismo

serotipo, sugiriendo que la generación de inmunidad protectora frente al re-desafío homólogo es independiente del tratamiento con FliC y que obedece a particularidades del serotipo y/o cepa bacteriana.

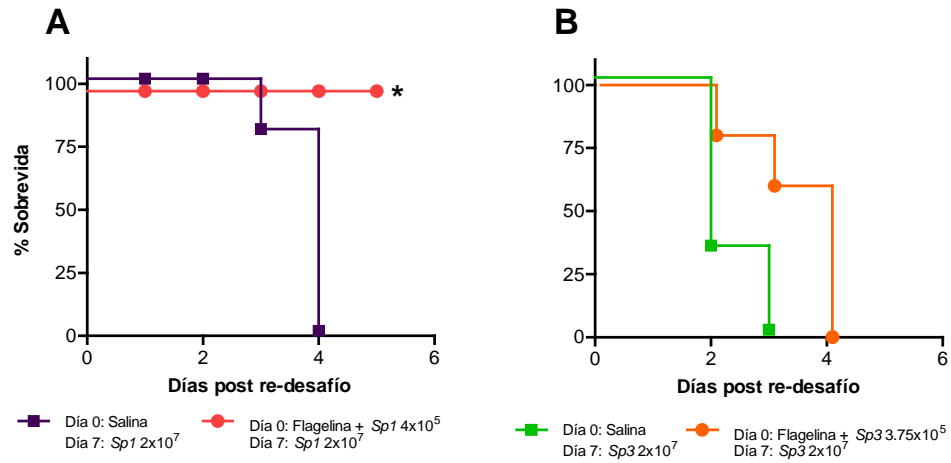


Figura IV.2.8: Redesafío de animales previamente tratados con flagelina durante la infección pulmonar con serotipos 1 y 3. Ratones BALB/c de 8 a 10 semanas (n= 5) fueron infectados con 4×10^5 de serotipo 1 o 3.75×10^5 UFC de serotipo 3 y tratados con $1 \mu\text{g}$ de FliC i.n. al momento del desafío. Siete días después los sobrevivientes fueron redesiados con 2×10^7 UFC de serotipo 1 (A) y 3 (B) respectivamente. La supervivencia se monitoreó diariamente por 6 días. Se muestran las curvas de Kaplan-Meier, analizadas mediante test de Log-rank (Mantel-Cox). Las diferencias significativas para $p < 0.05$ se marcan con un asterisco (*).

IV.2.3. Discusión Sección IV.2.

Históricamente, la profilaxis de las infecciones se ha basado en la inducción de inmunidad específica y duradera mediante la estimulación de respuestas adaptativas. Este tipo de respuesta inmune puede originarse de modo natural por exposición previa a un patógeno dado, o artificialmente, a través de la vacunación. Aunque la inmunidad adaptativa es en general eficaz para evitar la progresión de las infecciones, la misma debe haberse generado antes de que el evento de infección ocurra. En cambio, la estimulación de las defensas innatas permite la activación inmediata de diversos mecanismos microbicidas que, potenciados de forma adecuada, pueden ser suficientes por sí mismos para contener y erradicar infecciones de diversas etiologías para las que no se ha generado inmunidad específica previamente.

La activación de las defensas innatas asociadas al tracto respiratorio se ha reportado como una estrategia eficaz para mejorar la resistencia frente a las infecciones pulmonares en distintos modelos experimentales. Interesantemente, se ha demostrado que los inmunoestimulantes empleados con este fin no deben estar necesariamente relacionados con el patógeno en cuestión y que la estimulación de mecanismos innatos preexistentes además de ser capaces de combatir rápidamente la infección, modifica el entorno local condicionando la respuesta ante eventos de infección posteriores. Se ha visto que la administración intranasal de lisados bacterianos induce una potente respuesta inflamatoria local y sistémica, caracterizada por el aumento de quimioquinas de las familias ELR-CXC y CC, infiltrado neutrofílico y de células dendríticas con un fenotipo activado, además de respuestas humorales a nivel sistémico, con el potencial de combatir infecciones respiratorias de diversas etiologías [140]. Por ejemplo, la administración i.n. de lisados de *Haemophilus influenzae* no tipificable, confiere protección en ratones contra la infección pulmonar posterior con *S. pneumoniae* [209]. De forma similar, la administración i.n. de una molécula purificada, una variante modificada de la toxina sensible al calor de *E. coli*, la LTK63, puede conferir protección contra la infección pulmonar por patógenos no relacionados como el virus respiratorio sincicial, virus influenza y el hongo *Cryptococcus neoformans*, un fenómeno al que se le ha denominado “impronta innata” [105].

Dada la función de intercambio gaseoso de la mucosa respiratoria, cualquier intervención deberá ser selectiva en el sentido de generar un balance entre la inducción de mecanismos antimicrobianos que promuevan la eliminación del patógeno y la supresión de respuestas inflamatorias patológicas que puedan interferir con la función del órgano. Por este motivo, el empleo de agentes inmunoestimulantes bien caracterizados, que operen mediante vías de señalización definidas y estimulen mecanismos de defensa bien identificados es deseable respecto al empleo de lisados complejos y menos caracterizados.

En la última década se han explorado varias terapias que apuntan a la potenciación de la inmunidad innata para el tratamiento de las infecciones; el empleo de agonistas de PRRs y en particular de TLRs, ha mostrado resultados alentadores que han llegado a fase clínica. Sin embargo, al momento

solo el Imiquimod, un agonista sintético de TLR7, ha sido aprobado para el tratamiento de la infección causada por Papiloma virus en humanos [71].

En cuanto a los estudios preclínicos en modelos animales, la evaluación de inmunopotenciadores para el tratamiento de infecciones ha sido intensa en la última década, pero en general su efectividad depende de que sean aplicados previo al inicio de la infección [104,106,149,210-212]. Si bien los datos aportados por estos estudios son muy valiosos y apoyan la eficiencia de la potenciación de las defensas innatas como una vía para combatir las infecciones, el que su eficacia dependa de la aplicación del tratamiento antes de que se establezca la infección hace que su utilidad clínica solo sea relevante en caso de que dicha protección sea de largo plazo.

En este trabajo, se evaluó la capacidad de 7 agonistas de PRRs de impedir el progreso de la neumonía neumocócica invasiva administrados al momento del desafío por ruta intranasal, siendo 5 de ellos agonistas de receptores naturalmente activados por la bacteria (MALP-2, BPPcysMPEG, α -GalCer-MPEG CpG y c-di-GMP) y los 2 restantes agonistas de receptores para los que no existen reportes que los impliquen en la defensa natural contra el neumococo (Poli(I:C), y flagelina).

Los agonistas de TLR2/6, R-MALP-2 y BPPcysMPEG confirieron protección al 60 y 37.5% de los animales respectivamente. Como se mencionó anteriormente en el capítulo de introducción, TLR2 reconoce dos componentes de la pared del neumococo, el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano [54,213,214]. Si bien este receptor es importante en la defensa frente a la meningitis neumocócica [215], su rol durante la neumonía no es tan evidente ya que ratones deficientes en TLR2 muestran susceptibilidad similar ante la infección en comparación con los animales salvajes [216]. Esto podría deberse a que la señalización a través de múltiples receptores innatos por parte de la bacteria permite compensar la carencia de señalización vía TLR2. No obstante, los resultados aquí presentados demuestran que la potenciación de la señalización a través del heterodímero TLR2/6 confiere protección contra el desafío letal. Un hecho que cabe destacar, es que la protección conferida por los dos agonistas de TLR2/6 empleados fue diferente, siendo MALP-2 el más efectivo. Trabajos publicados poco tiempo después de realizados estos experimentos, demostraron que MALP-2 y BPPcysMPEG son potentes activadores de la respuesta inmune cuando son instilados por ruta intranasal. Sin embargo, sus efectos no son totalmente equivalentes. MALP-2 induce el aumento leucocitario en los espacios alveolares, con un importante número de PMNs, alcanzando su máximo a las 24 horas de la instilación, además de provocar un aumento leve a moderado de linfocitos y macrófagos. Esto se acompaña con el incremento en los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL1 β , IL6, TNF α , IL12, las quimioquinas CXCL1, CCL2 y CCL5 y la citoquina antiinflamatoria IL10. Además, la pre-administración de MALP-2 24 horas antes del desafío, previene la progresión de la neumonía neumocócica causada por una cepa de serotipo 3 [211]. En cambio, la administración i.n. de BPPcysMPEG provoca principalmente el aumento de macrófagos en espacios alveolares y en menor medida de PMNs y linfocitos, junto con el incremento en IL12 e IL5 [203], con una magnitud de activación que parece menor a la inducida por MALP-2. En este sentido, podría suponerse que el menor grado de protección conferido por BPPcysMPEG en comparación con MALP-2 cuando fue

coadministrado con *S. pneumoniae* no responde únicamente a que se empleó una menor dosis de BPPcysMPEG, sino a la menor capacidad de activar la respuesta inmune y muy probablemente a la menor capacidad de BPPcysMPEG de reclutar PMN hacia los espacios alveolares, células que son cruciales en la eliminación del neumococo.

La instilación i.n. de otro de los agonistas de un receptor naturalmente activado por neumococo, el TLR9 mediante el tratamiento con CpG (ODN 1826), también indujo importante protección contra la neumonía (60% de protección). La protección observada en este caso es coincidente con la importancia de la señalización vía TLR9 durante las fases más tempranas de la neumonía neumocócica. Tal y como fue demostrado por Albiger y colaboradores empleando un modelo murino de infección intranasal con una cepa serotipo 4, ratones deficientes en TLR9 son más susceptibles a desarrollar neumonía invasiva en comparación con animales salvajes, e incluso en comparación a animales deficientes en TLR1, 2, 4, 6 e ICE (IL1- β converting enzyme) [53]. El estudio sugiere que la señalización por TLR9 está vinculada a la capacidad fagocítica de los macrófagos en las primeras etapas de la infección ya que la fagocitosis del neumococo por este tipo celular se ve afectada por la falta del receptor [53].

El ácido cíclico 3', 5'-diguanílico, c-di-GMP, es el mensajero más ampliamente utilizado por las bacterias y regula una gran diversidad de procesos que abarcan desde la movilidad flagelar hasta el ciclo celular, actuando como un sistema de señalización entre células que permite a las bacterias regular su expresión génica asociada a la densidad celular, fenómeno denominado *quórum sensing* [133]. Este mensajero ha sido descrito en varias especies bacterianas y su presencia se ha sugerido en muchas otras, incluido *S. pneumoniae*, dada la existencia de genes parálogos para las diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas, enzimas implicadas en la síntesis y degradación del c-di-GMP [217]. Recientemente se demostró que c-di-GMP actúa como una señal de peligro desencadenando la respuesta inmune. El receptor STING, un receptor codificado en la línea germinal, sirve como sensor de dinucleótidos cíclicos detectando la presencia de c-di-GMP y otros dinucleótidos de función similar presentes exclusivamente en procariotas y acopla su detección a la producción de IFN de tipo I [61,62]. En el modelo aquí empleado, la administración i.n. de c-di-GMP al momento del desafío con *S. pneumoniae* confirió protección al 50% de los animales. Estos resultados son concordantes con reportes que mostraron que c-di-GMP es un potente inmunoestimulante, útil como adyuvante cuando es administrado tanto por vía subcutánea como intranasal [133,218] y también para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* [206]. Además, la pre-administración de c-di-GMP por ruta i.n. o s.c. fue anteriormente empleada con éxito para conferir protección frente a la infección pulmonar causada por la bacteria gram negativa *Klebsiella pneumoniae* [212]. En ese modelo el tratamiento con c-di-GMP provocó aumento de PMN en pulmones así como de los RNAm de *Ii12p40*, *Iing*, *Cxcl2* e *Ip10* [212].

El TCR semi-invariante $V\alpha 14^+-\beta$ ha sido descrito recientemente como un receptor para los lípidos ricos en diacilglicerol de *S. pneumoniae* [219], por lo que los ligandos de CD1d reconocidos por el TCR semi-invariante pueden ser considerados como agonistas homólogos. Empleando α -

galactosilceramida para el tratamiento de la neumonía, se encontraron resultados en parte contradictorios. Si bien la variante PEGilada administrada al momento del desafío con neumococo retrasó la muerte de los animales respecto del grupo no tratado, no logró evitar la muerte de los mismos. Contrariamente, α -galactosilceramida no PEGilada indujo un importante aumento de la sobrevivencia de ratones infectados con la misma cepa de neumococo cuando fue pre-administrada 24 horas antes del desafío tal y como se mostró en el artículo de Ivanov y colaboradores asociado a esta tesis [149]. Si bien el tiempo de administración del tratamiento intranasal podría estar influyendo en el grado de protección conferido frente a la neumonía, las diferencias de los complejos CD1d-glicolípido formados por α -GalCer o la variante PEGilada y su capacidad de interactuar y señalizar vía el TCR semi-invariante $V\alpha 14^+ \beta$ podrían también afectar el tipo de respuesta inmune inducida por el tratamiento. El sitio antigénico de las moléculas de CD1d está compuesto por canales que acomodan los glicolípidos permitiendo que se forme el complejo CD1d-glicolípido. La naturaleza del glicolípido afecta la estabilidad del complejo formado determinando la dinámica de la sinapsis inmunológica y la intensidad de la estimulación de las células iNKT. En última instancia, la estabilidad del complejo modula la activación celular y las citoquinas producidas por estas células [220]. La variante PEGilada de α -GalCer ha mostrado ser un potente adyuvante en un modelo de administración intranasal, incluso más potente que la variante no PEGilada. Sin embargo, el perfil de la respuesta inducida por α -GalCer-MPEG muestra un perfil Th2, con una pobre respuesta de $IFN\gamma$, IL2 y $TNF\alpha$ en comparación a α -GalCer. Adicionalmente, α -GalCer-MPEG induce un incremento de IL10 mayor al encontrado con α -GalCer [134]. En contraste a lo observado para la variante nativa de α -GalCer, la variante PEGilada inhibe el desarrollo de respuestas Th17 *in vitro* e *in vivo* [221]. La interleuquina 17 y la respuesta Th17 han sido vinculadas a la protección frente a la infección por neumococo, tanto en el contexto de colonización como de neumonía [68,150,152,222,223]. Se ha observado que la administración de tratamientos que interfieren en el desarrollo de dicha respuesta, como por ejemplo el uso de morfina, aumenta la susceptibilidad a la infección por neumococo [183]. Del mismo modo, la inhibición de la respuesta Th17 por parte de α -GalCer-MPEG podría estar asociada a la falta de protección. Si bien cabe suponer que las diferencias en el perfil de las respuestas inmunes inducidas por las dos variantes de α -GalCer empleadas son la razón de las diferencias vistas en la protección, una comparación simultánea en la misma cepa de ratones y empleando el mismo tiempo de administración de los dos compuestos sería apropiada para confirmarlo.

En cuanto a la estimulación de las vías no naturalmente activadas por neumococo, el panorama fue más diverso abarcando de 0 a 100% de protección. Poli(I:C), agonista de TLR3 fue incapaz de inducir protección contra el desafío y pareció contribuir en la muerte acelerada de los animales. Este resultado resulta coherente con un trabajo recientemente publicado en el que se demostró que, análogamente a lo que sucede con muchas infecciones virales, la exposición del tracto respiratorio bajo a Poli(I:C) aumenta la susceptibilidad de ratones frente a la infección intranasal con neumococo. El aumento de susceptibilidad en este modelo se asoció a la producción de IFN de tipo I, dado que animales *Ifnar^{-/-}* o depletados con anticuerpos bloqueantes para IFNAR, mostraron capacidad

mejorada de combatir la infección [90]. Adicionalmente, Poli(I:C) se ha vinculado a la sobreexpresión de PAF-R en cultivos de una línea de células faríngeas humanas [224]. El receptor PAF-R está implicado en la adhesión de *S. pneumoniae* al epitelio [225] y por lo tanto a la capacidad de la bacteria de ganar acceso desde el tracto nasofaríngeo hacia el medio interno u otras mucosas. Esta evidencia sugiere que la activación de TLR3 previo a un evento de infección neumocócica o durante el mismo, actúa a favor de la capacidad invasiva de la bacteria durante la colonización y en detrimento de las defensas durante la infección del tracto respiratorio bajo. En vista de los resultados de la literatura y los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que la administración mucosa de agonistas de TLR3 no es una opción para el tratamiento o prevención de la neumonía neumocócica.

Flagelina, fue el agonista que confirió la mayor protección y mereció un análisis más profundo. El efecto protector se observó tanto cuando la flagelina fue administrada previo, durante o después del desafío con *S. pneumoniae*, mostrando ser eficaz como agente profiláctico o terapéutico. Al momento del desafío FliC indujo la eliminación casi total de las bacterias en los pulmones y evitó la diseminación sistémica de la infección; el tratamiento post-desafío también redujo considerablemente la carga bacteriana en pulmones y bazo promoviendo la supervivencia de los animales. Adicionalmente, flagelina fue capaz de inducir un aumento en la tasa de supervivencia de animales desafiados con una dosis infectiva 10 veces mayor que la mínima dosis letal de serotipo 1, efecto que aparentemente depende del aumento en la dosis de FliC.

El efecto protector se observó también en cepas de ratones diferentes, demostrando que el mecanismo subyacente a la protección opera más allá del genotipo de los animales. Cabe destacar que además de observarse protección frente a las cepas endogámicas BALB/c y C57/BL6, la protección también se observó en la cepa exocriada NMRI. La protección en C57/BL6y NMRI solo fue significativa cuando el FliC se administró antes del desafío, hecho quizás relacionado a que ambas cepas requieren de dosis infectivas mayores que BALB/c para alcanzar la MDL y que fueron por tanto desafiadas con dosis infectivas mayores requiriendo la preactivación de las defensas innatas para evidenciar un grado de protección significativo respecto de los animales no tratados. Dado que mayores dosis de FliC se necesitaron para inducir protección en BALB/c desafiados con dosis infectivas mayores, una alternativa para mejorar la efectividad del tratamiento durante la infección en las cepas C57/BL6 y NMRI, sería aumentando la dosis de FliC empleada en estas cepas de ratones.

Aunque en menor medida que para serotipo 1, flagelina también confirió protección frente al desafío letal con serotipo 3, resultado que sugirió los hechos más adelante confirmados, acerca de un mecanismo de protección que depende de las defensas innatas que a diferencia de los anticuerpos, es eficaz independientemente del tipo capsular de neumococo. La protección brindada por la instilación intranasal de flagelina demostró ser útil no solo para tratar la infección por diferentes serotipos de neumococo, sino que también fue empleada para conferir protección frente a otros patógenos no relacionados. Trabajos publicados posteriormente a esta investigación, mostraron que

el tratamiento intranasal con flagelina confiere protección frente a la infección pulmonar con *Pseudomonas aeruginosa* [107] y *Burkholderia cepacia* [226], requiriéndose en ambos participación de componentes innatos del sistema inmune. Interesantemente, las flagelinas empleadas en este trabajo y en los trabajos de Zgair *et al.* y Yu *et al.* fueron aisladas de diferentes microorganismos, lo que sugiere que la capacidad protectora observada no es exclusiva de la flagelina de *S. Typhimurium*.

Como último punto en este capítulo, se planteó evaluar los potenciales beneficios del tratamiento con FliC frente a una eventual reinfección con neumococo. Al presente existen pocos datos sobre la frecuencia de reinfección en pacientes que hayan experimentado previamente neumonía neumocócica y se desconoce si las mismas ocurren debido al mismo serotipo o serotipos no relacionados. Es sabido que algunas condiciones clínicas como deficiencias en el sistema de complemento, ausencia de bazo funcional, hipogamaglobulinemia, anemia falciforme, COPD y condiciones de inmunodepresión como VIH, quimioterapia, entre otras, predisponen a la recurrencia de la enfermedad neumocócica particularmente en sus manifestaciones invasivas. No obstante, si estas condiciones están ausentes la recurrencia de episodios invasivos es poco frecuente, aunque puede ocurrir [227-230]. Sea el caso de la reinfección en pacientes con condiciones predisponentes o no, sería deseable que la terapia empleada para tratar el primer evento de infección pudiese promover la protección frente a nuevos enfrentamientos al mismo patógeno. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que la exposición de ratones a un desafío i.n. subletal con serotipo 1 genera 100% de protección frente a un segundo desafío i.n. con una dosis equivalente a 20 MDL del mismo serotipo [68,69]. Sin embargo, la protección frente al redesafío homólogo no puede generalizarse para todos los serotipos, ya que el 100% de los animales expuestos a una dosis subletal de serotipo 3 y redesafiados con una dosis letal de la misma cepa mueren [69].

Dado que flagelina se ha reportado como un potente adyuvante frente a diferentes antígenos cuando es administrada por diversas rutas incluida la ruta i.n. [231-235], resultó interesante investigar si el tratamiento con FliC durante la primera exposición a la bacteria podía potenciar el desarrollo de inmunidad a largo plazo y revertir la falta de protección observada frente al redesafío con serotipo 3. Sin embargo, los resultados no confirmaron esta hipótesis observándose la muerte del 100% de los animales redesafiados con serotipo 3 que habían sobrevivido al primer desafío gracias al tratamiento con FliC.

En este punto cabe desatacar que, si bien las respuestas inmunes dirigidas contra antígenos proteicos pueden conferir protección frente al neumococo, la respuesta humoral contra el polisacárido capsular es fundamental en la protección a largo plazo. No obstante, la naturaleza T-independiente de estos antígenos dificulta la generación de inmunidad humoral y memoria inmunológica. El polisacárido 1 es una excepción dentro de los polisacáridos capsulares hasta ahora descritos para neumococo, ya que su naturaleza zwitteriónica le permite ser presentado en contexto MHC-II y ser reconocido por el receptor T de linfocitos CD4, comportándose como un antígeno T-dependiente [236,237].

Flagelina ha mostrado ser un potente adyuvante capaz de favorecer la generación de respuestas humorales a nivel local y sistémico, sin embargo las investigaciones se han conducido mayoritariamente empleando antígenos T-dependientes (en su mayoría proteicos o microorganismos no capsulados) (revisado en [238]), por lo que podría suponerse que la capacidad adyuvante de FlIC tiene un efecto pobre, sino nulo para con antígenos T-independientes. La realización de experimentos adicionales con otras cepas invasivas de diferentes serotipos sería necesaria para poder profundizar en este tema.

IV.3. Bases celulares y moleculares de la protección mediada por flagelina frente a la neumonía neumocócica.

El pulmón es un órgano de alta complejidad cuya función esencial es el intercambio gaseoso. Esto hace que esté en contacto directo y constante con el medio externo a través del aire ambiental y determina que la mucosa pulmonar esté permanentemente expuesta a una gran variedad de antígenos exógenos y agentes infecciosos. Al mismo tiempo, el pulmón se encuentra conectado con el medio interno a través de una extensa cama vascular, lo que hace que cualquier agente invasor pueda desde allí ganar acceso al torrente sanguíneo [23]. Por esto, la mucosa respiratoria cuenta con un amplio sistema de defensa constituido por células estructurales y mieloides residentes, que conforman una barrera mecánica y producen factores químicos antimicrobianos. Entre las células mieloides residentes se destaca la presencia de los macrófagos alveolares, células altamente especializadas en la fagocitosis que residen en los espacios terminales de las vías aéreas. Los macrófagos alveolares tienen como principal cometido la eliminación de agentes externos y son células cruciales en el inicio de la respuesta inflamatoria. Junto con las células epiteliales, participan del reconocimiento de los agentes externos y contribuyen en la defensa a través de la secreción de citoquinas [29,30,239-243].

La inflamación excesiva interfiere con la función de intercambio gaseoso y por tanto el inicio de la respuesta inflamatoria está sometido a un control permanente y estricto [23,26]. La eliminación de bajas cargas microbianas ocurre en ausencia de inflamación y de reclutamiento de células de la periferia. En el caso de la neumonía neumocócica, los macrófagos alveolares fagocitan bajas cargas de bacterias sin liberar citoquinas proinflamatorias [29,30,240]. Cuando la capacidad fagocítica de los macrófagos se ve superada por el incremento en el número de microorganismos, estas células comienzan a secretar $TNF\alpha$, citoquina que a su vez promueve la síntesis de otros factores proinflamatorios y orquesta el reclutamiento de nuevos fagocitos desde la periferia. Otros factores producidos por el propio neumococo como los péptidos formilados, potencian el reclutamiento leucocitario en conjunto con los producidos por el hospedero [38,39].

Aunque los neutrófilos son fundamentales en la defensa contra neumococo [41], la acumulación y/o activación excesiva de células inflamatorias en los alvéolos puede desencadenar un síndrome de dificultad respiratoria aguda con efectos tanto o más negativos que la presencia del propio patógeno (revisado en [26,40]). Por lo tanto, la patología desencadenada durante la neumonía no dependerá únicamente de los factores de virulencia de la bacteria, sino que estará también determinada por la capacidad del hospedero de autolimitar la inflamación.

En el capítulo anterior se demostró que la administración intranasal de diferentes agonistas de receptores innatos, en particular flagelina, promueven la supervivencia de ratones frente a la neumonía neumocócica invasiva. Como ya se mencionó en el capítulo de *Introducción*, flagelina es reconocida por al menos 3 receptores innatos, TLR5 [94], NLRC4 [244] y NAIP5 [98,99], y tiene capacidad de promover respuestas inflamatorias de importante magnitud a nivel local y sistémico. En particular se ha demostrado que la instilación de flagelina en los pulmones provoca una intensa respuesta inflamatoria, caracterizada por el reclutamiento de PMN hacia los alvéolos [101]. La mayor supervivencia de los animales infectados con neumococo frente al tratamiento con flagelina, resulta a priori paradójica si se razona que el tratamiento estaría exacerbando la inflamación pulmonar desencadenada por la presencia de la bacteria.

Con el objetivo de comprender esta aparente contradicción, se procedió a investigar las bases moleculares y celulares de la protección inducida por FliC. A lo largo del capítulo se presentan los resultados del análisis de la respuesta transcripcional en pulmones tras el tratamiento con flagelina. Con el fin de determinar si existen efectos inflamatorios sinérgicos entre el agente patógeno y el agente terapéutico, se comparó el perfil transcripcional frente al tratamiento con FliC en animales vírgenes y en animales desafiados con neumococo. Además se estudió el impacto del tratamiento sobre las poblaciones celulares residentes y reclutadas hacia los espacios alveolares, analizándose también la histopatología provocada por la infección y la infección combinada con el tratamiento. Por otra parte se investigó el rol de los neutrófilos, linfocitos B, T y anticuerpos en la protección mediada por flagelina. Por último, se investigó la importancia de la señalización a través de los receptores TLR5 o NLRC4 en la protección y el posible rol de las quimioquinas de la familia ELR-CXC, reclutadoras de neutrófilos, en la protección frente a neumococo.

IV.3.1. Cambios en el perfil transcripcional de pulmones inducidos por la administración intranasal de flagelina durante la neumonía neumocócica.

El primer paso en el estudio de las bases moleculares de la protección inducida por el tratamiento i.n. con flagelina, fue el análisis del perfil transcripcional en pulmones de ratones BALB/c a las 24 horas del desafío con serotipo 1 en presencia o ausencia del tratamiento con FliC (*Figura IV.3.1*).

Al comparar el perfil transcripcional entre los animales infectados y los tratados con FliC durante la infección, se destacó el importante incremento de los mensajeros de las quimioquinas *Cxcl1*, *Cxcl2* y *Ccl20*, en los animales tratados con FliC (*Figura IV.3.1, paneles A-C*). Los mensajeros de *Ly6g*, una proteína de anclaje a glicofosfatidilinositol que interviene en la modulación de la migración de neutrófilos [245], también se vieron incrementados tras el tratamiento con FliC (*Figura IV.3.1 D*).

Similarmente, los mensajeros de los genes codificantes para las citoquinas proinflamatorias *Tnfa* e *Il1b*, aumentaron en animales tratados con FliC respecto de aquéllos que solo fueron desafiados (*Figura IV.3.1, paneles F y G*). Cabe destacar que para todos estos mensajeros, el tratamiento con FliC sola fue suficiente para inducir el aumento en los niveles de RNAm sin que se observara un aumento adicional cuando fue administrada en presencia del inóculo bacteriano. Esto sugiere que los efectos observados se deben únicamente al tratamiento y no a efectos aditivos por la administración conjunta de la bacteria y el agonista de TLR5/NLRC4-NAIP5.

Los mensajeros de las citoquinas proinflamatorias *Il6*, *Il17a* y el receptor polimérico de inmunoglobulinas *PigR* también se vieron incrementados significativamente pero solo en los animales desafiados y tratados con FliC; no se observaron diferencias significativas en los que solo recibieron FliC en ausencia del desafío (*Figura IV.3.1, paneles E, J y M*), sugiriendo que el efecto de la infección con neumococo y la administración de flagelina son acumulativos sobre la inducción de estos tres genes.

Los mensajeros de *Il4*, *Il23* y *Tlr5* e *Igj* no mostraron cambios significativos en los animales tratados con FliC respecto a los animales infectados con *S. pneumoniae* al tiempo analizado.

En suma, la administración de FliC se asoció con incrementos de mensajeros de genes típicamente expresados durante la respuesta inflamatoria. Adicionalmente, el tratamiento con flagelina durante el curso de una infección con neumococo exacerbó el aumento de los mensajeros de genes de quimioquinas vinculadas al reclutamiento neutrofílico así como aumento en del mensajero de *Ly6g*, un marcador expresado en altos niveles por estas células, lo que sugiere que las mismas podían estar implicadas en la protección. Por último, cabe también destacar el incremento observado en los mensajeros codificantes del Receptor Polimérico de Inmunoglobulinas pIgR. Este receptor se induce frente al daño, en presencia de citoquinas proinflamatorias como $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ [246] y media el transporte de IgA y en menor medida IgM a través del epitelio hacia las superficies mucosas que cumplen un importante rol en la neutralización de patógenos que alcanzan el tracto respiratorio y otras mucosas.

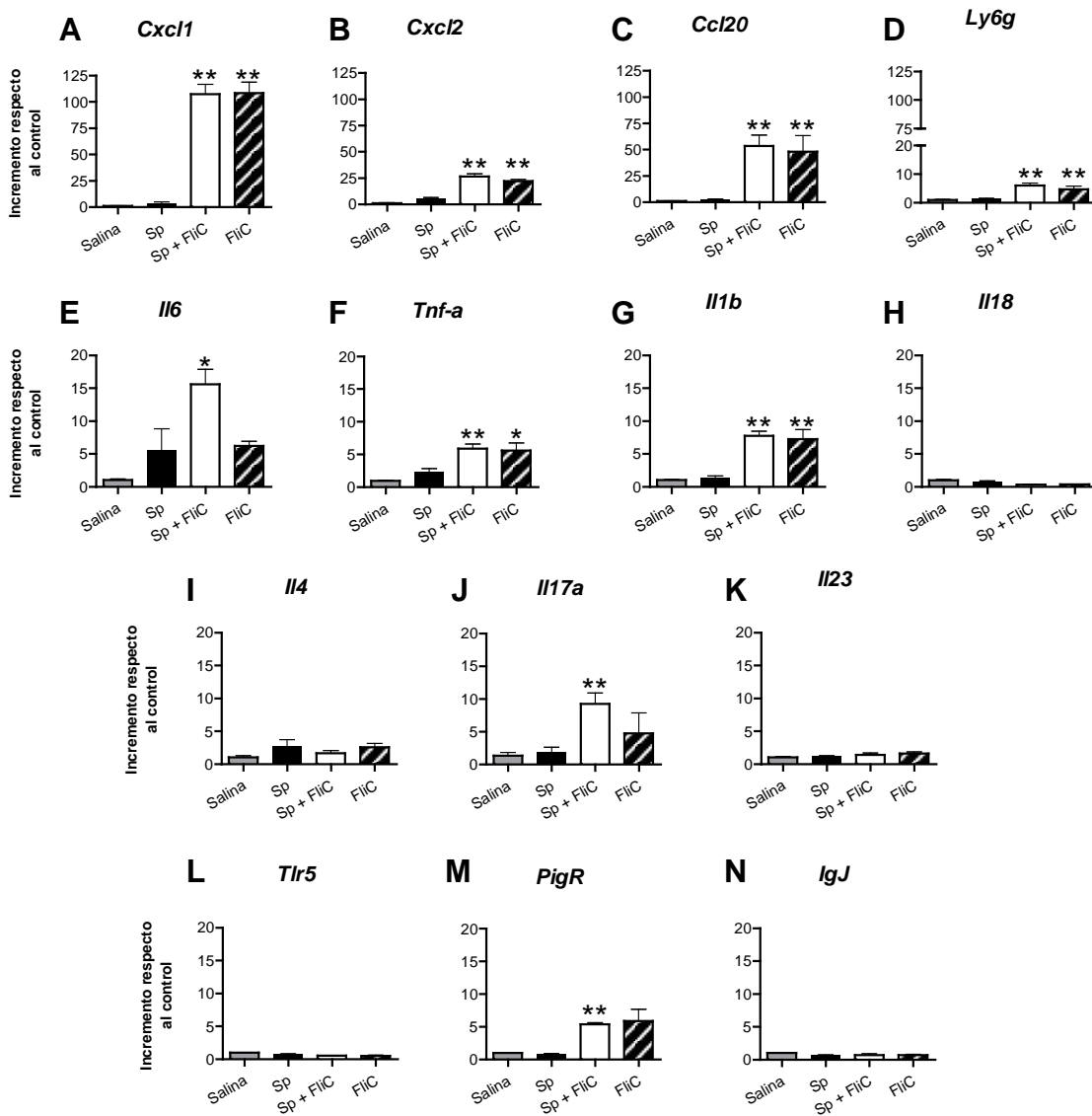


Figura IV.3.1: Cambios inducidos por el tratamiento i.n. con flagelina en el perfil transcripcional en pulmones. Hembras BALB/c de 8-10 semanas de edad fueron infectadas por ruta i.n. con la MDL de serotipo 1 y tratadas simultáneamente con 1 μ g de flagelina, o salina como control. A las 24 horas se extrajeron los pulmones para realizar extracción de mensajeros totales. El nivel relativo de RNAm para cada gen fue normalizado empleando como gen de referencia al β -actina. Los resultados se expresan como cantidad de los RNAm normalizados relativa al grupo control (salina). Las barras representan la media \pm SEM (n=5). Dos asteriscos (**) indican diferencias significativas para $p < 0.01$ y un asterisco (*) diferencias as $p < 0.05$ determinadas mediante test de Mann-Whitney de una vía.

IV.3.2. Impacto del tratamiento local con flagelina sobre las poblaciones celulares residentes en el pulmón y reclutadas desde la periferia.

Cambios en las poblaciones celulares a nivel de pulmones.

El perfil transcripcional sugiere la activación de mecanismos de reclutamiento leucocitarios, principalmente de neutrófilos, en aquellos animales tratados con flagelina. Para confirmarlo, se comparó el perfil de las poblaciones celulares en tejido pulmonar y contenido alveolar en animales infectados frente a animales infectados y tratados con flagelina.

Primeramente, se determinó el número total de células en el parénquima pulmonar 24 horas después de haber recibido el desafío o desafío y tratamiento. El contenido alveolar fue removido mediante lavado broncoalveolar y el número total de células viables en el parénquima pulmonar se determinó en suspensiones celulares mediante tinción con un colorante vital y conteo automático en hemocitómetro. El *panel A* de la *Figura IV.3.2* muestra que la coadministración de flagelina al momento del desafío provocó un aumento, aunque no significativo, en el número total de células pulmonares respecto a los animales que solo recibieron neumococo. Cuando las diferencias se analizaron respecto al grupo control, este aumento sí fue significativo únicamente para el grupo tratado con FliC.

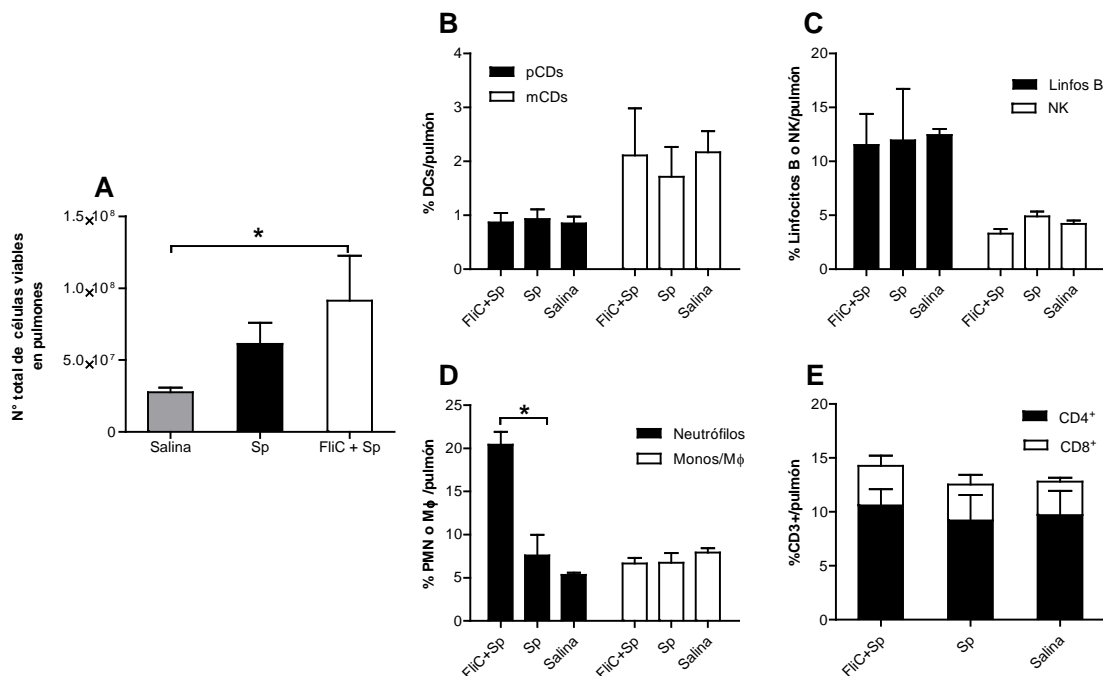


Figura IV.3.2: Efecto del tratamiento i.n. con flagelina sobre las poblaciones celulares en pulmones durante la infección con *Streptococcus pneumoniae*. Ratones BALB/c, de 8 semanas de edad, infectados con 4×10^5 UFC de *S. pneumoniae* o infectados y tratados con 1 μ g de flagelina por ruta i.n. fueron sacrificados a las 24 h, recuperándose los pulmones. Previo a la disgregación del tejido se separó el contenido alveolar mediante lavado. Las suspensiones celulares preparadas a partir del parénquima pulmonar se tiñeron empleando anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos contra marcadores de superficie y se analizaron por citometría de flujo. **Panel A:** Se determinó el número total de células en pulmones mediante recuento de viables con tinción de azul de trypan. **Panel B:** Células dendríticas plasmacitoides, pCDs, definidas como CD11c^{int-bajo}; CD11b^{neg}; IA^{int}; células dendríticas mieloides, mCDs, definidas como CD11c^{alto}; CD11b^{alto}; IA^{alto}. **Panel C:** Células B y NK definidas como CD19^{pos}; CD49b^{neg} y CD19^{neg}; CD49b^{pos} respectivamente. **Panel D:** Neutrófilos, definidos como Ly6G^{alto}; F4/80^{neg} y monocitos/macrófagos (Mφ) definidos como Ly6G^{neg}; CD11c^{pos}; F4/80^{pos}. **Panel E:** Linfocitos T-CD4 definidos como CD3^{pos}; CD4^{pos}; CD8^{neg} y linfocitos T-CD8 definidos como CD3^{pos}; CD4^{neg}; CD8^{pos}. Los resultados se muestran como media \pm SEM (n=6 panel A, n=3 paneles B-E). Las diferencias significativas para $p < 0.05$ se marcan con un asterisco, calculadas mediante ANOVA de una vía para el panel A y test de Mann-Whitney panel D.

Seguidamente, se analizaron las diferentes poblaciones celulares para determinar cuáles contribuían mayoritariamente al aumento observado. Empleando marcadores de superficie se definieron 8 tipos celulares según las combinaciones detalladas en la *Figura IV.3.2*: células dendríticas plasmacitoides, células dendríticas mieloides, linfocitos B, células NK, macrófagos, neutrófilos y linfocitos T colaboradores y citotóxicos. De todas las poblaciones estudiadas, únicamente los neutrófilos mostraron un incremento porcentual significativo (20.4%) en el grupo tratado respecto al grupo de animales infectados (7.6%) (*Figura IV.3.2 panel D*), resultado concordante con el perfil de expresión génica observado para este grupo de animales.

Cambios en las poblaciones celulares a nivel de lavado broncoalveolar.

Tanto la infección por neumococo como el tratamiento con flagelina promovieron el reclutamiento de neutrófilos hacia los espacios alveolares, encontrándose un mayor número de células en los ratones tratados con FliC. Como se mencionó anteriormente, aunque los neutrófilos son necesarios para la protección contra neumococo, también están implicados en el daño tisular, y el reclutamiento y permanencia excesiva de estas células en las vías aéreas puede provocar complicaciones a respiratorias. Por lo tanto, se procedió a estudiar la dinámica del reclutamiento de estas células hacia las vías aéreas en el tiempo. Adicionalmente, se estudió la dinámica de los macrófagos alveolares, células claves en la defensa frente a la neumonía neumocócica. Con este fin, se tomaron muestras de lavado broncoalveolar de animales infectados con serotipo 1 tratados, o no, con flagelina, o animales que recibieron salina como control. Las muestras se obtuvieron a las 16, 24 o 40 horas post-desafío y las células recuperadas fueron analizadas por citometría de flujo. El análisis mostró que el tratamiento con flagelina indujo un rápido influjo de PMN hacia los espacios alveolares, que ya a las 16 horas superó significativamente el número de neutrófilos reclutados en los animales que solo recibieron el desafío letal. El incremento de los neutrófilos fue transitorio, volviendo a valores relativamente bajos a las 40 horas de recibido el tratamiento (*Figura IV.3.3 panel B*).

En cuanto a los macrófagos alveolares, aunque no se encontraron diferencias significativas en el número total de estas células entre el grupo infectado y tratado con FliC y el infectado, si se observó una disminución significativa en los ratones infectados respecto a los tratados con salina. Los animales tratados con FliC durante la infección mostraron un número significativamente menor de macrófagos alveolares en comparación a los vírgenes a las 24 y 40 horas post-desafío, mientras que los que solo fueron desafiados mostraron una diferencia significativa recién a las 40 horas (*Figura IV.3.3 panel A*).

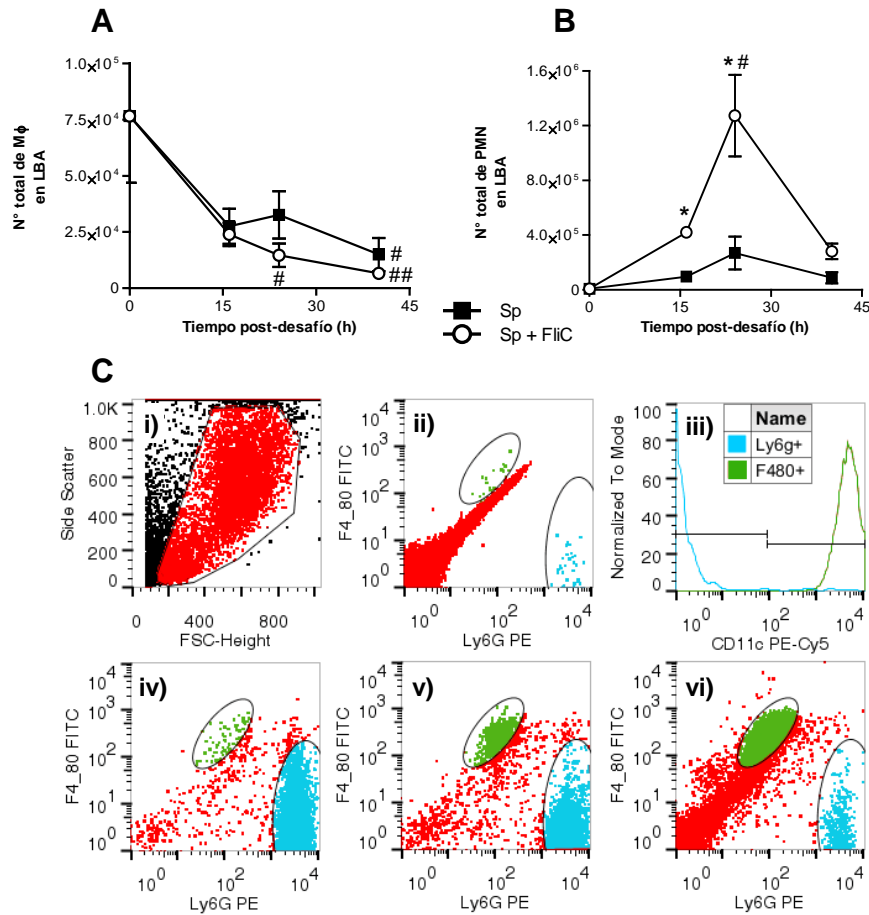


Figura IV.3.3: Poblaciones celulares en LBA tras co-tratamiento i.n. con FliC en la infección con *Streptococcus pneumoniae*. Ratones BALB/c, de 8-10 semanas de edad, fueron infectados con 4×10^5 UFC de *S. pneumoniae* o infectados y tratados con $1 \mu\text{g}$ de flagelina por ruta i.n.. A las 24 h se realizó el lavado broncoalveolar y las poblaciones celulares se analizaron por citometría de flujo empleando anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos para marcadores de superficie. **Panel A:** Evolución del número de macrófagos alveolares. Los macrófagos se definieron en base a su FSC-SSC y el siguiente patrón de expresión para los marcadores de superficie: Ly6G^{neg}, F4/80^{pos}, CD11c^{alto}. **Panel B:** Evolución del número total de neutrófilos en LBA, definidos como Ly6G^{alto}, F4/80^{neg}, CD11c^{neg}, FSC-SSC. Los resultados se muestran como media \pm SEM (n=3). La comparación a cada punto temporal entre los grupos Sp y Sp+FliC se realizó mediante test de Mann-Whitney, las diferencias significativas para $p < 0.05$ y $p < 0.01$ entre estos grupos se marcan con uno y dos asteriscos respectivamente. La comparación de los niveles de macrófagos o PMN a en todos los puntos temporales con respecto al control se realizaron mediante test de ANOVA y se indican con el símbolo numeral (#) las diferencias significativas. **Panel C:** Gráficos representativos del análisis de citometría de flujo. Se muestra i) perfil de tamaño y granularidad (FSC-SSC) del LBA; gráfico de puntos Ly6G-PE; F4/80-FITC para ii) LBA sin teñir, iii) histograma de análisis de la expresión de CD11c en células positivas para Ly6G o F4/80; iv) LBA de un animal virgen; v) LBA de un animal infectado, iv) LBA de un animal tratado con FliC durante el desafío.

Posteriormente se evaluó el daño pulmonar en el curso de la infección en presencia o ausencia de tratamiento con FliC y en ratones que recibieron solo FliC, mediante el análisis histológico de secciones de pulmón, 1 o 7 días después de la infección.

Los hallazgos del estudio citométrico se confirmaron mediante el análisis histológico. Como se muestra en la *Figura IV.3.4*, el edema y reclutamiento de células inflamatorias fue evidente a las 24 horas en las regiones peribronquiales y perivasculares en cortes obtenidos de animales tratados con flagelina sola (*panel E*) o administrada en conjunto con el desafío bacteriano (*panel B*). Los animales infectados que no recibieron tratamiento evaluados en el mismo punto temporal mostraron menor infiltrado de células inflamatorias y edema (*panel D*). Sin embargo, mientras que los animales no tratados murieron entre el tercer y cuarto día después del desafío, el análisis de los pulmones de los ratones que sobrevivieron gracias al tratamiento con FliC, realizado 7 días post-desafío, reveló la resolución total de la inflamación. Esto sugiere que a pesar del intenso reclutamiento celular, el tratamiento con FliC no generó compromiso tisular a largo plazo (*panel C*).

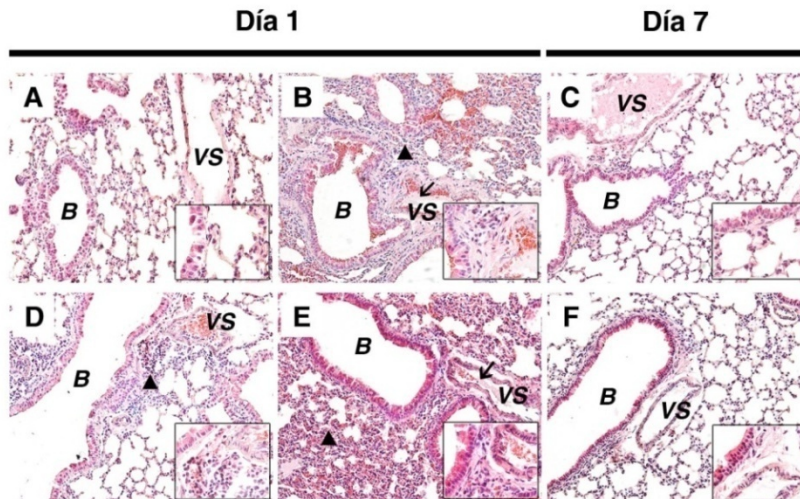


Figura IV.3.4: Análisis histológico de pulmones luego del desafío con serotipo 1 o desafío y tratamiento con flagelina. Los pulmones fueron obtenidos 1 o 7 días luego de la instilación i.n. de (A, F) solución salina, (D) 4×10^5 UFC de *S. pneumoniae* serotipo 1, (B, C) *S. pneumoniae* más $1 \mu\text{g}$ de flagelina o (E) flagelina sola. Cortes parafinados de $5 \mu\text{m}$ fueron teñidos con hematoxilina-eosina y analizados al microscopio óptico a doble ciego. B: bronquiolo; VS: vaso sanguíneo; flecha: edema; punta de flecha: infiltrado celular. Magnificación total $\times 200$ para todos los paneles y $\times 1000$ para los paneles insertos. Las imágenes son representativas de secciones examinadas para 3 ratones por grupo.

Habiéndose observado anteriormente que la administración intranasal de flagelina también confiere protección cuando se administra luego de establecida la infección, se investigó si en esta situación el perfil de la cinética de reclutamiento de PMN era similar al observado durante la coadministración. En este caso los animales recibieron la dosis de flagelina i.n. 24 horas después del desafío y el análisis del contenido alveolar se realizó a las 24 horas del tratamiento (48 horas del desafío) (Figura IV.3.5). Igual que como se observó durante la coadministración de flagelina, la administración terapéutica indujo un rápido reclutamiento cuyo máximo nuevamente se produjo a las 24 horas de la administración de FlC. Nuevamente, la disminución del número de PMN en LBA fue rápida, alcanzando valores comparables a los de un animal virgen a día 7.

La rápida disminución de los neutrófilos reclutados a los espacios alveolares y la resolución de la inflamación observada en los animales tratados con flagelina, motivó que se realizara un nuevo análisis del perfil transcripcional en pulmones, teniendo ahora como foco principal mensajeros de genes asociados al control de la respuesta inflamatoria.

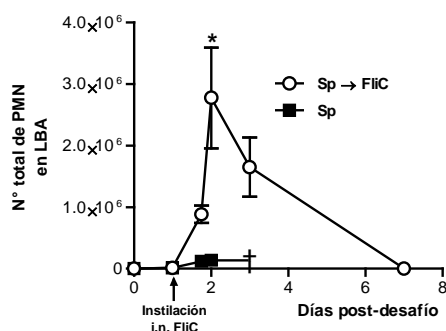


Figura IV.3.5: Cinética del reclutamiento de neutrófilos en LBA tras administración de FlC i.n. 24 h post-desafío. Ratones BALB/c fueron desafiados con la MDL de serotipo 1 por ruta i.n. y 24 h después un grupo recibió $1 \mu\text{g}$ de FlC por la misma vía. A las 48 h del desafío los animales fueron sacrificados y el contenido del lavado broncoalveolar se analizó por FACS identificándose los neutrófilos como células Ly6G^{alt} ; $\text{F4/80}^{\text{neg}}$, $\text{CD11c}^{\text{neg}}$, y por el patrón de FSC-SSC. Los resultados se muestran como media \pm SEM (n=3). Las diferencias significativas para $p < 0.05$ se marcan con un asterisco (*), calculadas mediante test de Mann-Whitney.

En el pulmón existen mecanismos constitutivamente activos que suprimen la respuesta inflamatoria, principalmente mediados por las citoquinas TGF- β [37] e IL10, producidas por macrófagos alveolares y células epiteliales [26,247,248]. Los altos niveles de IL10 y TGF- β en las vías aéreas son importantes para suprimir las respuestas inflamatorias ante la captación de antígenos por parte de los macrófagos alveolares, evitando el reclutamiento de células dendríticas y las respuestas T inflamatorias [26,32,249,250]. Además de los mecanismos antiinflamatorios constitutivos, en el pulmón existen mecanismos de regulación inducibles tanto frente a episodios de inflamación aguda como crónica. Tanto la inducción de IL10 [251,252] como el reclutamiento de células T reguladoras (revisado en [26]) se ha observado frente a infecciones bacterianas de distinta etiología en el tracto respiratorio. Sin embargo, de acuerdo al análisis transcripcional presentado en el *Capítulo IV.1* (Figuras IV.1.6 y IV.1.7), la infección causada por la MDL de *S. pneumoniae* serotipo 1 no provocó aumento en los mensajeros de *Il10*, *Foxp3* o *Tgfb* a tiempos tempranos o a las 24 horas de establecida la infección.

Se procedió entonces a evaluar si flagelina era capaz de provocar el aumento de estos mensajeros en el pulmón cuando era administrada por ruta i.n. sola o junto con el desafío.

Los mensajeros de *Tgfb* no mostraron cambios frente al tratamiento con FliC (Figura IV.3.6 B). Sin embargo, otros mecanismos como la regulación por ARN de interferencia (revisado en [253]) como a nivel post-transcripcional (revisado en [254] y [255]) son muy importantes para este gen, por lo que no observar un aumento en los mensajeros no permite descartar inducción a otros niveles. A pesar de estar sujeto a una compleja regulación transcripcional [256], el caso de *Foxp3* fue similar sin que se observaran cambios significativos en sus mensajeros (Figura IV.3.6 C).

En cambio, los mensajeros de *Il10* se incrementaron en los animales tratados con FliC. Flagelina provocó el incremento de los mensajeros de *Il10* independientemente de la presencia de la bacteria (Figura IV.3.6, panel A). Esto podría dar cuenta de la activación de mecanismos de control de la inflamación capaces de suprimir el reclutamiento neutrofílico y favorecer la recuperación del daño y la reestructuración del tejido.

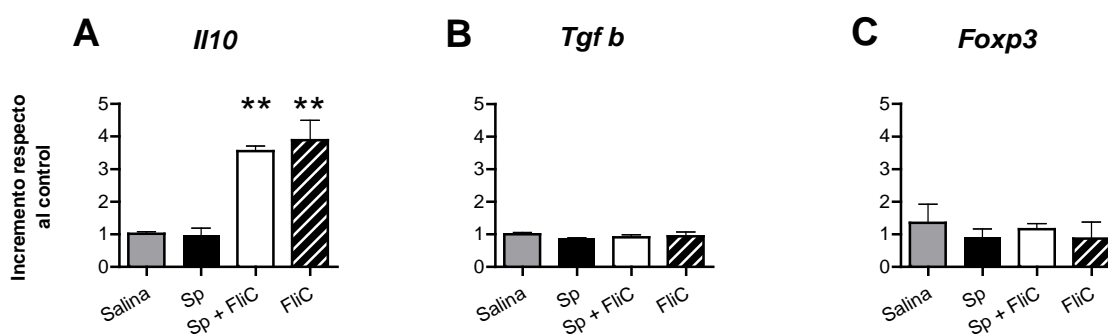


Figura IV.3.6: Comparación de los niveles de mensajeros de genes proinflamatorios en animales infectados y tratados con FliC i.n. durante el desafío. Hembras BALB/c de 8-10 semanas de edad fueron infectadas por ruta i.n. con la MDL de serotipo y tratadas simultáneamente con 1 μ g de flagelina, o salina como control. A las 24 horas se extrajeron los pulmones para realizar extracción de mensajeros totales y síntesis del ADNc. El nivel relativo de ARNm para cada gen fue normalizado empleando como gen de referencia la β -actina. Los resultados se expresan como cantidad de los ARNm normalizados, relativa al grupo control (salina). Las barras representan la media \pm SEM (n=5). Dos asteriscos (**) indican diferencias significativas para $p < 0.01$ y un asterisco (*) diferencias $p < 0.05$, determinadas mediante test de Mann-Whitney de una vía.

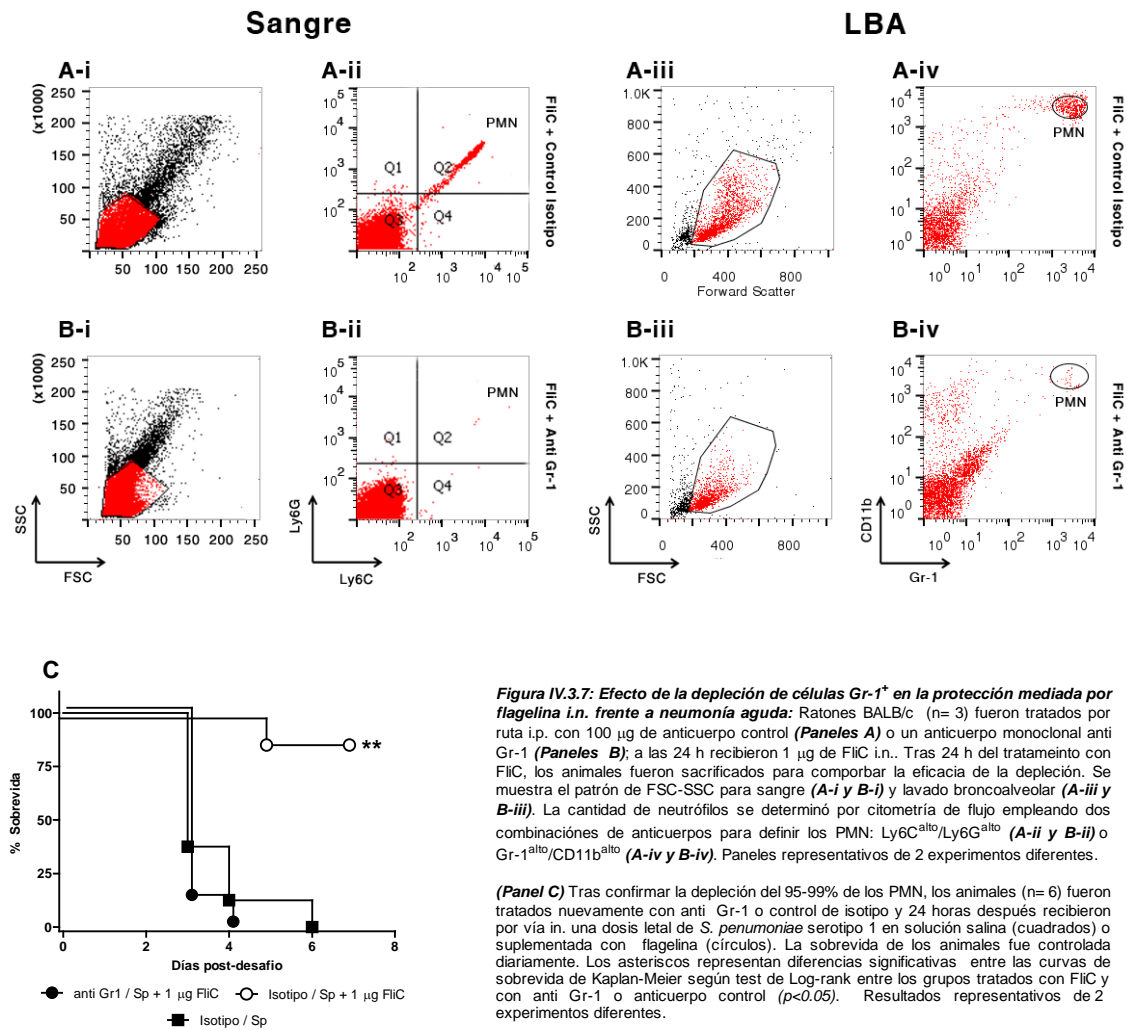
IV.3.3. Poblaciones celulares implicadas en la protección.

Aunque los neutrófilos tienen un rol crucial en la protección contra neumococo [41], en general se ha propuesto que la fagocitosis eficiente de neumococo por parte de los PMN requiere de la opsonización mediada por anticuerpos para superar los mecanismos antifagocíticos de la bacteria [257]. En este sentido, tanto los anticuerpos naturales preexistentes como la generación de anticuerpos anticapsulares específicos colaboran en la opsonización y eliminación de *S. pneumoniae* [14,258,259]. Los animales empleados en todos los ensayos nunca antes estuvieron expuestos a neumococo y por tanto carecían de anticuerpos anticapsulares; aún así cabe cuestionarse el rol que pudiesen tener los anticuerpos naturales en la protección mediada por FliC. Dado que se observó incremento de los ARNm del plgR, podría pensarse que el tratamiento con FliC podría inducir mayor translocación de anticuerpos IgA hacia los alvéolos contribuyendo a la opsonización de la bacteria. Por otra parte, algunos reportes han señalado que las células T son importantes en fases tempranas de la respuesta frente a la neumonía [66], aunque en el presente modelo el análisis citométrico no reveló infiltrado significativo de estas células.

Con el fin de precisar el rol de los diferentes tipos celulares y de los anticuerpo en la protección, se evaluó la eficacia del tratamiento en animales deficientes en neutrófilos con respuesta B, T y humoral normal y en animales deficientes en células T, células B y carentes de anticuerpos competentes a nivel de respuesta innata.

Para evaluar el rol de los neutrófilos en la protección, se puso apunto la depleción de PMN mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti Gr-1 (del inglés: *anti-granulocyte receptor 1* o Ly6C-Ly6G) administrado por ruta i.p.. Veinticuatro horas antes del desafío los animales recibieron una dosis de anti Gr-1 suficiente para depletar el 99% de los neutrófilos en circulación y en espacios alveolares (*Figura IV.3.7 A y B*); el grupo control recibió la misma dosis de un anticuerpo control de igual isotipo. Todos los animales fueron desafiados con la MDL de serotipo 1 por ruta intranasal coadministrada o no con FliC.

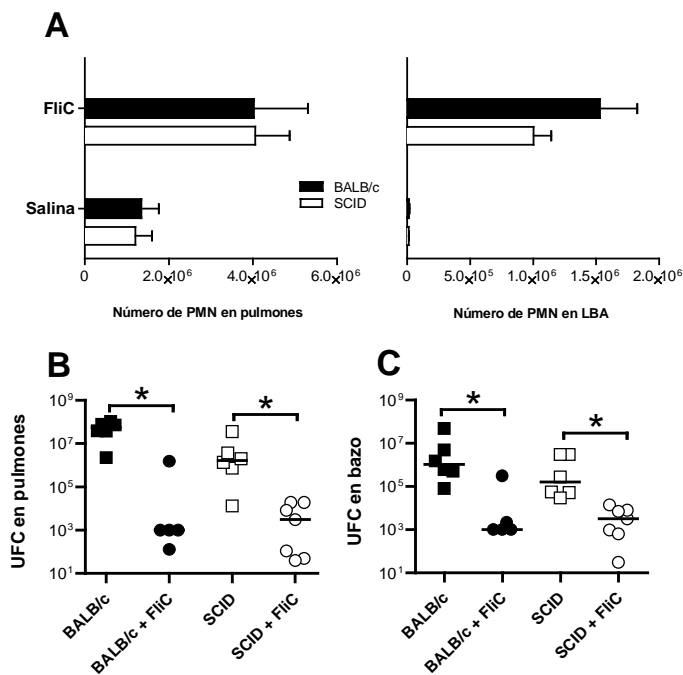
Los animales que recibieron el anticuerpo control previo al desafío y tratamiento con FliC sobrevivieron. Sin embargo, aquellos que recibieron el anticuerpo de depleción murieron a pesar de haber recibido flagelina al momento del desafío. Estos resultados sugieren que las células Gr-1⁺, probablemente en su mayoría neutrófilos, son actores críticos en la protección mediada por FliC frente a la neumonía invasiva.



El rol de las células B, T y anticuerpos fue investigado empleando animales portadores de la mutación recesiva *scid*, la cual genera un fenotipo de inmunodeficiencia combinada severa, en la que los animales carecen de linfocitos B y T y presentan deficiencia de gama-globulinas y linfopenia. A pesar de sus deficiencias en la respuesta adaptativa, estos animales presentan respuestas innatas completamente funcionales. Esto último se comprobó evaluando la capacidad de flagelina de inducir reclutamiento de neutrófilos a los pulmones y espacios alveolares tras ser instilada localmente.

Como muestra la *Figura IV.3.8*, el reclutamiento de PMN en los ratones SCID fue similar al observado en ratones BALB/c normales. Se procedió entonces a evaluar la capacidad de FliC de conferir protección frente al desafío con *S. pneumoniae*. Para ello ratones SCID y BALB/c fueron desafiados con 2×10^7 UFC de serotipo 1 junto con FliC o solución salina. El nivel de protección se evaluó como disminución en el número de UFC en los pulmones y bazo de los animales a las 36 horas post-desafío. Los resultados mostraron una disminución similar en los animales tratados con FliC independientemente de la deficiencia de células B, T y anticuerpos (*Figura IV.3.8 paneles B y C*).

En su conjunto, los resultados respaldan un mecanismo de protección dependiente de componentes innatos, e independiente de linfocitos B o T, o anticuerpos.



IV.3.8. Rol de los linfocitos T, B y anticuerpos en la protección mediada por administración i.n. de FliC.

(A) Reclutamiento de PMN (definidos con Ly6G^{alto}/Ly6C^{alto}/CD11b^{alto}) en lavados broncoalveolares tras la instilación de 1 μ g de FliC por ruta intranasal en ratones SCID (barras blancas) o BALB/c (barras negras) (n= 5). Nótese que la diferencia de PMN reclutados en las dos cepas de ratones no fue estadísticamente significativa. Resultados representados como media \pm SEM.

(B y C) BALB/c, n=6 (símbolos negros) o ratones SCID deficientes en células B, T y anticuerpos (símbolos blancos) fueron infectados por ruta i.n. con 2×10^7 UFC de *S. pneumoniae* serotipo 1 en salina sola (cuadrados) o en salina con 1 μ g de flagelina (FliC) (círculos). El recuento bacteriano se realizó en homogeneizados pulmones (B) y bazo (C) 36 h después del desafío. Las diferencias significativas entre los grupos se indican con asteriscos (*) para $p < 0.05$, según el test de Mann-Whitney. Resultados representativos de 2 experimentos.

Para corroborar la noción de que los anticuerpos no eran necesarios para la protección y descartar que el incremento de los mensajeros de *Pigr* pudiese ser indicio de la mayor translocación de IgA hacia los espacios alveolares, se compararon los niveles totales de IgA en LBA tras el tratamiento con FliC en presencia o ausencia de desafío y con los de animales vírgenes. Las diferencias encontradas en los niveles de IgA total, no fueron significativas. A pesar de que una leve tendencia al aumento se observó para el grupo infectado y tratado con FliC, este resultado fue variable y nunca alcanzó significancia estadística en ninguna de las 4 instancias en las que se repitió el ensayo, reafirmando que los anticuerpos no están implicados en el mecanismo de protección inducido por flagelina (Figura IV.3.9).

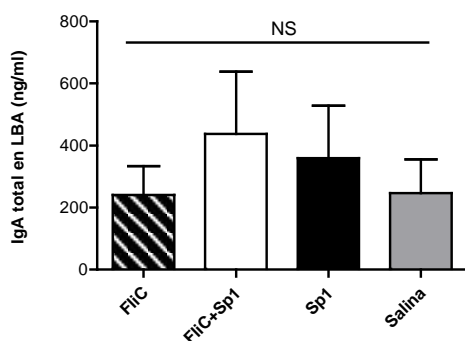


Figura IV.3.9: Cuantificación de IgA total en lavados broncoalveolares tras el tratamiento intranasal con FliC. Ratones BALB/c (n= 4-5) de 8-10 semanas de edad fueron desafiados con 4×10^5 UFC de *S. pneumoniae* serotipo 1 solo, o en conjunto con 1 μ g de FliC i.n., o tratados con 1 μ g de FliC por la misma ruta. A las 24 horas los animales se sacrificaron para realizar los lavados broncoalveolares. La cantidad de IgA total se determinó mediante ELISA. El análisis estadístico mediante test de ANOVA de una vía no reveló diferencias significativas entre los grupos que recibieron tratamientos diferentes. Resultados representativos de 4 experimentos diferentes.

IV.3.4. Importancia de la señalización por TLR5 y NLRC4.

La evolución del sistema inmune de los mamíferos ha determinado el desarrollo de al menos dos vías diferentes que aseguran el reconocimiento de los monómeros de flagelina y median sus potentes efectos de activación sobre varios tipos celulares tanto innatos como adaptativos. La presencia de flagelina en el medio extracelular es detectada por el receptor TLR5 [94], mientras que los monómeros de flagelina que ganan acceso al citosol son detectados por componentes del inflamasoma, específicamente NLRC4 y NAIP5 [98,99,244]. Consecuentemente, se investigó el rol de la señalización a través de las distintas vías en la protección inducida por el tratamiento i.n. con flagelina. Con este fin se emplearon flagelinas recombinantes modificadas de modo de abolir su capacidad de señalizar por uno de los dos receptores, para tratar animales desafiados con la MDL de neumococo. La capacidad de las flagelinas mutantes de conferir protección fue comparada con flagelina capaz de señalizar por ambas vías. (Sobre detalles de las flagelinas recombinantes diríjase al *Capítulo III: Materiales y Métodos.*)

Los resultados presentados en la *Figura IV.3.10* sugieren fuertemente que, mientras que la señalización vía NLRC4 no afecta la capacidad de flagelina de conferir protección contra la neumonía neumocócica, la señalización vía TLR5 resulta fundamental para lograr este efecto.

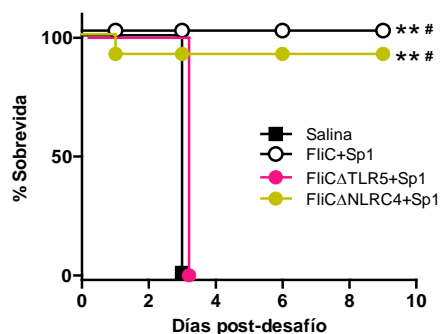


Figura IV.3.10: Importancia de la señalización vía TLR5 o NLRC4 en la protección mediada por tratamiento intranasal con flagelina frente a la neumonía neumocócica. Ratones BALB/c, hembras de 8 semanas de edad fueron anestesiadas y tratadas por ruta s.l. con 10 μ g de flagelina o mutantes incapaces de señalizar por TLR5 o NLRC al momento del desafío con 4×10^5 UFC de neumococo serotipo 1. El grupo control recibió únicamente neumococo en solución salina estéril. La supervivencia se monitorizó diariamente durante 9 días. Se muestra el porcentaje de supervivencia para n=9 por grupo de tratamiento con FliC o mutantes y n=8 para el grupo control. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo tratado fueron comparadas respecto al grupo control mediante test de Log-rank (Mantel-Cox). Los asteriscos (**) indican diferencias significativas respecto del grupo control ($p < 0.01$) y el símbolo numeral (#) diferencias significativas respecto al grupo tratado con el mutante para TLR5 ($p < 0.01$). Resultados representativos de 2 experimentos.

IV.3.5. La instilación local de quimioquinas de la familia ELR-CXC evoca el patrón de reclutamiento celular característico de flagelina e induce protección frente a la neumonía neumocócica.

La respuesta inmune que se desencadena frente a un estímulo inflamatorio no solo involucra actores celulares capaces de eliminar directamente al agente invasor, sino que depende en gran medida de la producción de factores solubles capaces de orquestar la respuesta inflamatoria en su conjunto. Dentro de los mediadores solubles las citoquinas, y en particular las quimioquinas, actúan como señales integradoras que en conjunto con selectinas e integrinas, regulan el tráfico leucocitario [260].

Las quimioquinas, además de regular el reclutamiento leucocitario tienen la habilidad de activar a las células reclutadas de manera de promover la eliminación eficiente de los agentes patógenos y esto se ha documentado bien en infecciones del tracto respiratorio causadas por patógenos como *E. coli* y *K. pneumoniae* (revisado en [23]).

Los resultados aquí presentados en conjunto con otras investigaciones publicadas, han demostrado que la instilación intranasal de flagelina induce la producción de citoquinas y quimioquinas incluyendo CXCL1, CXCL2 y CXCL5, que provocan el reclutamiento de neutrófilos a los espacios alveolares en forma dependiente de TLR5 [107,231,261-263].

Para corroborar el rol de estas quimioquinas en la protección, se realizó en paralelo el tratamiento intranasal de ratones con flagelina o con un cóctel de las quimioquinas recombinantes CXCL1, CXCL2 y CXCL5. Seguidamente, se evaluó el reclutamiento de PMN en espacios alveolares y parénquima pulmonar; por último se realizó un estudio comparativo de la capacidad de las quimioquinas y de FliC de promover la eliminación de *Streptococcus pneumoniae* de los pulmones de animales desafiados.

Los *paneles A y B* de la *Figura IV.3.11* muestran que el reclutamiento de PMN hacia los espacios alveolares inducido por ambos tratamientos fue comparable. En el caso del parénquima pulmonar, aunque no hubo diferencias significativas, se observó un reclutamiento levemente mayor en los individuos tratados con FliC.

Habiéndose confirmado la capacidad de las quimioquinas recombinantes de promover el reclutamiento local de neutrófilos, se evaluó la capacidad de conferir protección frente al desafío con neumococo serotipo 1. Los resultados permitieron comprobar que la instilación intranasal de las tres quimioquinas agonistas del receptor CXCR2, es suficiente para inducir protección en el modelo de neumonía neumocócica empleado y en medida similar a la inducida por flagelina. Esto permite proponer que la inducción local de los mensajeros de estas citoquinas promovida por la administración i.n. de FliC sea probablemente relevante en la protección contra la infección respiratoria causada por *S. pneumoniae*.

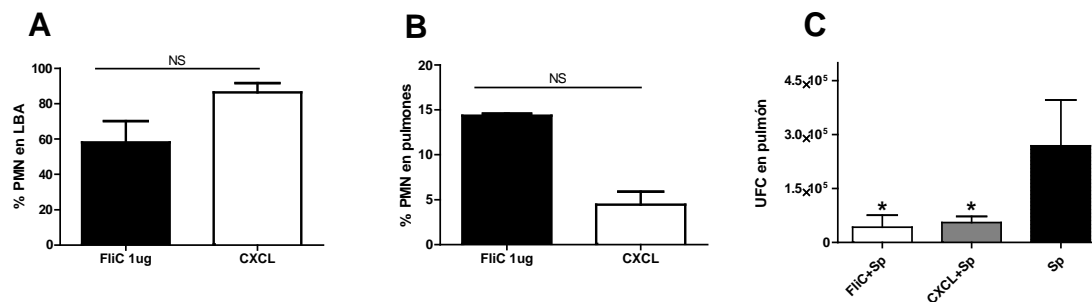


Figura IV.3.11: Instilación intranasal de citoquinas de la familia ELR-CXC inducen acumulación local de PMN y eliminación de neumococo de los pulmones: Ratones BALB/c ($n=3$) fueron tratados con un cóctel de quimioquinas recombinantes conteniendo 250 ng de CXCL1, CXCL2 y CXCL5, administradas en 50 μ l por vía intranasal bajo sedación leve. En paralelo otro grupo de animales fue tratado con 1 μ g de FliC en 50 μ l, bajo anestesia. A las 24 horas los animales fueron sacrificados para determinar la cantidad de PMN por citometría de flujo en LBA (**panel A**) y en parénquima pulmonar (**panel B**). Los neutrófilos se definieron empleando anticuerpos monoclonales contra marcadores de superficie según la siguiente combinación: Gr-1^{alto}/Ly6G^{alto}/F4-80^{neg}/CD11c^{neg}.

La capacidad de conferir protección frente al desafío con neumococo se comparó entre los animales tratados con las quimioquinas o FliC (**panel C**). Los animales tratados como se describió antes ($n=4$), recibieron simultáneamente una dosis letal de serotipo 1 (2×10^5 UFC). A las 24 se prepararon homogeneizados de pulmón y se determinó el número de UFC mediante recuento en placas de agar-sangre. Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante test de Mann-Whitney de una vía y se indican con un asterisco (*) para $p < 0.05$. NS: No significativo.

IV.3.6. Respuesta de las células epiteliales de pulmón (neumocitos tipo II) y neutrófilos humanos a la estimulación con flagelina.

Los resultados presentados hasta el momento en conjunto con la información disponible en la literatura, permiten postular un modelo para explicar al menos parcialmente el modo de acción de flagelina como agente terapéutico frente a la neumonía. Para desencadenar los mecanismos protectores, en primer lugar flagelina debe ser reconocida por células residentes del tracto respiratorio a través del receptor TLR5, el cual tras la unión del ligando dimeriza y desencadena la cascada de señalización intracelular. La señalización vía TLR5 activa transitoriamente un programa de expresión génica que induce principalmente la expresión de genes proinflamatorios, orientado esencialmente al reclutamiento leucocitario, destacándose la inducción local de quimioquinas de la familia ELR-CXC, ligandos del receptor CCR2 presente en neutrófilos. La producción de dichas citoquinas en conjunto con otros factores capaces de alterar la permeabilidad vascular como TNF- α , serían responsables de inducir un ingreso rápido y masivo de neutrófilos hacia los espacios alveolares y parénquima pulmonar. La presencia de neutrófilos en los alvéolos sería responsable de la eliminación de las bacterias en un modo independiente de anticuerpos, células T y B, mientras que la presencia de más fagocitos en el parénquima podría colaborar en la contención de la infección a nivel local evitando la diseminación sistémica. Paralelamente, flagelina estaría promoviendo el aumento en la expresión de genes antiinflamatorios como IL10, citoquina capaz de limitar el reclutamiento, evitar la exacerbación de la inflamación y promover la reestructura del tejido tras la eliminación de las bacterias.

Sin embargo, los datos hasta aquí obtenidos no aportan información sobre el tipo celular residente en el tracto respiratorio responsable del reconocimiento inicial de la flagelina y capaz de desencadenar los mecanismos microbicidas. Por otra parte, cabe preguntarse si los neutrófilos que ingresan a las

vías aéreas atraídos por las quimioquinas, pueden ser activados por la presencia de flagelina remanente en el medio alveolar, potenciando sus mecanismos microbicidas.

Las células epiteliales aparecen como los candidatos más probables en el reconocimiento primario de flagelina y el inicio de la respuesta inflamatoria en las vías respiratorias. Diversa evidencia indica que las células epiteliales son los centinelas más importantes de las mucosas y constituyen la primera línea de protección frente a los patógenos. En cuanto a su capacidad de responder frente a la flagelina, tanto las células epiteliales alveolares como bronquiales expresan TLR5 y responden de diversas maneras frente a la estimulación *in vitro* con flagelina [264-267]. Adicionalmente, estudios *in vivo* realizados en animales quiméricos que presentaban deficiencia selectiva del receptor TLR5 en células del sistema inmune o estromales, demostraron que tanto la secreción de quimioquinas como el reclutamiento de neutrófilos tras la instilación intranasal de flagelina dependen de la capacidad de las células no hematopoyéticas de reconocerla vía TLR5 [263]. Esta evidencia apunta fuertemente a que el epitelio pulmonar es fundamental en la respuesta temprana ante flagelina.

Por lo tanto, el paso siguiente consistió en evaluar el perfil transcripcional en una línea celular humana derivada de epitelio pulmonar con el fin de determinar el perfil transcripcional desencadenado tras el reconocimiento de FliC y comprobar si los efectos desencadenados por flagelina en el modelo *in vivo* podían ser recapitulados en este sistema.

Empleando la línea derivada de epitelio pulmonar humano A549 que mantiene las características de los neumocitos tipo II [138], y tras haber confirmado la expresión de mensajeros de TLR5 en las mismas, se comenzó por establecer la capacidad de diferentes cantidades de flagelina de inducir cambios en el perfil transcripcional de estas células. Como se ilustra en la *Figura IV.3.12*, tras 24 horas de estimulación, flagelina indujo el aumento de los ARNm *Cxcl8* y *Cxcl1* (homólogos de *Cxcl1-Cxcl2* murinos), codificantes para las quimioquinas reclutadoras de neutrófilos. De manera similar a lo observado *in vivo*, flagelina indujo el aumento de los mensajeros de *Tnfa* y de *Ccl20* en la línea epitelial.

Adicionalmente se investigaron cambios en los mensajeros de otros genes relevantes en la defensa frente a la infección y regulación de la respuesta inflamatoria en pulmón que pudiesen ser inducidos por flagelina. Dentro de los genes analizados se encontró un incremento significativo de los mensajeros de *Il1a*, citoquina también implicada en el reclutamiento de neutrófilos hacia las vías respiratorias [268].

Conjuntamente, también se vio un aumento en los mensajeros de las quimioquinas *Ccl2*, vinculada al reclutamiento de linfocitos y monocitos hacia las vías aéreas [269] y *Ccl5*, reportada como citoquina capaz de inducir reclutamiento de eosinófilos y mastocitos en pulmones [270,271].

En cambio, no se observaron incrementos en los mensajeros de beta-defensina (*Defb*), gen codificante para péptidos antimicrobianos ampliamente producidos en las superficies mucosas frente a señales de peligro [272] o de la sintasa de óxido nítrico inducible (*iNos*), que a través de la producción de NO \cdot regula el tono de las vías aéreas y de los vasos sanguíneos pulmonares, batido ciliar y producción de mucus además de tener un importante efecto microbicida [273].

En cuanto a mensajeros de genes implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria, se evaluó el nivel de mensajeros de *A20* (también denominado *Tnfaip3*, del inglés *TNF alpha induced protein 3*), que codifica para una deubiquitinasa que participa en la regulación negativa de los TLRs. La misma inhibe la cascada de señalización desencadenada tras la unión del ligando al receptor TLR impidiendo la activación de NFκB. *A20* es especialmente importante en la regulación de TLRs a nivel epitelial y se ha demostrado que funciona como un regulador importante de la vía de señalización de TLR5 en el epitelio intestinal [274,275]. Los mensajeros para este gen se vieron aumentados de forma significativa con respecto al control sin estimular (*Figura IV.3.12*). Llamativamente, no fue posible detectar mensajeros de *Il10* en las células A549 estimuladas con FliC o sin estimular. Para verificar si dichos mensajeros podían inducirse en otra condición de estimulación, también se analizó la variación de los RNAm de *Il10* tras estimulación con LPS, sin que fuesen detectados, por lo que se desconoce si esta línea celular es capaz de expresar el gen de *Il10*.

En todos los casos, los niveles de todos los RNAm variaron de forma independiente de la dosis de flagelina empleada.

Seguidamente, se analizó la variación temporal de los niveles de mensajeros para los genes antes mencionados. Se realizó la cuantificación relativa de los mensajeros seleccionados en células A549 estimuladas durante 0.5, 1, 3, 6, 12 o 24 horas con 0.1 μg de flagelina.

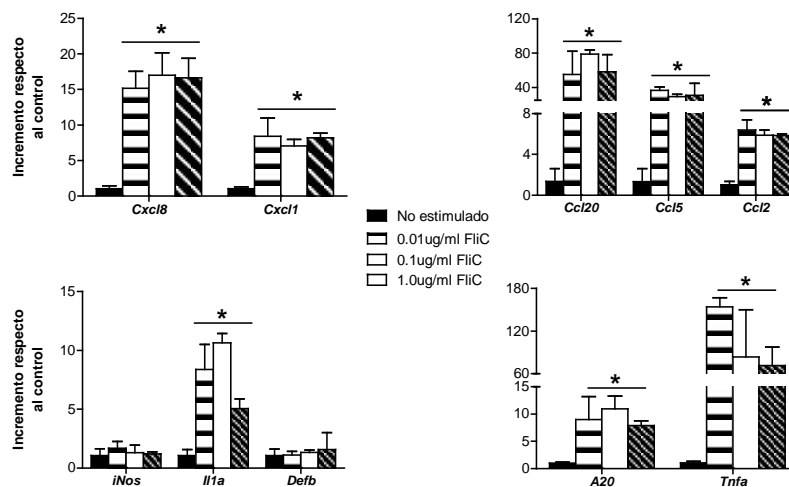


Figura IV.3.12: Evaluación del perfil transcripcional y dosis-respuesta de la línea epitelial de pulmón A549 estimulada con Flagelina.

Células A549 fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo. Las células se dejaron adherir por 2 h y tras retirarse las células no adherentes por lavado con medio, la fracción adherente fue estimulada con flagelina de *Salmonella Tiphymurium* en medio HAM-F12/DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino durante 24 h. Las células se lisaron en Trizol y se realizó la extracción del ARN total, síntesis de ADN copia y evaluación del perfil transcripcional mediante qPCR con primers específicos para los genes indicados. La cuantificación relativa se realizó por el método de $\Delta\Delta Ct$ empleando como gen de referencia interna *Actb* o *18s* humanos. Los resultados se muestran como incremento respecto al control sin estimular. Las barras representan la media de los duplicados de cada condición con los respectivos errores estándar. Las diferencias significativas respecto al control sin estimular calculadas por el test de Mann-Whitney se indican con un asterisco ($p < 0.05$). Resultados representativos de dos experimentos individuales.

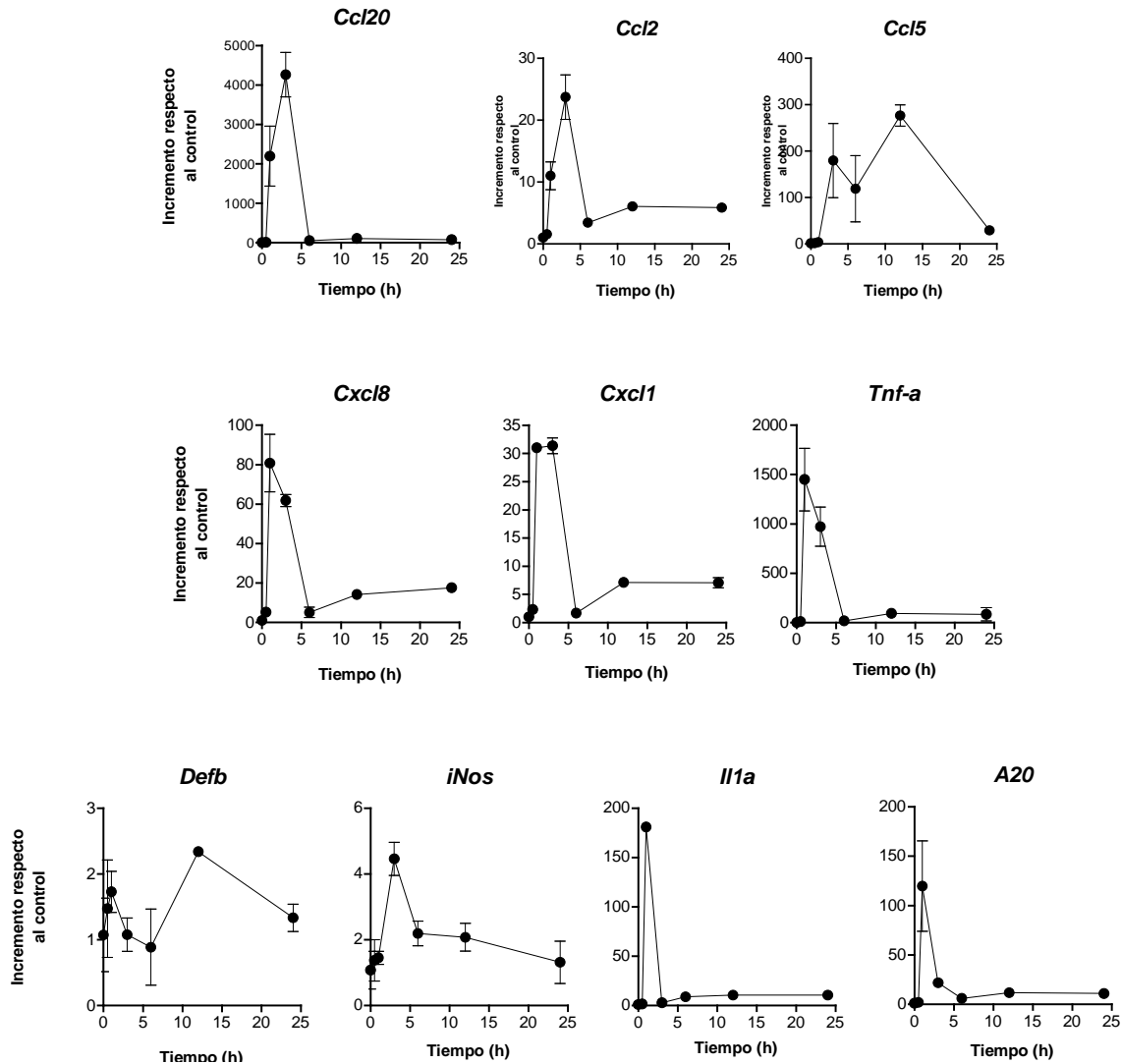


Figura IV.3.13: Evaluación temporal de los cambios en el perfil transcripcional de la línea epitelial de pulmón A549 estimulada con Flagelina. Células A549 fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo). Las células se dejaron adherir por 2 h. Las células no adherentes se retiraron por lavado y las adherentes se estimularon con 0.1 mg/ml de flagelina de *Salmonella enterica* serovarTiphymurium en medio HAM-F12/DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. A los tiempos indicados el medio se retiró y las células se lisaron en Trizol y se extrajo el ARNm total. La evaluación del perfil transcripcional se realizó mediante qPCR con primers específicos para los genes indicados empleando como molde el ADN copia. La cuantificación relativa se realizó por el método de ΔC_t empleando como gen de referencia interna *Actb* o *18s* humanos. Los resultados se muestran como incremento respecto al control sin estimular (media \pm SEM de cada condición por duplicado).

Como puede observarse en la *Figura IV.3.13*, el aumento máximo para todos los genes estudiados se produjo durante las primeras 3 horas de estimulación, alcanzándose un mínimo a las 6 horas y aumentando nuevamente de forma moderada a las 12 horas de la estimulación. Nótese que los ARNm de *iNos* y *Defb* que no habían mostrado cambios significativos a las 24 horas de la estimulación mostraron incrementos a tiempos tempranos respecto al control sin estimular.

Con el fin de corroborar si la cinética observada en la línea epitelial era comparable a lo observado *in vivo*, se trataron ratones con 1 µg de flagelina y se analizó por qPCR la variación de los mensajeros de *Ccl20* y *Cxcl1*, dos mensajeros normalmente aumentados por el tratamiento con FlIC. Como se observa en la *Figura IV.3.14*, el aumento de los ARNm de *Cxcl1* y *Ccl20* *in vivo* fue similar a la observada *in vitro* en células A549, lo que fortalece la idea de que las células epiteliales son uno de los actores celulares que contribuyen de manera más importante en el reconocimiento e iniciación de la respuesta frente a flagelina en las vías respiratorias.

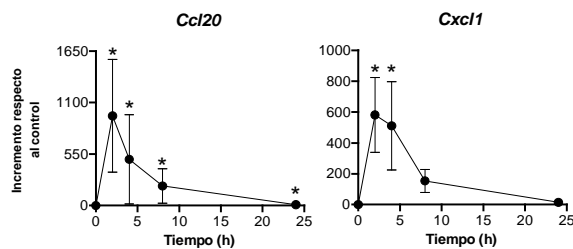


Figura IV.3.14: Análisis *in vivo* de la variación temporal de los ARNm de *Cxcl1* y *Ccl20* en respuesta al tratamiento local con flagelina. Ratones BALB/c (n=3-4) de 8-10 semanas de edad fueron anestesiados con Ketamina/Xilacina y tratados con 1 µg de flagelina por ruta i.n. A los tiempos indicados, los animales fueron sacrificados para realizar el análisis de la cantidad relativa de ARNm de los genes seleccionados por qPCR. Los resultados del análisis por el método del $\Delta\Delta Ct$ se realizaron empleando los mensajeros de *Actb* como control de referencia endógeno y se expresan como la media del incremento relativo a la cantidad de mensajeros del gen de interés en el grupo control \pm SEM, los asteriscos indican diferencias significativas al tiempo señalado respecto al control tratado con solución salina según Mann-Whitney de una vía ($p < 0.05$). Resultados representativos de 2 experimentos.

En conjunto, los datos hasta aquí presentados demuestran que células derivadas de epitelio pulmonar humano son altamente respondedoras a flagelina, mostrando un perfil proinflamatorio transitorio donde se destaca el aumento de mensajeros de genes vinculados al reclutamiento de neutrófilos. Este hecho recapitula lo observado en pulmones tras el tratamiento *in vivo* con flagelina en el modelo de ratón y sugiere indirectamente que las células epiteliales son actores fundamentales en la protección mediada por flagelina frente a neumococo, interviniendo principalmente como reguladores del tráfico leucocitario hacia la zona de infección.

Habiéndose confirmado la capacidad de flagelina de activar células epiteliales de pulmón, se procedió a investigar su capacidad de activar directamente a los neutrófilos. Estudios previos han demostrado que la generación de especies reactivas del oxígeno por parte de los fagocitos es fundamental para la eliminación de varios microorganismos patógenos [276-279]. Los neutrófilos poseen un conjunto de enzimas involucradas en la generación de las especies tóxicas del oxígeno, proceso conocido como estallido respiratorio. La NADPH oxidasa es el principal complejo multiproteico de los PMN productor de la especie altamente reactiva, el radical anión superóxido (O_2^-). A su vez otras enzimas participan en la conversión del O_2^- en otros productos reactivos con gran poder microbicida. La superóxido dismutasa (SOD) convierte el O_2^- en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual a su vez puede ser convertido por la mieloperoxidasa (MPO) a ácido hipocloroso y cloraminas (revisado en [280]). La importancia del estallido respiratorio frente a la defensa contra los microorganismos ha quedado bien ilustrada por el hecho de que muchas especies patógenas han desarrollado mecanismos de interferencia capaces de inhibir la producción o consumir las especies tóxicas que se originan por la activación del estallido respiratorio, como parte de los mecanismos de evasión frente a la defensa del hospedero. Esto se ha observado en varias especies bacterianas como ser *E. coli*, *S. viridans*, *S. aureus* y otros [276-278] incluyendo a *S. pneumoniae* [279,281,282].

Neumococo inhibe la producción de superóxido en neutrófilos tanto espontánea como inducida por ésteres de forbol, en un mecanismo que depende de la viabilidad de la bacteria y que se ve asociado a componentes solubles liberados durante la fase de autólisis [281,282].

Para estudiar la capacidad de flagelina de promover el estallido respiratorio en neutrófilos, se aislaron PMN humanos a partir de sangre periférica de donantes sanos mediante el empleo de un gradiente de densidad y fueron teñidos con dihidrorhodamina (DHR), una sonda capaz de emitir fluorescencia en el canal FITC ante la acumulación de H_2O_2 . Los PMN previamente incubados con DHR fueron estimulados con diferentes concentraciones de flagelina, neumococo o una combinación de ambos para determinar la capacidad de los estímulos de inducir el estallido respiratorio en los neutrófilos.

La *Figura IV.3.15* muestra los resultados del análisis por citometría de flujo tras la exposición de los neutrófilos a los diferentes estímulos. A juzgar por el índice medio de fluorescencia (IMF), aunque en todos los casos los neutrófilos de los diferentes donantes respondieron al estímulo con ésteres de forbol (PMA) incrementando el IMF en el canal de FITC, ninguna de las concentraciones de flagelina, las diferentes multiplicidades de infección de neumococo, o la combinación de ambas, fueron suficientes para producir cambios en el IMF en comparación a la condición basal en el control sin estimular. Se analizó también el porcentaje de células positivas para fluorescencia en el canal de FITC, sin que se encontraran incrementos significativos en los grupos tratados con FliC, neumococo o ambos con respecto al control sin estimular, pero observándose un 95-99% de células positivas para el caso de la estimulación con PMA.

Los resultados sugieren que en las condiciones de trabajo empleadas, flagelina no es capaz de activar directamente el estallido respiratorio en neutrófilos humanos, sola o en conjunto con neumococo.

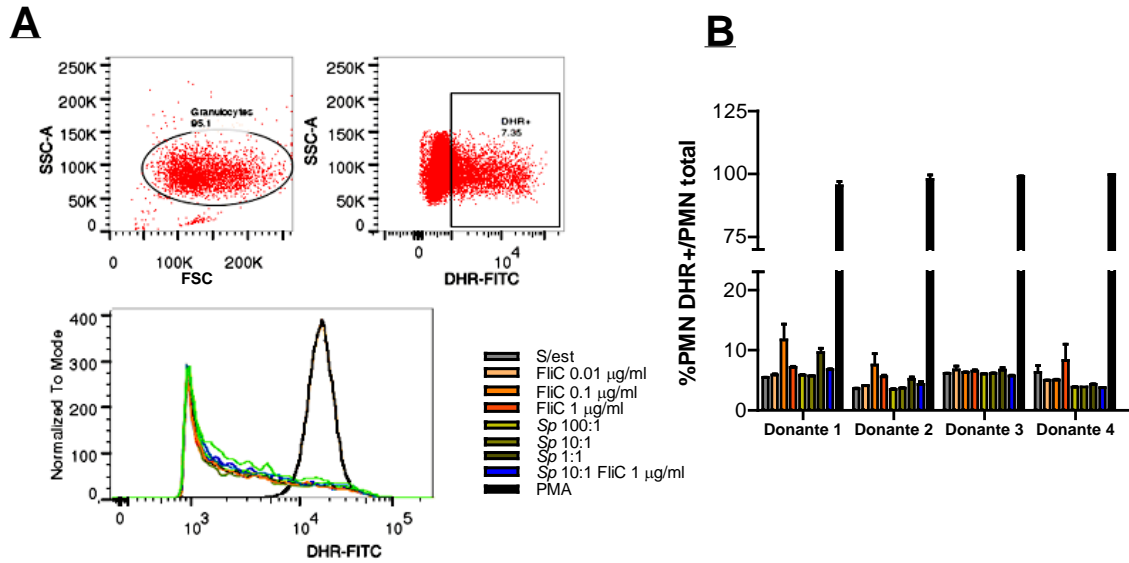


Figura IV.3.15: Evaluación de la capacidad de flagelina de promover el estallido respiratorio en neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos fueron obtenidos a partir de sangre periférica de donantes sanos (n=13) mediante purificación con gradiente de densidad Histopaque® 1077/1119, alcanzándose una pureza >95%, corroborada mediante análisis del patrón de granularidad y tamaño por citometría de flujo. Las células fueron teñidas con dihidrorhodamina (DHR) 1 µM/1x10⁶ células/ml durante 15 min en oscuridad. Posteriormente, los PMN fueron estimulados con diferentes dosis de flagelina, Sp1 o una combinación de ambos durante 90 min a 37°C. El control positivo para inducción del estallido respiratorio consistió en neutrófilos estimulados con PMA 10 µM y el control negativo en células incubadas en presencia de medio. **Panel A:** A la izquierda se muestra el gráfico de tamaño vs granularidad (FSC-SSC) representativo del resultado de la purificación de PMN por gradiente de densidad; a la derecha: gráfico de puntos fluorescencia en el canal FITC vs SSC con gate sobre células positivas para el estallido respiratorio (DHR⁺); panel inferior: superposición de histogramas para la fracción DHR⁺ en los diferentes grupos de tratamiento. **Panel B:** Gráfico representativo para 4 donantes del porcentaje de células activadas representado como %PMN DHR⁺/PMN totales. Barras indican la media ±SEM para duplicados o triplicados de cada condición.

IV.3.7. Discusión Sección IV.3.

Los resultados presentados en este capítulo ilustran parte de los mecanismos celulares y moleculares que hacen a la protección mediada por el tratamiento intranasal de flagelina frente a la neumonía neumocócica.

En su conjunto, los datos del análisis transcripcional en pulmones mostraron que el efecto terapéutico de la flagelina está ligado a un perfil inflamatorio, con una importante inducción de los niveles de mensajeros de las quimioquinas reclutadoras de neutrófilos. Estos resultados se encuentran en acuerdo con datos previos que mostraron la inducción de un perfil similar en los pulmones tras la instilación local de flagelina [231,283,284].

Concordantemente, el análisis del infiltrado celular en las vías aéreas y parénquima pulmonar mediante citometría de flujo e histología mostró el reclutamiento masivo y a la vez transitorio (menos de 48 horas) de PMN. La breve permanencia de los neutrófilos en las vías aéreas resulta muy importante para preservar la función respiratoria, ya que la batería de mecanismos microbicidas que poseen son también importantes mediadores del daño pulmonar en el contexto de la inflamación sostenida [285]. La arquitectura de los espacios alveolares y del parénquima pulmonar se recuperó rápidamente a pesar del gran infiltrado celular, sugiriendo que la amplificación transitoria y autolimitada de la respuesta inmune innata en las vías respiratorias puede tener efectos benéficos a través de la eliminación acelerada de la bacteria sin que la exacerbación de la inflamación resulte contraproducente para el hospedero.

En este sentido cabe destacar el aumento en los mensajeros de genes implicados en los programas de retorno a la homeostasis. En el modelo *in vivo* en ratones, flagelina indujo el aumento de los mensajeros de *Il10*. IL10 es un importante modulador de la inflamación en las vías respiratorias regulando la expresión de *Tnfa* e *Il1b* en macrófagos alveolares mediante un mecanismo que impide la translocación nuclear de NFκB [286] y la producción de CXCL2 inducida por administración de LPS en pulmones mediante un mecanismo similar [285]. IL10 también regula negativamente los mensajeros de *Cxcl1* disminuyendo su estabilidad [287]. Por lo tanto, la inducción de *Il10* por flagelina es seguramente clave para la terminación de la respuesta inflamatoria en pulmones y podría resultar fundamental para evitar efectos patológicos del reclutamiento leucocitario.

Adicionalmente, los estudios *in vitro* revelaron que las células epiteliales derivadas de pulmón A549 responden a flagelina aumentando la cantidad de los mensajeros de *A20* (*Tnfaip3*), otro gen central en la regulación de la respuesta inflamatoria, importante regulador negativo de la activación de los TLRs. La inducción de *A20* frente a la estimulación con flagelina no es exclusiva de esta línea celular, ya que también se ha observado en las líneas epiteliales bronquiales humanas BEAS-2B y 16HBE [284].

Es interesante también considerar que aunque en las condiciones aquí evaluadas flagelina no indujo cambios en los niveles de los ARNm de TGF-β, sin embargo, otros estudios del perfil

transcripcional realizados por microarreglos 1 hora después del tratamiento i.n. con FliC, revelaron cambios a nivel de la vía de señalización de TGF- β en los pulmones de los ratones tratados [284]. Además, dado que TGF- β es producido en forma de un complejo inactivo asociado a un péptido denominado LAP (del inglés: *Latency-associated peptide*), que requiere de la oxidación por parte de especies reactivas del oxígeno para disociarse (revisado en [36]), flagelina podría estar colaborando indirectamente en su activación a través del reclutamiento de PMN capaces de producir dichas especies reactivas.

Por otra parte, el estudio de las poblaciones celulares en LBA en el tiempo, reveló una disminución de los macrófagos alveolares asociada a la infección, que fue significativa a tiempos tempranos en los animales tratados con flagelina pero no en los que solo se encontraban infectados. La muerte apoptótica de macrófagos alveolares durante la neumonía neumocócica ha sido descrita anteriormente como un mecanismo de control de la carga bacteriana a bajas dosis infectivas [29]; en cambio la muerte apoptótica de macrófagos alveolares resulta fundamental en la resolución de la inflamación ante mayores cargas bacterianas durante la neumonía neumocócica [67]. Resulta entonces pertinente preguntarse en primer lugar si en el contexto de la infección y tratamiento con FliC, la mayor disminución de los macrófagos se debe a una apoptosis acelerada de estas células y en dicho caso, cuál sería la contribución del proceso en la regulación de la inflamación y vuelta a la homeostasis. Si bien la respuesta a esta pregunta quedó por fuera del alcance de esta tesis, es pertinente dentro de las perspectivas futuras del trabajo.

Los resultados obtenidos en ratones SCID y en animales neutropénicos por tratamiento con el anticuerpo anti-Gr1, mostraron que mientras que las células Gr1⁺, muy probablemente en su mayoría neutrófilos, son cruciales para la protección inducida por FliC, las células B, T y los anticuerpos no son necesarios. El marcador Gr1 representa las moléculas de superficie Ly6C y Ly6G. Mientras que Ly6G es un marcador de superficie casi exclusivo de los PMN, Ly6C se encuentra expresado en niveles importantes en monocitos inflamatorios, por lo que la estrategia de depleción empleada podría estar afectando también a estas células mononucleares. Referido a este aspecto, en el trabajo realizado por nuestros colaboradores en el marco de la tesis doctoral de Laurye Van Maele [284] se reportó que el tratamiento local con FliC provoca el reclutamiento de monocitos inflamatorios a los espacios alveolares en ratones. Aunque durante el desarrollo del trabajo de tesis aquí presentado se estudió la presencia de monocitos/macrófagos infiltrantes en los pulmones, no fue posible detectar diferencias significativas en la cantidad de dichas células entre los ratones protegidos y no protegidos. La discrepancia entre los resultados podría deberse a múltiples factores, entre ellos los diferentes marcadores empleados para definir este tipo celular (Ly6G, CD11c, F4/80 vs CD11b, Ly6C, Ly6G), el tiempo al que se realizó el análisis (24 vs 16 h post-tratamiento), el haber realizado el análisis en suspensiones celulares de pulmón vs lavado broncoalveolar, la instilación de FliC en presencia de la bacteria vs la instilación de flagelina sola, además de diferencias en las cepas de ratones empleadas (BALB/c vs C57/BL6). Para descartar el rol de los monocitos en la protección y corroborar la importancia de los PMN, se realizaron estudios de depleción preliminares empleando el anticuerpo monoclonal NIMP-14 que reconoce exclusivamente Ly6G. Los resultados obtenidos

empleando NIMP-14 validaron lo antes observado con anti-Gr1, confirmando el rol crucial de los PMN en la protección mediada por FliC (datos aportados como comunicación personal por parte del Dr. Sirard).

El sistema inmune innato ha evolucionado de forma tal de asegurar el reconocimiento de los componentes bacterianos y con este fin, un mismo motivo bacteriano puede ser detectado en modo redundante por medio de varios receptores. Tal es el caso de flagelina, la cual puede ser reconocida por TLR5 en el espacio extracelular y por NLRC4-NAIP5 en el citosol celular [288]. Durante la infección natural por parte de bacterias flageladas, flagelina solo es capaz de activar las vías dependientes de NLRC4-NAIP5 si existe entrega de la proteína a nivel del citosol que ocurre, o bien gracias a la inyección “accidental” de flagelina por parte de los sistemas de secreción bacterianos (caso de *S. Typhimurium*, *L.pneumophila*, etc.) o bien debido al escape de la bacteria de las vacuolas fagocíticas hacia el citosol (observado para *L. monocytogenes* y *S. flexneri*) [288,289]. En este trabajo, se empleó la administración de monómeros de flagelina purificada al medio extracelular, por lo que cabe suponer que TLR5 sería el principal receptor involucrado en su reconocimiento y responsable de desencadenar los mecanismos inmunes. Sin embargo, debe recordarse que al ser administrada conjuntamente con neumococo, flagelina podría ganar acceso al citosol celular, por ejemplo a través de los poros en las membranas eucariotas generados por la citolisina neumolisina liberada por *S. pneumoniae* durante la autólisis bacteriana.

Dado que flagelina presenta regiones bien definidas que son necesarias para la señalización vía TLR5 [96,290] o NLRC4-NAIP5 [98,100] fue posible evaluar la contribución de dichos receptores empleando flagelinas mutantes modificadas de modo de prevenir la señalización por uno u otro receptor. La ausencia de protección en animales tratados con el mutante deficiente en la señalización vía TLR5 en contraste a la alta protección conferida por la flagelina incapaz de señalizar por NLRC4-NAIP5, sugiere que TLR5 es el único receptor de los hasta ahora descritos para flagelina necesario para promover la protección observada frente a la neumonía neumocócica. Sin embargo, nueva evidencia ha hecho que el significado de estos resultados sea cuestionable. La flagelina mutante FliC Δ NLRC4, fue diseñada en base a la evidencia presentada en los estudios de Lightfield y colaboradores quienes demostraron que cuando flagelina se encuentra intacta y en su estado monomérico, puede ser reconocida por NLRC4 en ausencia del otro componente del inflamasoma descrito en el reconocimiento de FliC, NAIP5. En esta situación, los residuos de leucina de la región C-terminal de la proteína son esenciales para la activación de NLRC4 [98,99]. Basados en esa evidencia se generó el mutante descrito en este trabajo. Sin embargo, evidencia reciente publicada por Halff y colaboradores contradice lo anterior y establece que aunque los residuos de leucina son importantes para la completa activación del inflamasoma, una porción de la región amino terminal (los 52 aminoácidos terminales) también están implicados. Asimismo, proponen un modelo para la formación de un complejo multiproteico entre NAIP5 y NLRC4 desencadenado por el reconocimiento de flagelina [100]. Por lo tanto, pruebas definitivas del rol de los componentes del inflamasoma y las vías de señalización desencadenadas por el reconocimiento de flagelina deberán aguardar al

establecimiento de colaboraciones que permitan realizar los estudios en ratones deficientes en cada uno de esos receptores.

El epitelio de las vías aéreas es un importante componente del sistema inmune que, además de actuar como barrera mecánica, reconoce activamente la presencia de agentes patógenos a través de la expresión de una amplia gama de receptores innatos. El epitelio combate activamente a los microorganismos a través de la producción de péptidos antimicrobianos como, defensinas, lisozima, mucinas, entre otras y orquesta el reclutamiento leucocitario a través de la secreción de citoquinas y quimioquinas (revisado en [239] y [291]). Los resultados aquí presentados apoyan la participación del epitelio pulmonar en los efectos desencadenados por la administración intranasal de flagelina. Se demostró que flagelina induce un perfil inflamatorio transitorio caracterizado por incrementos en mensajeros codificantes para citoquinas proinflamatorias y quimioquinas involucradas en el reclutamiento de neutrófilos. El perfil transcripcional observado en la línea celular A549 estimulada con flagelina resultó similar a lo observado *in vivo*. Adicionalmente, la cinética de producción de los mensajeros de *Ccl20* y *Cxcl1* observada *in vitro* fue comparable con la cinética de producción de los mismos mensajeros en los pulmones de ratones estimulados por ruta i.n. con FliC purificada, resultados que también están en acuerdo con lo observado por nuestros colaboradores del Institut Pasteur de Lille [284]. En su conjunto los resultados obtenidos en este trabajo y en otras investigaciones sugieren un rol central del epitelio pulmonar en el inicio de la respuesta inflamatoria desencadenada por FliC y por tanto un rol fundamental en la protección mediada por flagelina frente a la neumonía neumocócica.

La participación del epitelio pulmonar en el reconocimiento de flagelina ha sido bien establecida y no hay dudas de su importante rol en la articulación de la respuesta inmune tras la activación de la vía de señalización de TLR5 [264-267]. Sin embargo, los macrófagos alveolares también son capaces de reconocer flagelina mediante TLR5 y responder mediante la secreción de citoquinas como TNF- α , CXCL1, CXCL2. Cabe destacar que los trabajos de Didierlaurent *et al.* y Hawn *et al.* han sugerido que los macrófagos alveolares también pueden controlar el reclutamiento de neutrófilos hacia los espacios alveolares [261,292]. Por lo tanto, el rol de estas células en la protección inducida por flagelina contra neumococo no puede desestimarse hasta ser investigada en profundidad.

En cuanto a la capacidad de flagelina de activar directamente los neutrófilos los datos son controvertidos. La expresión de TLR5 en neutrófilos ha sido demostrada a nivel de ARNm en neutrófilos humanos [82] y a nivel de ARNm y proteína en neutrófilos murinos periféricos y derivados de médula ósea [82,293]. Mientras que Shibata *et al.* no observaron producción de IL6 o CCL2 tras exposición de PMN murinos a flagelina, Hayashi *et al.* reportaron la activación de PMN humanos medida como pérdida de L-selectina, cambio de morfología, aumento de la capacidad fagocítica, aumento en los mensajeros de varias quimioquinas y activación del estallido respiratorio.

Durante este trabajo no fue posible demostrar la activación directa de neutrófilos purificados por parte de flagelina empleando como marcador de activación el estallido respiratorio a través de la detección de la acumulación de H₂O₂. Las discrepancias observadas en cuanto a la capacidad de los PMN

humanos de responder a la estimulación con flagelina a través del estallido respiratorio pueden radicar en que en los ensayos de Hayashi *et al.* se evaluó la capacidad de flagelina de preactivar las células de modo de aumentar su capacidad de producir O₂- en respuesta a la estimulación con péptidos formilados. Cuando los PMN fueron estimulados directamente con flagelina en los ensayos de Hayashi *et al.*, tampoco se observó incremento en la producción de O₂-. Para resolver la aparente discrepancia, sería apropiado repetir los ensayos en condiciones similares a las empleadas en el trabajo citado. Además sería conveniente considerar el empleo de un inhibidor de la MPO para asegurar la acumulación de H₂O₂ y por lo tanto su detección.

A partir de los resultados obtenidos, se propone el modelo presentado en la *Figura IV.3.16* que ilustra el modo de acción de flagelina en el contexto de la protección frente a la neumonía neumocócica.

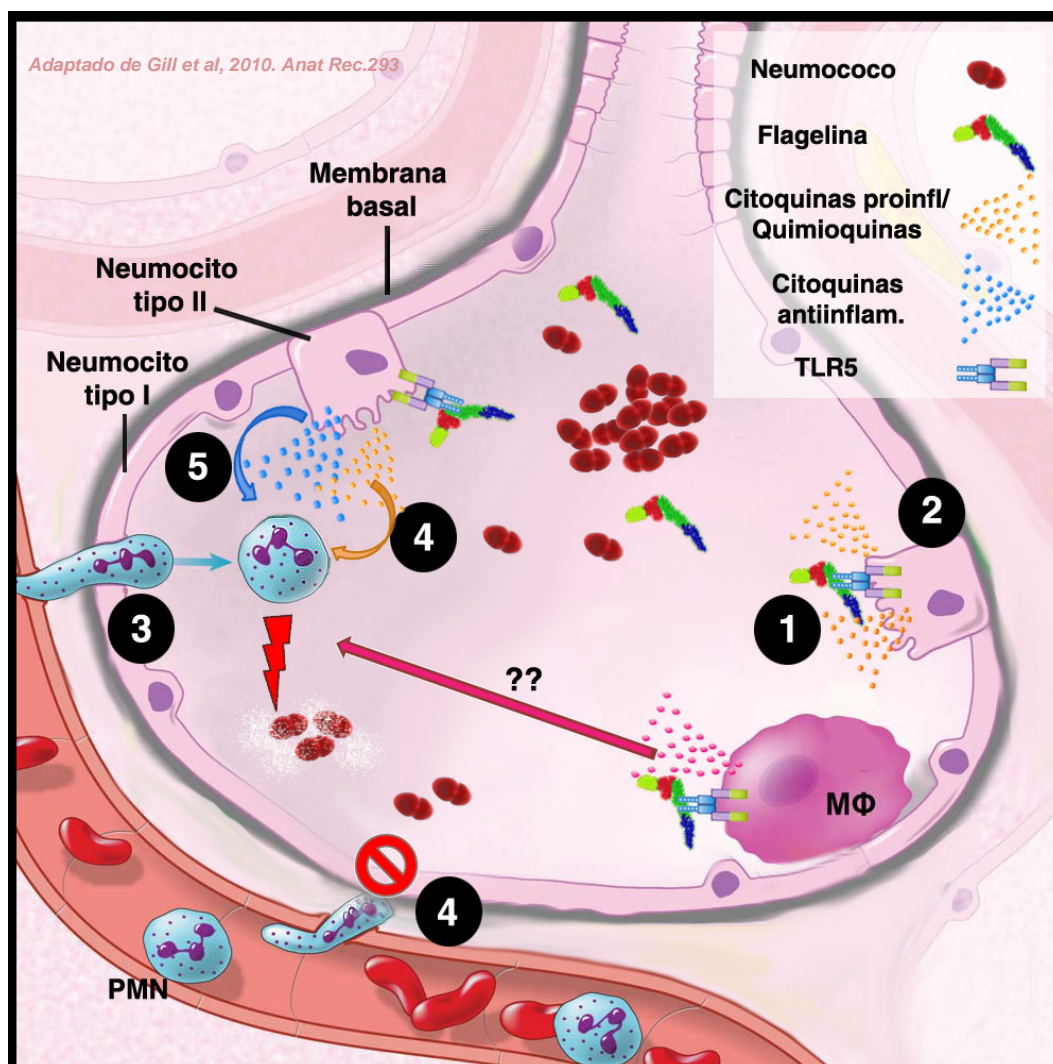


Figura IV.3.16: Mecanismo de acción propuesto para la protección mediada por flagelina frente a la neumonía neumocócica. ❶ La flagelina es reconocida por los receptores TLR5 por el borde apical de los neumocitos tipo II desencadenando la señalización intracelular y activación del programa de transcripción proinflamatorio. ❷ Se produce la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL6 y quimioquinas principalmente CXCL1/CXCL2. El epitelio también podría colaborar directamente en la eliminación de las bacterias mediante la producción de péptidos antimicrobianos como defensinas. ❸ Las citoquinas promueven el reclutamiento de PMN y su trans migración a través del epitelio hasta alcanzar la luz del alveolo. ❹ Los neutrófilos activados por las quimioquinas eliminan al neumococo presente en el alveolo y los neutrófilos del parénquima pulmonar impiden la diseminación sistémica. ❺ Flagelina activa mecanismos reguladores como la producción de IL10 y de A20 que limitan el reclutamiento y regulan negativamente la activación celular promoviendo el retorno a la homeostasis. Nótese que la función de los macrófagos alveolares se indica con signos de interrogación ya que resta aún establecer su rol en el mecanismo propuesto.

IV.4. Rutas alternativas de administración mucosa para el tratamiento de la neumonía neumocócica: Inmunoterapia Sublingual.

Puesto que *S. pneumoniae* es un patógeno que emplea como puerta de entrada la mucosa ya sea durante la colonización o invasión, la potenciación de la inmunidad local mediante la aplicación directa de inmunoestimulantes en la mucosa respiratoria resultó en primera instancia la alternativa obvia de tratamiento. La ruta intranasal se ha utilizado con éxito para la administración de inmunoestimulantes en el tratamiento o prevención de las infecciones respiratorias de diferente etiología [104,106,129,149,209,210,212]. Esta ruta es atractiva por la sencillez de aplicación y las bajas dosis de antígenos requeridas para generar una potente respuesta local y también sistémica. Sin embargo, en años recientes se han descrito casos de toxicidad en el sistema nervioso central y parálisis facial asociadas a la absorción de compuestos inmunoestimulantes a través de los nervios olfatorios, lo que generó alerta sobre el potencial peligro del empleo de la vía intranasal para la entrega de agentes proinflamatorios o toxinas incluso atenuadas [116,294].

Otras rutas mucosas como la oral y sublingual se han empleado durante varias décadas para la administración de agentes terapéuticos y/o profilácticos en el tratamiento de afecciones respiratorias, entre ellas las infecciones bacterianas recurrentes. Varios estudios clínicos y preclínicos señalan que la administración repetida de lisados bacterianos por ruta oral o sublingual, puede conferir protección frente a las infecciones bacterianas recurrentes frecuentes en niños y adultos mayores, o pacientes con condiciones predisponentes como enfermedad pulmonar crónica obstructiva [117-119,295-297].

Los mecanismos de acción asociados a la protección inducida por aplicación repetida de los lisados no se han caracterizado aún con precisión. La protección parece ser el resultado de, por una parte la inducción de una respuesta inespecífica que potencia la inmunidad innata en el tracto respiratorio, y por otra parte la inducción de respuesta humoral que se genera tras la administración repetida del lisado. Se ha observado que estos lisados promueven el aumento de moléculas de adhesión en monocitos y neutrófilos facilitando la transmigración endotelial hacia el espacio alveolar, potencian la capacidad fagocítica de macrófagos alveolares y neutrófilos y aumentan el estallido respiratorio, contribuyendo a la eliminación del patógeno [295-298]. La estimulación combinada de los mecanismos innatos y adaptativos explicaría la protección frente a una gran diversidad de patógenos, incluso no incluidos en la preparación y la inmunidad a largo plazo conferida por estos tratamientos.

En comparación con la ruta oral, la ruta sublingual presenta la ventaja de permitir el rápido pasaje del compuesto administrado al torrente sanguíneo, evitando procesamiento a nivel gástrico e intestinal y

minimizando su degradación [112]. Además, las células residentes y reclutadas hacia las mantas sublinguales son capaces de capturar del antígeno generando respuestas en el sitio de aplicación [299], regiones de mucosa distantes, en particular el tracto respiratorio [115,127,150,300] y genital [301] y sistémicas [302].

Sin embargo, no todos los antígenos purificados son capaces de generar respuestas estimulantes en el tracto respiratorio cuando son administrados por ruta sublingual. De hecho, hay vasta evidencia de que la administración sublingual puede generar respuestas tolerogénicas, característica que ha hecho que la ruta sublingual se emplee con éxito en el tratamiento de patologías respiratorias de base alérgica (revisado en [120]).

Según se vio en los capítulos anteriores flagelina es un potente estimulante de la inmunidad innata en las mucosas, capaz de inducir protección frente a la neumonía neumocócica cuando se administra por vía intranasal. En función de ello, y lo discutido previamente sobre rutas alternativas de mucosas, en el presente capítulo se estudió la capacidad inmunoestimulante de flagelina administrada por vía sublingual, y en particular su capacidad de conferir protección en un esquema de una única aplicación en el transcurso de la infección pulmonar con *S. pneumoniae*.

A continuación se presentan los puntos más relevantes de la puesta a punto del modelo de inmunoterapia sublingual con flagelina para el tratamiento de la neumonía invasiva en ratones y los resultados de la caracterización de la protección a nivel de sobrevivencia, perfil transcripcional en pulmones inducido tras el tratamiento, análisis de los tipos celulares involucrados en la protección y por último, rol de la señalización por los receptores TLR5 y NLRC4.

IV.4.1. Puesta a punto del modelo de administración sublingual de flagelina.

Puesta a punto de la administración sublingual de compuestos en ratones.

Dado que no se disponía de un modelo animal de inmunoterapia sublingual, el primer paso de esta etapa consistió en poner a punto las condiciones de administración de compuestos por esta ruta, asegurando la entrega de los mismos en la región anatómica correspondiente al piso de boca y región ventral de la lengua de los ratones. Un aspecto crucial para poder evaluar los efectos de la administración sublingual consistió en asegurar que los compuestos administrados no alcanzaran accidentalmente las vías respiratorias (*Figura IV.4.1 paneles A y B*). Para esto se inoculaban diferentes volúmenes de una solución de azul de metileno (5-50 μl) en animales levemente anestesiados con Ketamina/Xilacina. El empleo de anestesia asegura la permanencia de la solución en la región sublingual, facilita la inoculación y reduce el estrés de los animales debido a la sujeción en apertura de la mandíbula mediante el empleo de pinzas.

Tras la administración de los diferentes volúmenes de solución, los animales se dejaron descansar en posición decúbito ventral con la cabeza en anteflexión y fueron sacrificados para realizar la inspección visual del esófago, estómago, tráquea y pulmones para comprobar la presencia de azul de metileno. Se determinó que 10 μl es el máximo volumen que puede ser administrado por ruta sublingual en ratones BALB/c de 8-12 semanas de edad, ya que aunque no se observó coloración en las vías respiratorias, el uso de volúmenes mayores provocó coloración en el esófago y estómago. Adicionalmente, se comprobó que es posible administrar en el mismo animal dos dosis de 7 μl cada una espaciadas por un intervalo de 10 minutos sin que se detecte coloración a nivel gástrico.

La *Figura IV.4.1* ilustra la técnica de sujeción e inoculación de los ratones.

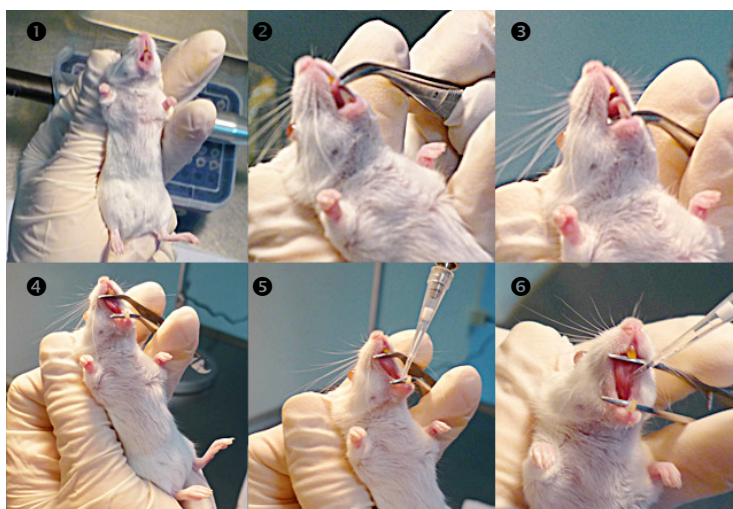
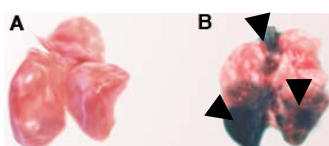


Figura IV.4.1: Inoculación sublingual de compuestos. ❶ Sujeción: el animal anestesiado se sujeta con los dedos pulgar e índice por detrás de la cabeza, dejando libres los dedos mayor y anular para la sujeción de la pinza. El dedo meñique se emplea para asegurar la cola. ❷ Con la mano libre se toma la pinza y se sujeta suavemente la lengua para traccionarla levemente hacia afuera de la boca. ❸ Se coloca la pinza cerrada debajo de la lengua y se comienza a abrir lentamente con ayuda de la mano libre. ❹ Una vez determinada la apertura máxima que se dará a la pinza, se emplean los dedos anular y mayor de la mano que sujeta al animal para mantenerla en dicha posición. ❺ Habiendo cargado previamente la pipeta se inocula la mitad del volumen en el piso de la



boca. ❻ El volumen restante se distribuye en la cara ventral de la lengua. Se retira la pinza y se deja descansar al animal en posición ventral con la cabeza en anteflexión.

A: Pulmón de un animal inoculado por ruta sublingual con 10 μl de solución de azul de metileno. **B:** Pulmón de un animal inoculado con 50 μl de la solución por ruta intranasal. Las puntas de flecha señalan la acumulación del colorante.

Impacto de la inmunoterapia sublingual con flagelina frente a la neumonía neumocócica.

Ratones BALB/c anestesiados recibieron 5, 10 o 50 μg de flagelina por ruta sublingual; la instilación de FliC se realizó 2 horas previas al desafío intranasal con la MDL de neumococo serotipo 1 para evitar interferencia entre los inóculos. Como control positivo de protección, un grupo de animales fue tratado con 1 μg de flagelina intranasal al momento del desafío con la misma dosis de bacterias.

La administración sublingual de flagelina confirió protección a la mitad de los animales independientemente de la dosis de FliC empleada (porcentajes de supervida en 2 o 4 experimentos según se indica en la figura: $47.5 \pm 3.5\%$ para FliC 5 μg ; $47.5 \pm 9.6\%$ para FliC 10 μg ; $45 \pm 7.1\%$ para FliC 50 μg) (Figura IV.4.2). Cabe destacar que los animales protegidos no presentaron bacterias en sangre en ningún momento durante el curso de la infección, mientras que los que murieron a causa de la infección presentaron bacterias en sangre a partir de las 48 horas post-desafío independientemente de haber recibido el tratamiento sublingual.

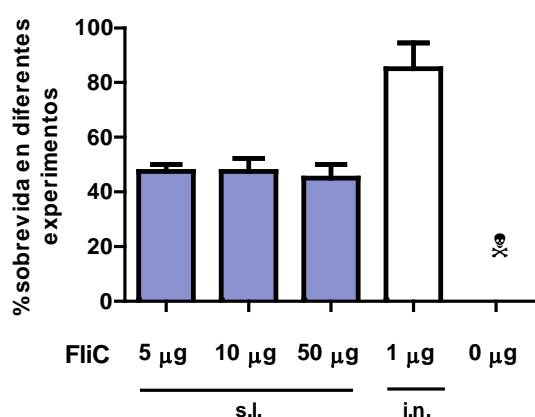


Figura IV.4.2: Inmunoterapia sublingual con flagelina para el tratamiento de la neumonía neumocócica. Ratones BALB/c ($n = 5-8$), hembras de 8-10 semanas de edad fueron anestesiadas con Ketamina/Xilacina y tratadas con la dosis indicada de flagelina en un volumen de 7 μl por ruta sublingual (s.l., barras negras). Dos horas después, los animales fueron anestesiados nuevamente para recibir un desafío intranasal con 4×10^5 UFC/50 μl de *S. pneumoniae* serotipo 1. La supervida se registró durante un máximo de 12 días. Como control de protección un grupo de animales fue tratado con 1 μg de FliC administrada por ruta intranasal junto con las bacterias (i.n., barra blanca). Como control negativo un grupo fue tratado con solución salina s.l. previo al desafío con neumococo. Las barras representan la media \pm SEM del porcentaje de supervida para cada tratamiento, en 4 experimentos diferentes (para la dosis de 10 μg s.l., 1 μg i.n. y el grupo control) o 2 experimentos diferentes para las dosis de 5 y 50 μg s.l.. El símbolo ☠ indica muerte del 100% de los animales.

En los capítulos previos se mostró que para la administración intranasal, la flagelina también podía ser protectora cuando se administraba varias horas previas al desafío. Incluso, la preadministración fue más efectiva que la coadministración en los casos en que FliC no confería altas tasas de protección como sucedió en otras cepas de ratones diferentes a BALB/c. Por esto se razonó que quizás para la administración sublingual también fuera más favorable realizar el tratamiento varias horas antes del desafío. Para corroborarlo, se administró flagelina por ruta sublingual 12 horas antes del desafío. Sin embargo, la administración previa no tuvo efecto protector frente a la neumonía invasiva (Figura IV.4.3).

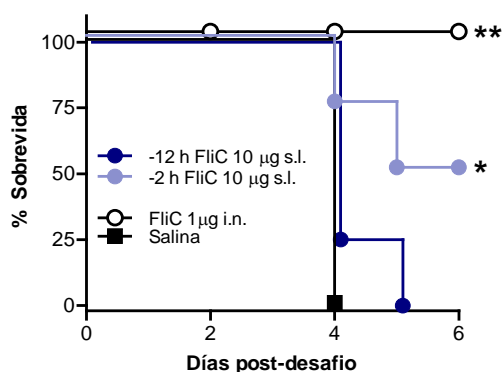


Figura IV.4.3: Influencia del tiempo de administración del tratamiento s.l. con flagelina en la protección contra la neumonía neumocócica. Hembras de 10-12 semanas de edad fueron tratadas con 10 µg de FliC por ruta s.l. 2 o 12 horas antes del desafío (n=8) con la MDL de serotipo 1 por ruta i.n.. Como control de protección se incluyó un grupo tratado con FliC i.n. al momento del desafío (n=4) y como control negativo un grupo tratado con solución salina sublingual (n=4). La supervivencia fue evaluada diariamente durante 6 días. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo tratado respecto al control fueron comparadas mediante el test de Log-rank (Mantel-Cox). Los asteriscos indican diferencias significativas para $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**). Resultados representativos de dos experimentos independientes.

IV.4.2. Efectos en los pulmones de la terapia sublingual con flagelina.

Perfil transcripcional en pulmones tras la administración de flagelina sublingual.

Con el fin de determinar si la administración sublingual de flagelina tiene efectos directos sobre el pulmón, se estudiaron los cambios temporales (2, 4, 8 y 24 horas post-tratamiento), en el perfil transcripcional de los pulmones en animales tratados con 10 µg de flagelina sublingual. Paralelamente se realizó el mismo análisis en animales tratados por ruta intranasal con 1 µg de flagelina.

Como se muestra en la *Figura IV.4.4*, la administración sublingual de flagelina indujo el aumento de varios mensajeros en los pulmones, entre los que se destacan las quimioquinas *Cxcl1* y *Ccl20*, con el aumento máximo a las 8 horas post-tratamiento y las citoquinas *Il6* e *Il21*. La citoquina proinflamatoria *Il6* presentó niveles significativamente mayores a los del grupo control a las 4 y 8 horas del tratamiento, mientras que los ARNm de *Il21* se encontraron significativamente aumentados solamente a las 8 horas post-tratamiento. *IL21*, es una citoquina vinculada a la amplificación del fenotipo Th17 y favorece la inducción de la expresión del receptor de *IL23* lo que facilita el mantenimiento y estabilización de dicho fenotipo [163]. Sin embargo, los mensajeros para *Il17a* no fueron detectados en ausencia de infección.

De la comparación con el perfil inducido por el tratamiento intranasal, se observa que la magnitud de la estimulación por la ruta sublingual es menor para todos los mensajeros. Además, la administración intranasal, pero no la sublingual, provocó el aumento de los mensajeros de los antimicrobianos típicamente producidos por el epitelio *S100a9* y lipocalina 2 (*Lcn2*) a tiempos tempranos, mientras que ninguna de las vías indujo aumentos en los mensajeros de *Ifng* y el péptido con funciones antimicrobianas hepcidina (*Hamp*).

Seguidamente se estudió el perfil transcripcional una vez instalada la infección en animales que habían sido previamente tratados con FliC s.l. y se comparó con aquéllos que solo fueron desafiados o que únicamente recibieron el tratamiento (*Figura IV.4.5*). El perfil transcripcional a las 24 horas post-infección, reveló que la terapia sublingual con flagelina favorece el aumento de los mensajeros de *Cxcl1* e *Il6* durante la infección, tanto en comparación a los animales infectados, como a los que solo recibieron FliC en ausencia de las bacterias.

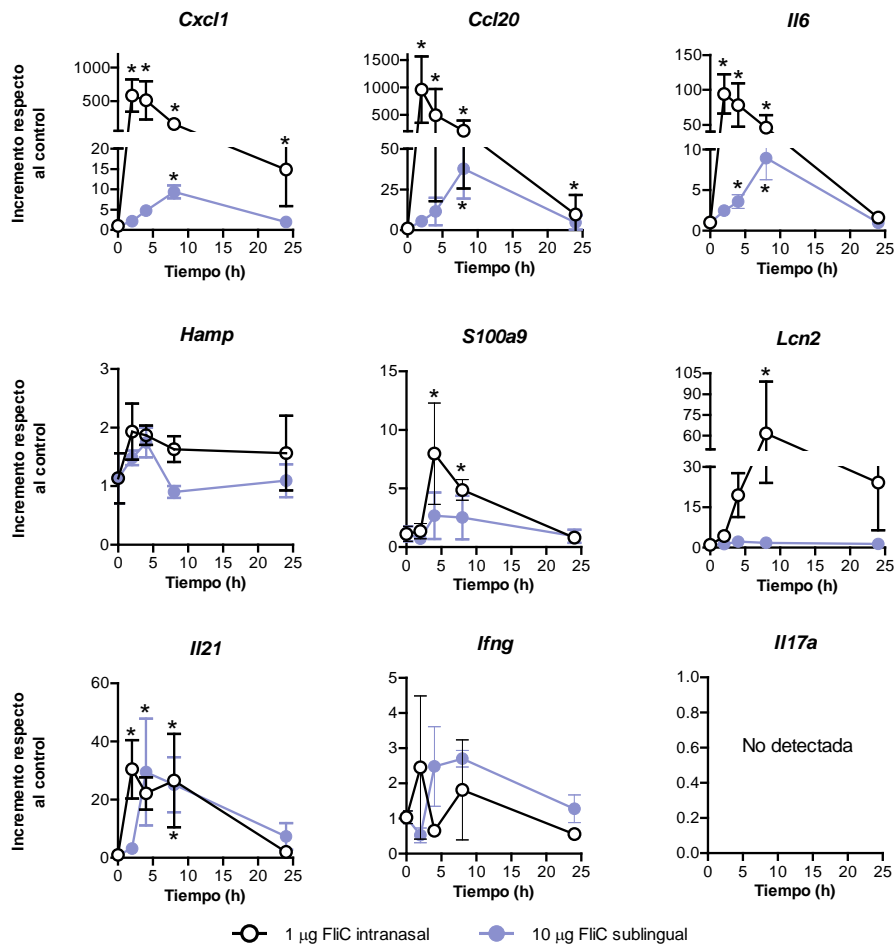


Figura IV.4.4: Comparación del perfil transcripcional en pulmones tras tratamiento sublingual e intranasal con flagelina: estudios de los cambios temporales. Ratones BALB/c ($n = 4$) de 8-10 semanas de edad fueron tratados con 1 o 10 µg de flagelina por ruta intranasal o sublingual respectivamente. A los tiempos indicados se recuperaron los pulmones y se extrajo el ARN total. La evaluación del perfil transcripcional se realizó mediante qPCR con primers específicos para los genes indicados empleando como molde el ADN copia. La cuantificación relativa se realizó por el método de $\Delta\Delta Ct$ empleando como gen de referencia interna *Actb*. Los resultados se muestran como incremento respecto al control tratado con salina. Se muestra la media \pm SEM para cada grupo de tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) a cada tiempo post-estimulación comparado mediante test de Mann-Whitney de una vía respecto al control respectivo.

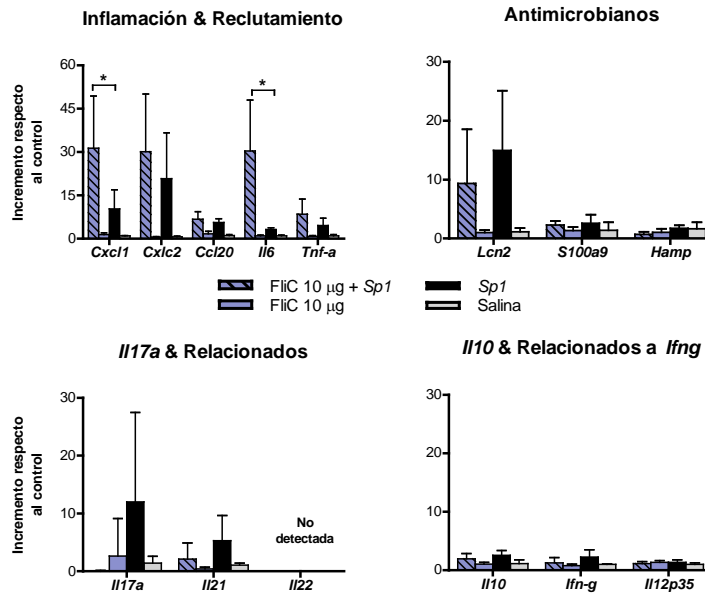


Figura IV.4.5: Perfil transcripcional en pulmones durante la infección aguda con neumococo tras el tratamiento sublingual con flagelina. Ratones BALB/c (n =7 grupos tratados con FliC y 4 grupos control) de 8-10 semanas de edad fueron tratados con 10 µg de flagelina por ruta sublingual; algunos grupos fueron infectados 2 horas después con la MDL de serotipo 1 según se indica en la figura. A las 24 horas de la infección se recuperaron los pulmones y se extrajo el ARN total. La evaluación del perfil transcripcional se realizó mediante qPCR con primers específicos para los genes indicados empleando como molde el ADN copia. La cuantificación relativa se realizó por el método de $\Delta\Delta Ct$ empleando como gen de referencia interna *Actb*. Los resultados se muestran como incremento respecto al control tratado con salina. Se muestra la media±SEM para cada grupo de tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo tratado con FliC e infectado y el grupo que se desafió sin recibir tratamiento, comparados mediante test de Mann-Whitney de una vía respecto al control respectivo

Reclutamiento de neutrófilos hacia las vías respiratorias y su rol en la protección promovida por la inmunoterapia sublingual con flagelina.

Habiéndose observado el infiltrado masivo de PMN hacia el parénquima pulmonar y los espacios aéreos tras el tratamiento intranasal con flagelina, se procedió a analizar si el tratamiento sublingual también era capaz de provocar el reclutamiento de éstos. Para ello, grupos de animales fueron tratados con flagelina o solución salina por ruta sublingual y 2 horas después fueron desafiados con la MDL de serotipo 1 por ruta intranasal. Tras 24 horas se analizó el porcentaje de PMN en parénquima pulmonar y contenido de los espacios alveolares.

Los resultados presentados en la *Figura IV.4.6*, muestran que el tratamiento sublingual con flagelina por sí sólo no induce el reclutamiento de PMN hacia los espacios alveolares. Sin embargo, cuando los animales tratados con la inmunoterapia sublingual eran luego desafiados con neumococo, se observó un aumento significativo en el reclutamiento de PMN en comparación al grupo que recibió solo el desafío. Por otra parte, el porcentaje de PMN reclutados hacia las vías aéreas en los animales previamente tratados con FliC, fue significativamente mayor en comparación al grupo infectado únicamente en las vías aéreas pero no en el parénquima pulmonar. Si bien la magnitud del reclutamiento en los alvéolos de los animales tratados y desafiados fue similar a la observada durante el tratamiento intranasal, la ausencia de fagocitos en el parénquima pulmonar podría explicar en parte la menor protección observada para la inmunoterapia sublingual en comparación con la intranasal.

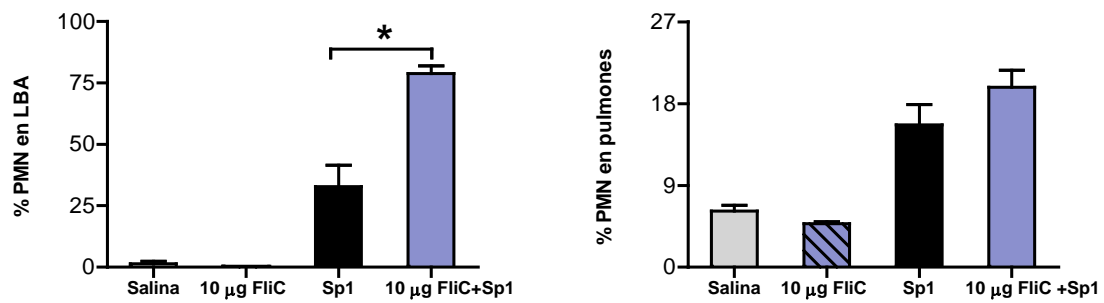


Figura IV.4.6: Efecto de la inmunoterapia sublingual con flagelina sobre el reclutamiento de neutrófilos hacia los pulmones y las vías aéreas. Ratones BALB/c, hembras de 8-10 semanas de edad fueron tratadas con 10 µg de flagelina o salina por ruta sublingual. Dos horas después un los animales fueron desafiados con la MDL de neumococo serotipo 1 por ruta i.n.. A las 24 horas se recuperaron los pulmones y contenido alveolar para análisis por citometría de flujo. La cantidad de neutrófilos se determinó como el porcentaje de células Ly6G^{alt}, CD11b^{alt}, CD11c^{neg} con respecto al total de células de pulmones o lavado broncoalveolar. Las barras representan la media ±SEM para n=4. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) para los grupos señalados según test de Mann-Whitney de una vía.

Nuevamente se empleó la estrategia de depleción de células Gr-1⁺ previo al tratamiento con FliC s.l. para corroborar el rol de estas células en la protección. De modo similar a lo observado para el caso del tratamiento intranasal, la depleción de células Gr-1⁺ revocó la protección inducida por el tratamiento s.l. con flagelina frente a la neumonía neumocócica, indicando que estas células también son cruciales para el éxito de la terapia sublingual (Figura IV.4.7).

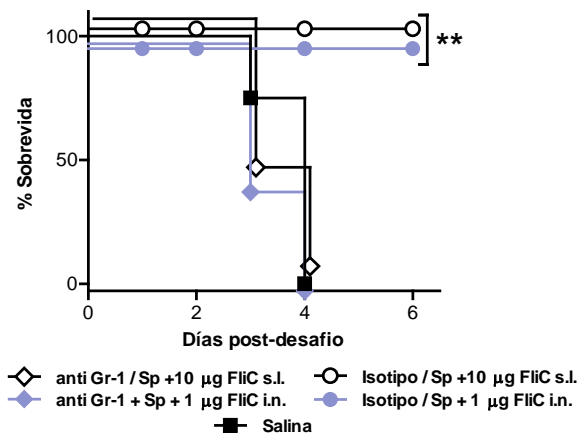


Figura IV.4.7: Depleción de células Gr-1+ en el modelo de terapia sublingual con flagelina en neumonía invasiva. Los animales (n=6) fueron tratados con 100 µg de anti Gr-1 (diamantes) o anticuerpo control (isotipo) (círculos) por ruta i.p. alcanzándose la depleción del 99% PMN en sangre chequeada por citometría de flujo a las 24 horas. Los animales fueron tratados con 10 µg de FliC s.l. (símbolos celestes) o intranasal (símbolos blancos) y dos horas más tarde fueron desafiados por vía i.n. con una dosis letal de *S. pneumoniae* serotipo 1 en solución salina. La supervivencia de los animales fue controlada diariamente. Los asteriscos representan diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier según test de Log-rank entre los grupos tratados con FliC y con anti Gr-1 o anticuerpo control ($p < 0.01$). Resultados representativos de 2 experimentos diferentes.

IV.4.3. Relevancia de los receptores TLR5 y NLRC4 durante la inmunoterapia sublingual con flagelina.

La expresión de receptores innatos en la mucosa sublingual se ha comenzado a caracterizar en años recientes. En cuanto a la expresión de los receptores innatos que reconocen flagelina, se ha reportado la expresión de TLR5 en células epiteliales de la mucosa bucal [303] y células del sistema inmune que residen en la mucosa sublingual como células dendríticas, células T CD4⁺ [304] y macrófagos [305]. Por otra parte, la expresión del receptor intracelular de flagelina NLRC4 también se ha descrito en la mucosa oral. La expresión de NLRC4 en células estromales pero no en las hematopoyéticas, es crítica para la inducción de las respuestas innatas en la cavidad oral [306]. Por lo tanto, aunque la aplicación tópica de flagelina en la mucosa sublingual debería favorecer fundamentalmente el reconocimiento extracelular de la proteína por parte de TLR5, se investigó nuevamente la contribución de ambos receptores en la protección inducida por flagelina frente a la neumonía, empleando para ello las flagelinas mutantes deficientes en la señalización vía TLR5 o NLRC4.

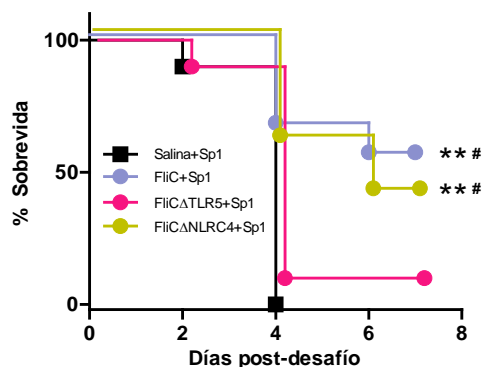


Figura IV.4.8: Importancia de la señalización vía TLR5 o NLRC4 en la protección mediada por tratamiento sublingual con flagelina frente a la neumonía neumocócica. Ratones BALB/c, hembras de 8 semanas de edad fueron anestesiadas y tratadas por ruta s.l. con 10 µg de flagelina o mutantes incapaces de señalizar por TLR5 o NLRC4, o solución salina como control. A las 2 horas los animales fueron desafiados por ruta i.n. con la MDL de serotipo 1. La supervivencia se monitoreó diariamente durante 8 días. Se muestra el porcentaje de supervivencia para n=10 por grupo de tratamiento con FliC o mutantes y n=9 para el grupo control. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo tratado fueron comparadas respecto al grupo control mediante test de Log-rank (Mantel-Cox). Los asteriscos (**) indican diferencias significativas respecto del grupo control ($p < 0.01$) y el símbolo numeral (#) diferencias significativas respecto al grupo tratado con el mutante para TLR5 ($p < 0.05$). Resultados representativos de 1 experimento.

Los animales fueron tratados con 10 µg de FliC-ΔTLR5, FliC-ΔNLRC4 o una flagelina recombinante producida en iguales condiciones pero portadora de regiones de señalización completamente funcionales para ambos receptores. Dos horas después los ratones fueron desafiados con la MDL de neumococo serotipo 1 y se controló la supervivencia de forma periódica durante 7 días. De modo similar a lo observado en el tratamiento intranasal, la carencia de un dominio funcional para la señalización por TLR5 abolió el efecto protector frente a la neumonía neumocócica. Igualmente, la incapacidad del otro mutante de activar la vía de señalización por NLRC4 no afectó la protección en la terapia sublingual (Figura IV.4.8). Estos resultados sugieren que al igual que durante la terapia intranasal la señalización vía TLR5 pero no la señalización vía NLRC4, es necesaria para el efecto protector. Nuevamente, en vista a la actual evidencia que involucra la activación del inflammasoma de NLRC4-NAIP5 a pesar del empleo de flagelinas mutadas en los residuos carboxilo terminales, cabe cuestionar la validez de estos resultados.

IV.4.4. Discusión Sección IV.4.

En este capítulo se presentó evidencia única en cuanto a la capacidad de un producto bacteriano definido, la flagelina de *S. Typhimurium*, de conferir protección frente a la neumonía neumocócica invasiva tras una única aplicación por ruta sublingual. El empleo de un producto purificado permitió caracterizar varios de los efectos de la inmunoterapia sublingual sobre la mucosa respiratoria y parte de los mecanismos inmunes relevantes para la protección contra la neumonía neumocócica.

La capacidad de flagelina de conferir protección por vía sublingual se mostró fuertemente dependiente del momento de aplicación del tratamiento respecto a la infección. A diferencia de lo observado para el caso de la terapia intranasal, la administración sublingual 12 horas previas al desafío no confirió protección. En cambio, la administración 2 horas antes del desafío letal con neumococo promovió la sobrevida en el 50% de los animales que recibieron el tratamiento, lo que sugiere un mecanismo de protección basado en la activación transitoria del sistema inmune innato. El análisis del perfil transcripcional en pulmones en particular para los mensajeros de *Cxcl1*, *Ccl20* e *Il6*, refuerza esta visión. Tanto la terapia i.n. como la s.l. provocaron el aumento transitorio de estos mensajeros, pero mientras que la primera induce niveles aumentados por un período de hasta 24 horas, en el caso de la terapia sublingual el aumento de los niveles de estos mensajeros en comparación a un ratón normal, solo se observó en un punto temporal.

El perfil transcripcional una vez más sugiere la importancia de ciertas quimioquinas y la interleuquina 6 en la protección, posiblemente vinculadas al reclutamiento y activación de los neutrófilos. De hecho, el análisis del contenido alveolar realizado por citometría y los experimentos de depleción empleando anti-Gr1 indican que al igual que en tratamiento intranasal, los PMN son necesarios para la protección. Cabe destacar que el mayor reclutamiento de PMN solo se observó en animales tratados que luego fueron desafiados pero no en aquellos que solo recibieron el tratamiento sublingual con flagelina. Esto podría estar indicando que la administración sublingual de algún modo genera una preactivación facilitando el posterior reclutamiento de fagocitos hacia las vías respiratorias tras el estímulo infeccioso.

De manera similar que para el caso de la terapia intranasal, la señalización vía TLR5 fue fundamental para la protección, mientras que la vía activada por el reconocimiento de flagelina a través de NLRC4 no fue necesaria para el efecto terapéutico.

Aunque a grandes rasgos los efectos de la administración de flagelina sublingual e intranasal son similares, cabe preguntarse si los modos de acción pueden ser iguales a pesar de tratarse en un caso de la administración local y directa en el sitio de infección y en el otro en una mucosa distante.

En la mucosa oral, el epitelio constituye la barrera de permeabilidad más importante y determina qué tipo de sustancias pueden atravesarlo alcanzando el torrente sanguíneo y cuáles son excluidas [307,308]. La mucosa sublingual constituye una barrera epitelial no queratinizada y es la región más permeable de la cavidad oral, permitiendo el pasaje de diversos compuestos [309]. Las células

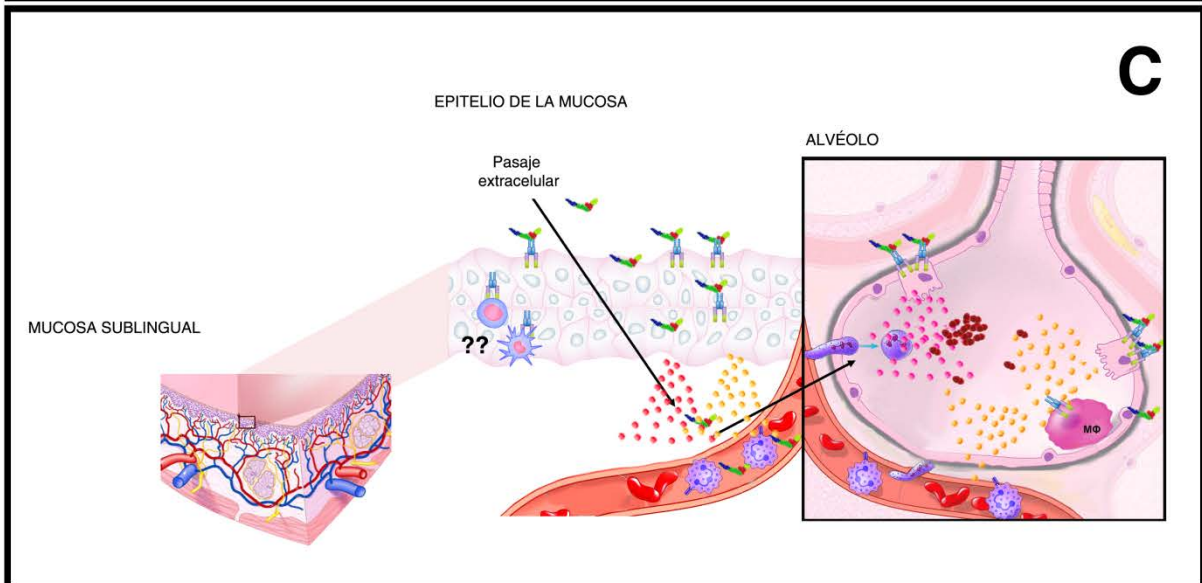
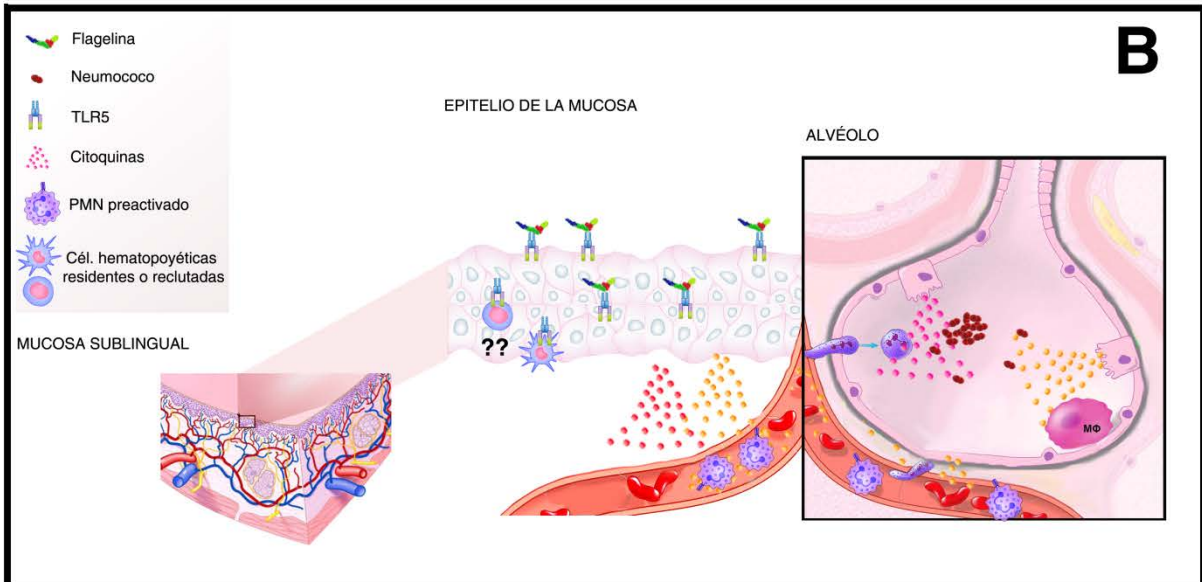
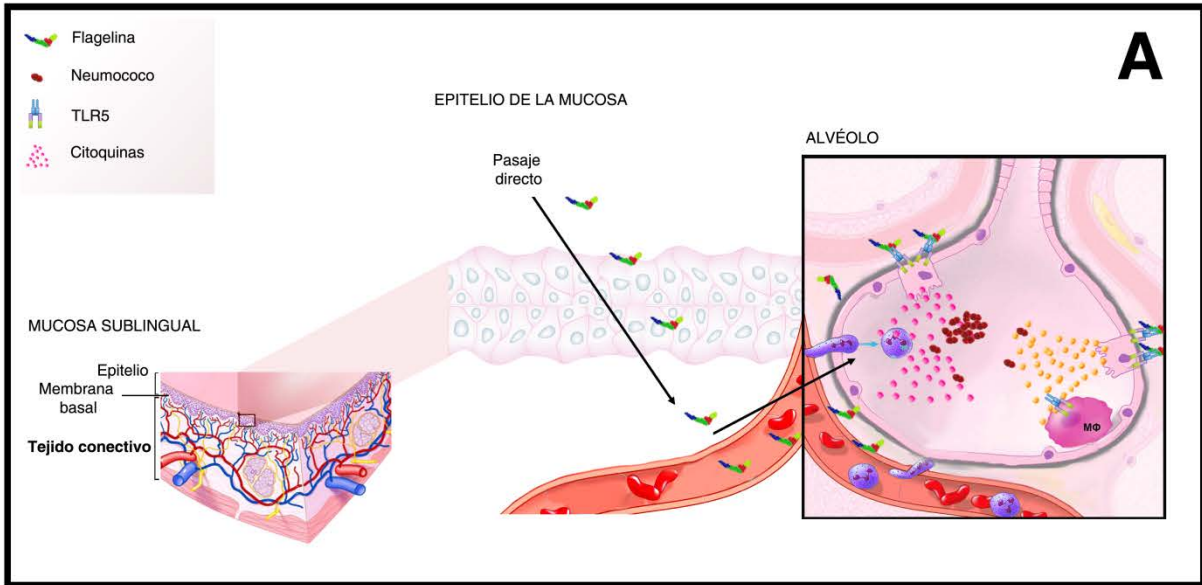
epiteliales pueden permitir el pasaje a través de la mucosa por uno de tres mecanismos: difusión pasiva, transporte mediado por transportadores o endocitosis/exocitosis, donde los compuestos son tomados activamente y excretados mediante la ruta endocítica [310]. Por lo tanto, una vez en contacto con el epitelio de la mucosa sublingual, la flagelina podría ganar acceso al torrente sanguíneo y alcanzar el epitelio pulmonar. Dado que las células epiteliales alveolares expresan normalmente TLR5 en su cara basal [267], podrían reconocer la flagelina y desencadenar así la respuesta local, provocando la secreción de quimioquinas, reclutamiento de PMN y finalmente la eliminación de las bacterias (*Figura IV.4.9 panel A*).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el epitelio oral expresa TLR5 [303] por lo que podría reconocer la flagelina y activarse de forma similar a como lo hace el epitelio pulmonar produciendo quimioquinas de la familia ELR-CXC y citoquinas inflamatorias. Otras células de origen hematopoyético o reclutadas descritas en la mucosa sublingual [115,311] también podrían colaborar en el reconocimiento local de flagelina y producir citoquinas y quimioquinas en respuesta a ella. La activación de los neutrófilos consiste en un proceso de dos pasos, donde en primer lugar debe darse la preactivación por parte de citoquinas inflamatorias o el contacto con células endoteliales activadas, y luego la exposición a componentes bacterianos para que tenga lugar la degranulación y activación de la NADPH oxidasa [52]. Entonces, la aplicación sublingual de flagelina podría colaborar en la preactivación de los PMN que recibirían la segunda señal por parte de los PAMPs del neumococo (*Figura IV.4.9 panel B*).

El efecto protector podría también ser el resultado de la combinación de ambos escenarios (*Figura IV.4.9 panel C*).

Estudios realizados por van Maele y colaboradores [312], mostraron que la administración sistémica de flagelina induce a través de células dendríticas, la activación rápida del sistema inmune a nivel sistémico y en las mucosas. En los pulmones, el perfil de la respuesta inducida se caracterizó por la producción de IL22 e IL17 producidas por una población minoritaria de células CD3⁺CD127⁺. El perfil observado tras la administración sublingual no mostró incremento en estos mensajeros, lo que desfavorecería la contribución del pasaje directo de FlIC al torrente sanguíneo. La elucidación precisa del mecanismo requerirá de investigación adicional en el futuro para determinar el mecanismo de acción preciso de la terapia sublingual.

Figura IV.4.9: Posibles modos de acción de la terapia sublingual con flagelina. Se plantean tres posibles alternativas para mecanismos por los que la aplicación sublingual de flagelina induce protección contra la neumonía neumocócica. **Panel A:** El epitelio de la mucosa sublingual podría permitir el pasaje directo de flagelina hacia el torrente sanguíneo permitiendo que alcance los capilares en estrecho contacto con el epitelio alveolar. Los cambios en la permeabilidad vascular causados por la infección local facilitarían el pasaje de flagelina fuera de los capilares permitiendo el contacto con el epitelio alveolar. El TLR5 localizado basalmente en los neumocitos tipo II reconocería la flagelina potenciando los mecanismos innatos para la eliminación del neumococo. **Panel B:** El receptor TLR5 expresado en el epitelio de la mucosa sublingual reconocería la flagelina administrada localmente, desencadenando la producción local de citoquinas inflamatorias y quimioquinas. Células de origen hematopoyético residentes o reclutadas a la zona de aplicación podrían también participar en el reconocimiento de FlIC. Las citoquinas y quimioquinas producidas en la región sublingual serían responsables de la preactivación de los PMN más tarde reclutados por la infección. La preactivación de los mismos permitiría la eliminación eficiente del neumococo. **Panel C:** Contribución de ambos mecanismos.



IV.5. Flagelina como adyuvante en vacunas de aplicación sublingual.

De todas las intervenciones médicas, la vacunación es una de las que ha tenido mayor impacto en la salud pública en los últimos 200 años. Al presente, la mayoría de las vacunas aprobadas para uso humano son de aplicación parenteral, a excepción unas pocas de aplicación mucosa, que son en su mayoría de administración oral o subcutánea excepto por una sola de aplicación intranasal (revisado en [112]).

Aunque la vacunación parenteral es efectiva para inducir respuestas a nivel sistémico, su capacidad de promover respuestas a nivel de las mucosas es en general pobre. Dado que la mayoría de los patógenos colonizan e invaden el organismo a través de las superficies mucosas, en los últimos años la investigación se ha dirigido hacia el desarrollo de vacunas que puedan aplicarse directamente en ellas. Esta estrategia presenta varias ventajas, ya que además de inducir respuestas a nivel local, favorece la inmunidad en mucosas distantes y a nivel sistémico y posibilitan la generación de inmunidad de rebaño mediante la generación de respuesta que previenen la colonización, o en el caso de vacunas a microorganismo vivo atenuado, permitiendo que el mismo alcance a la población no vacunada, como se observa para la vacuna oral contra la poliomielitis. En particular, en el caso de las infecciones respiratorias, la vacunación mucosa es una estrategia muy interesante que ha demostrado efectividad frente a diversos patógenos (revisado en [114]).

Otro aspecto positivo de la vacunación mucosa está dado por la versatilidad en las formulaciones, admitiendo diversos modos de entrega y en general con formulaciones más económicas que las parenterales. Además, admiten sistemas de entrega libres de agujas, lo que en general mejora la adhesión de la población al programa de inmunización [313].

Las vacunas basadas en el empleo de microorganismos atenuados o muertos han sido exitosas contra distintas enfermedades incluyendo poliomielitis, viruela y sarampión, y varias están siendo evaluadas contra nuevos patógenos [314]. Sin embargo, la seguridad de este tipo de vacunas ha sido cuestionada, motivando la investigación y el desarrollo de vacunas basadas en componentes purificados (comúnmente llamadas "vacunas a subunidad"). Estas vacunas resultan atractivas dado que se trata de formulaciones altamente caracterizadas y en ese sentido, más seguras. Sin embargo, la capacidad inmunogénica de las vacunas a subunidad es en general pobre y requieren de adyuvantes [315]. El desarrollo de adyuvantes de aplicación mucosa no ha acompañado los adelantos en el descubrimiento de nuevos antígenos y sistemas para su producción y purificación, constituyendo el paso limitante. Por tanto, la investigación en este campo es fundamental para promover la generación de nuevas formulaciones para la inmunización en mucosas.

La flagelina es un adyuvante efectivo en combinación con antígenos proteicos de diversa naturaleza, administrados por vía mucosa o sistémica. Sin embargo, al presente no existen antecedentes sobre su utilidad como adyuvante en vacunas de aplicación sublingual.

Dadas las ventajas de la ruta sublingual en términos de seguridad y facilidad de aplicación, sumadas a los resultados presentados en el capítulo anterior que muestran la capacidad de flagelina de activar la respuesta inmune innata al ser administrada por esta ruta, resultó interesante evaluar su capacidad como adyuvante sublingual. Este último capítulo aborda el tema, empleando la ovoalbúmina (OVA) como antígeno modelo y el sistema de entrega sublingual ya descrito.

A continuación se presentan resultados que sugieren a flagelina de *S. Typhimurium* como candidato a ser empleado como adyuvante en la formulación de vacunas sublinguales. Flagelina promovió el desarrollo de la respuesta humoral específica contra el antígeno a nivel sistémico. Usando las flagelinas mutantes incapaces de señalar por TLR5 o NLRC4 se comprobó que la señalización por un solo receptor es suficiente para la potenciación de la respuesta humoral específica para el antígeno.

Asimismo, se confirmó que flagelina promueve la expresión de moléculas coestimuladoras en células dendríticas derivadas de médula ósea, lo que podría ser al menos en parte el mecanismo detrás del efecto adyuvante. Mediante la transferencia adoptiva de células T-CD4⁺ transgénicas que expresan un TCR que reconoce específicamente un fragmento de OVA presentado en el contexto del MHC-II, se confirmó que flagelina promueve la activación más eficiente de células T vírgenes tras una única inmunización, siendo los ganglios submaxilares y cervicales la principal localización anatómica donde se desencadena la respuesta.

Adicionalmente, mediante técnicas de imaginología molecular se realizó un ensayo preliminar para estudiar la localización anatómica del antígeno en el tiempo tras la vacunación sublingual o intranasal. Por último, en otro ensayo preliminar, se corroboró que la capacidad de flagelina de inducir una respuesta humoral específica de antígeno no es exclusiva para OVA, sino que también se observa cuando es administrada por ruta sublingual en conjunto con un toxoide derivado de la citolisina de neumococo neumolisina.

IV.5.1. Efecto de flagelina en la respuesta humoral específica de antígeno tras la vacunación sublingual: evaluación a nivel sistémico.

Para comprobar la capacidad adyuvante de flagelina en una vacuna de administración sublingual se vacunaron ratones BALB/c por dicha ruta sublingual con 100 μ g de ovoalbúmina sola o combinada con 10 μ g de flagelina, en un régimen de vacunación más dos recuerdos a los días 14 y 21. Los animales se sangraron previo a la vacunación y a los recuerdos y 10 a 20 días después de la última inmunización. El título de anticuerpos específicos para OVA en suero fue determinado por ELISA en referencia a un suero positivo de referencia, tal y como se describió en *Materiales & Métodos*.

La vacunación sublingual no indujo aumento del título de anticuerpos hasta la aplicación de la tercera dosis de la vacuna. La evaluación de los sueros a partir de los 10 días de la última dosis reveló un aumento del título de IgM y de IgG total específicas para OVA en aquellos animales vacunados por ruta s.l. con flagelina en comparación a los que solo recibieron el antígeno (*Figura IV.5.1, paneles A y B*).

Con el fin de comparar la respuesta inducida por la vacunación s.l. y la intranasal, paralelamente se vacunaron ratones BALB/c con OVA y OVA+FliC por dicha ruta. Dado que la respuesta inducida por la vacunación intranasal suele ser de mayor magnitud que la sublingual, y para evitar la inflamación exacerbada en las vías respiratorias, se emplearon dosis de antígeno y adyuvante 10 veces menores a las utilizadas en la vacunación sublingual (10 y 1 μ g respectivamente). Se confirmó que flagelina también promueve el aumento del título de anticuerpos específicos para OVA en suero, en comparación a los animales que solo recibieron el antígeno, aunque no se observó aumento en el título de IgM (*Figura IV.5.1, paneles A y B*).

Además se estudió el perfil de las subclases. Éste fue similar para ambas rutas, encontrándose niveles significativamente mayores de IgG1 e IgG2b en los animales vacunados con OVA + flagelina. El nivel de anticuerpos de la subclase IgG2a también se elevó en los animales que recibieron la vacuna con adyuvante, aunque modestamente (*Figura IV.5.1, paneles C-D*). Los niveles de IgG3 se encontraron en todos los casos por debajo del límite de detección del ELISA. IgA tampoco fue detectada en suero.

El cociente IgG1/IgG2a en los animales vacunados con FliC fue de 9.3 y 8.9 para la vacunación por rutas s.l. e i.n. respectivamente, lo que podría sugerir un perfil predominante de tipo Th2. Sin embargo, esto deberá ser confirmado mediante la evaluación del perfil de citoquinas en células T CD4⁺ aisladas de animales vacunados con OVA con y sin FliC.

El análisis de la respuesta humoral de ratones C57/BL6 sometidos al mismo esquema de vacunación reveló resultados similares, sugiriendo que la capacidad inmunopotenciadora de flagelina es independiente del genotipo de los animales.

En suma, el perfil de anticuerpos en suero reveló que la administración conjunta de flagelina con el antígeno por ruta sublingual potencia el desarrollo de la respuesta humoral con un perfil de subclases

similar al inducido tras la vacunación intranasal, que sugiere un componente Th2 con un aumento de IgG2a que podría indicar una contribución Th1.

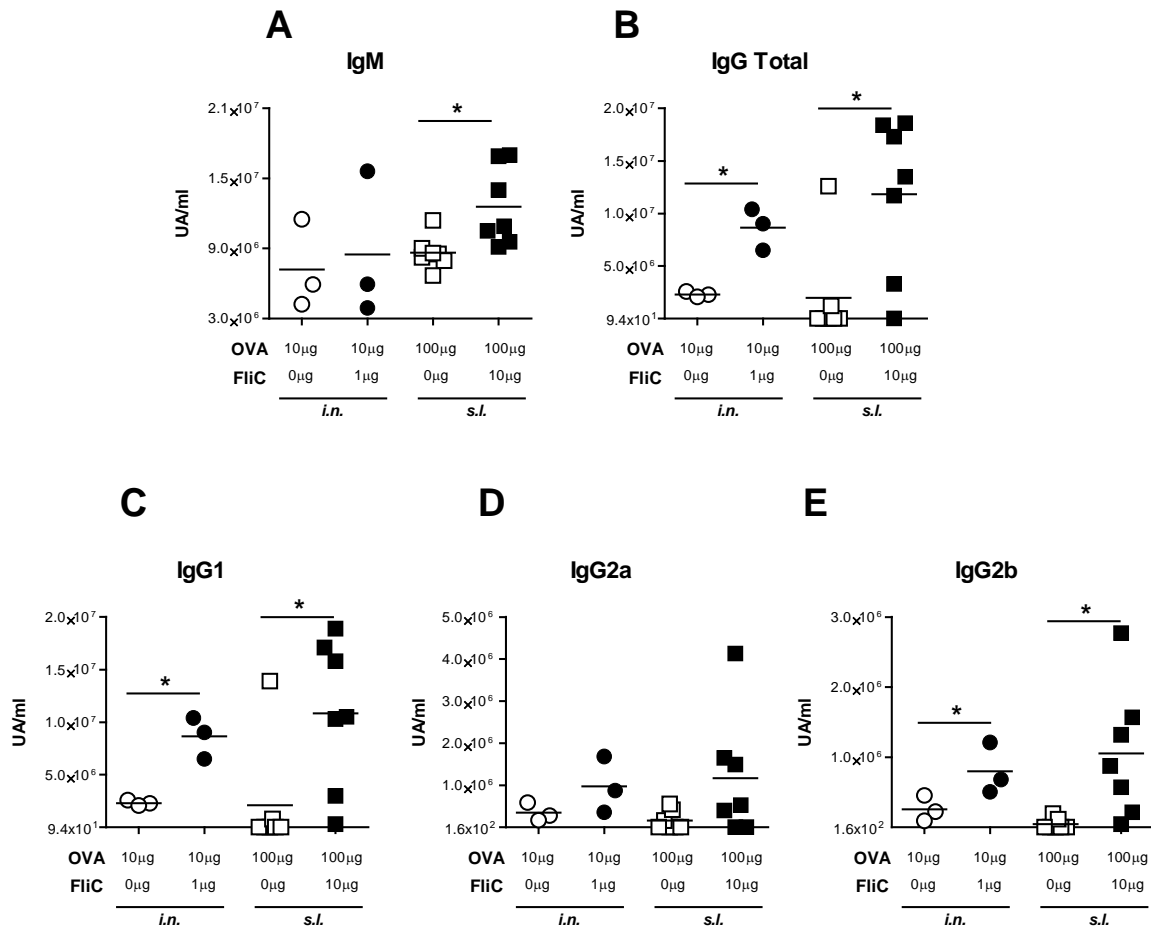


Figura IV.5.1: Respuesta humoral específica contra aOVA en suero tras la vacunación sublingual o intranasal empleando flagelina como adyuvante. Ratones BALB/c de 10-12 semanas de edad fueron vacunados bajo anestesia con 100 µg de OVA o la misma dosis en conjunto con 10 µg de flagelina en un volumen de 10 µl volumen total. Paralelamente, otros animales recibieron 10 µg de OVA o 10 µg de OVA + 1 µg de FliC por ruta intranasal. En todos los casos se empleó un esquema de inmunización de una dosis más 2 recuerdos a día 14 y 21. Se recolectaron muestras de sangre de todos los individuos previo a la vacunación y a cada recuerdo y entre 10 y 20 días tras la tercera inmunización. La cantidad de anticuerpos específicos anti-OVA se determinó mediante ELISA. El título se calculó a partir de la construcción de una curva de calibración empleando un suero control positivo y se expresa en unidades arbitrarias por ml (UA/ml). Los gráficos muestran el título a día 35. Los símbolos (cuadrados o círculos) representan a cada individuo vacunado con OVA por ruta sublingual o intranasal respectivamente, en conjunto con flagelina (símbolos negros) o salina (símbolos blancos). Las barras horizontales representan la media. La comparación entre cada grupo vacunado con FliC y su control sin adyuvante se realizó mediante test de Mann-Whitney de una vía y las diferencias significativas se indican con asteriscos para $p < 0.05$. Resultados representativos de 4 experimentos independientes.

IV.5.2. Importancia de la señalización por TLR5 y NLRC4 en el efecto adyuvante de flagelina.

El efecto adyuvante de flagelina ha sido tradicionalmente atribuido a su capacidad de promover respuestas inflamatorias potentes a través de la señalización por TLR5, tal y como se ha propuesto para otros ligandos de TLRs (revisado en [316]). En los últimos años diversa evidencia ha señalado a los NLRs como otros receptores innatos importantes en la inducción de respuestas adaptativas .

Dada la capacidad de FliC de señalizar por ambas vías, resultó interesante estudiar la contribución de ambos receptores en la inducción de la respuesta humoral específica inducida tras la vacunación sublingual.

Para comprobarlo, los animales fueron inmunizados por ruta s.l. siguiendo el mismo esquema de vacunación descrito antes, empleando ahora los mutantes de flagelina incapaces de señalizar por TLR5 o NLRC4 en conjunto con OVA y en paralelo una flagelina recombinante con capacidad de activar ambas vías.

El análisis de los niveles de IgG total específicos para OVA en suero reveló que el título de anticuerpos se encontraba elevado en todos los grupos que recibieron flagelina, independientemente de su capacidad de señalizar por uno u otro receptor comparado con los animales que solo recibieron el antígeno. Es interesante destacar que el incremento de IgG inducido por las flagelinas mutantes fue similar al inducido por la flagelina nativa, lo que sugiere que la activación de una u otra vía de señalización es redundante en cuanto a la inducción de la respuesta humoral. Dado que no se contaba con una flagelina doblemente mutada sin capacidad de señalizar por ninguno de los dos receptores, no puede descartarse la existencia de otro receptor adicional que pueda mediar dicho efecto.

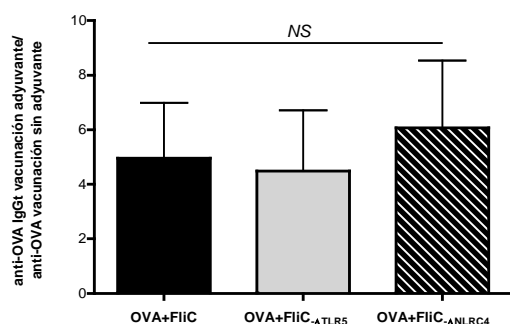


Figura IV.5.2: NLRC4 y TLR5: implicancia de los receptores en la capacidad de FliC de promover la respuesta humoral cuando es empleada como adyuvante en vacunación sublingual. Ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad ($n=7$ /grupo) fueron inmunizados por ruta s.l. con 100 μ g de OVA sola o junto con 10 μ g de FliC o el mutante deficiente en la señalización por TLR5 (FliC- Δ TLR5), o deficiente para la activación de la vía NLRC4 (FliC-NLRC4). Los animales recibieron 3 dosis por ruta s.l. a días 0, 14 y 21. Los sueros para determinación de IgG total anti-OVA se obtuvieron a día 35 y se evaluaron por ELISA. Los resultados se expresan como incremento del título en animales vacunados con OVA y flagelina o mutantes respecto del título de los que recibieron solo OVA. Las barras representan la media \pm SEM. La comparación entre grupos se realizó mediante ANOVA de una vía (Test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn) para $p<0.05$. NS: no significativo.

IV.5.3. Efecto del uso de flagelina como adyuvante en la estimulación de linfocitos T vírgenes: comparación de las rutas sublingual y nasal.

Seguidamente se investigó si flagelina era capaz de promover una activación más eficiente de células T vírgenes tras una única inmunización. Como linfocitos vírgenes se emplearon linfocitos purificados de ratones transgénicos OT-II. En estos ratones los linfocitos T-CD4 presentan un receptor T transgénico que permite el reconocimiento específico del péptido 323-339 de OVA en MHC-II (IA-b). Los linfocitos OT-II fueron marcados con CFSE de modo de poder seguir su proliferación por citometría de flujo y luego transferidos por vía intravenosa a ratones C57/BL6. Tras 24 horas, los animales recibieron OVA u OVA+FliC por ruta sublingual o intranasal y la proliferación de los linfocitos T-CD4⁺ fue evaluada en pulmones, ganglios submaxilares/cervicales, mediastinales y bazo 4 días después de la inmunización.

Como se muestra en la *Figura IV.5.3*, una única inmunización con OVA+FliC por ruta sublingual indujo un aumento significativo de la proliferación *in vivo* de los linfocitos T CD4⁺ en ganglios submaxilares/cervicales en comparación a los ratones que solo recibieron el antígeno. Una leve proliferación se observó en los mismos animales en ganglios mediastinales y bazo sugiriendo que tras la inmunización, la activación de las células T ocurre casi exclusivamente en los ganglios drenantes de la mucosa sublingual.

En comparación, la respuesta inducida por vía intranasal fue de mayor magnitud que la proliferación inducida por la vacunación sublingual. Además, el principal sitio de inducción de la respuesta fueron los ganglios mediastinales. Igualmente, la proliferación se observó en ganglios submaxilares/cervicales y bazo. El análisis en ganglios mediastinales no reveló diferencias entre los animales vacunados con OVA u OVA+FliC, probablemente debido a la saturación de la misma por la potente estimulación. En cambio, el análisis en bazo y ganglios mediastinales sí mostró diferencias donde la proliferación se vio favorecida en aquellos animales que recibieron FliC. En ningún caso se observó proliferación en los pulmones.

En suma, la vacunación s.l. empleando flagelina como adyuvante, favorece la activación primaria de células T colaboradoras, la cual tiene lugar principalmente en los ganglios drenantes de la mucosa sublingual. Sin embargo, a las dosis de antígeno y adyuvante empleados, la ruta intranasal logró inducir una respuesta de mayor magnitud que la sublingual.

IV.5.4. Efecto de flagelina sobre el procesamiento antigénico.

El efecto adyuvante está íntimamente relacionado a la capacidad de los inmunostimulantes de promover el procesamiento antigénico y la activación de células presentadoras. El estado activado de estas células presentadoras, caracterizado por la expresión elevada de MHC-II y moléculas coestimuladoras, favorece la activación en los ganglios de células T específicas para el antígeno capturado en la periferia [317]. Las células dendríticas juegan un rol importante en la inducción de respuestas T y B específicas tras la vacunación sublingual, en particular aquéllas de fenotipo CCR7^{pos}, CD11c^{pos}, CD8 α ^{neg} o CD8 α ^{pos} [318].

Dadas la existencia de limitaciones técnicas para obtener dichas células purificadas a partir de la mucosa sublingual, se empleó una aproximación experimental *in vitro* para estudiar la capacidad de la flagelina empleada en los ensayos de vacunación de promover la activación de células dendríticas diferenciadas a partir de precursores de médula ósea en presencia de GM-CSF (del inglés: *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*).

El primer paso tras la obtención de las células dendríticas fue su caracterización por citometría de flujo. Del total de células obtenidas el 90% fueron positivas para CD11c y el 83% fueron células doble-positivas CD11c-CD11b. A su vez, dentro de la población CD11c^{pos}/CD11b^{pos} la mayor parte de las células correspondieron a células positivas para los marcadores MHC-II (88.7%) y CD8 α (94.5%), encontrándose además menor frecuencia de células positivas para CD103 (13.1%) y B220 (4.5%). El fenotipo determinado por estos marcadores de superficie no se modificó por estimulación con LPS (no mostrado) o tras la incubación con flagelina durante 24 horas (*Figura IV.5.4*).

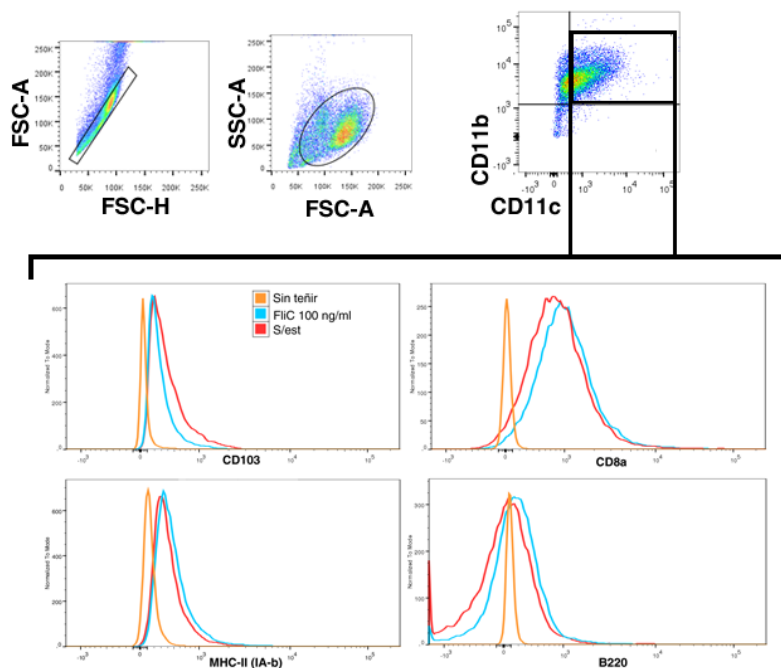


Figura IV.5.4. Caracterización fenotípica de células dendríticas derivadas de médula ósea. Las células dendríticas se obtuvieron a partir de precursores de médula ósea de ratones C57/BL6 cultivados en presencia de GM-CSF. Tras 7 a 9 días de cultivo, las células fueron colocadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 2 a 3×10^5 células/200 μ l y se estimularon durante 24 horas con 100 ng/ml de FltC libre de LPS (celest). Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el marcado con anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos según se indica en la figura, previo bloqueo de los receptores Fc. El análisis por citometría de flujo se realizó para determinar la expresión de B220, CD8 α , MHC-II y CD103 en células doble positivas para CD11b y CD11c. Como control se emplearon células sin estimular (línea roja). La línea anaranjada muestra el control sin tñir. En todos los casos se empleó LPS 200 ng/ml verificándose la capacidad de respuesta de las células (no mostrado). En verde se indica el nivel de fluorescencia basal. Resultado representativo de 2 experimentos independientes.

Seguidamente se estudió la influencia de flagelina sobre la expresión de marcadores de activación en estas células. Tras 24 horas de estimulación con 100 ng/ml de flagelina, se comparó la media geométrica de fluorescencia para CD80, CD86, CD40 y MHC-II con respecto a las células sin estimular. Como puede observarse en la *Figura IV.5.5*, flagelina indujo un leve aumento en la expresión de MHC-II y el aumento importante de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86. Esto sugiere que el efecto adyuvante de flagelina podría ser, al menos en parte, consecuencia de una activación más eficiente de las células presentadoras.

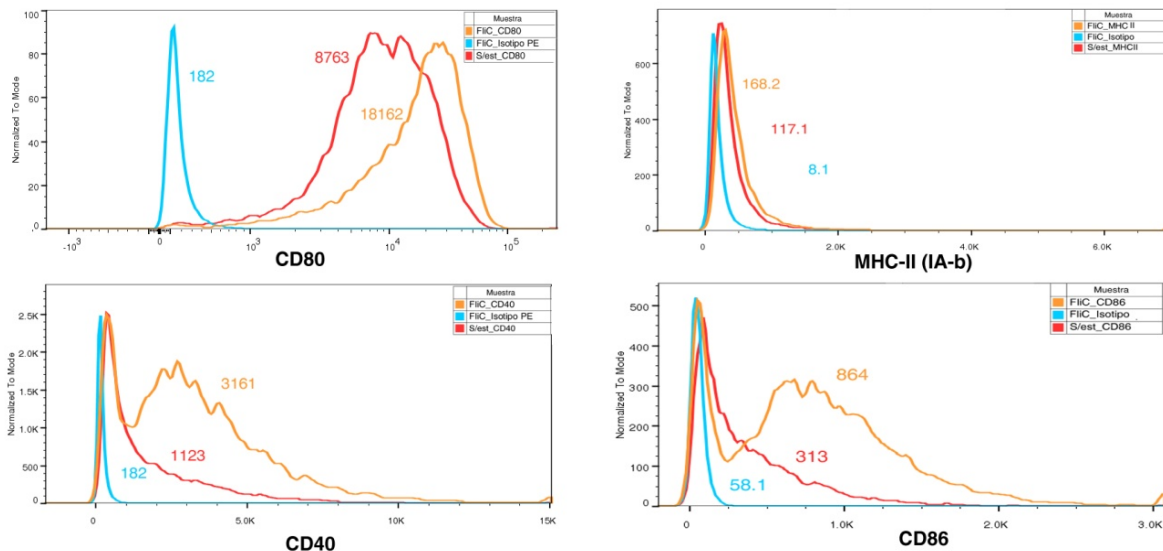


Figura IV.5.5. Capacidad de flagelina de inducir el aumento de moléculas coestimuladoras en células dendríticas. Células dendríticas obtenidas como se describió anteriormente y cultivadas a una densidad de $2 \text{ a } 3 \times 10^5$ células/200 μl , se incubaron durante 24 horas en presencia de 100 ng/ml de FliC libre de LPS o medio. Transcurrido el tiempo de incubación, las células estimuladas (líneas anaranjadas) y no estimuladas (líneas rojas) se marcaron empleando anticuerpos conjugados específicos para CD80, CD86, MHC-II o CD40 o el control isotípico correspondiente (líneas celestes). En todos los casos se empleó LPS 200 ng/ml verificándose la capacidad de respuesta de las células (no mostrado). Los números indican la media geométrica de fluorescencia promedio para los duplicados de cada condición.

A continuación se determinó la capacidad de las células dendríticas diferenciadas *in vitro* de procesar efectivamente el antígeno por la vía endosomal, requerimiento para la presentación en el contexto de MHC-II. Para ello se empleó un derivado de la OVA denominado OVA-DQ, que consiste en OVA conjugada a un compuesto capaz de emitir fluorescencia a 515 nm tras ser excitado a 505nm. Dado que la OVA-DQ porta una molécula que apantalla la fluorescencia, la señal solo es detectada cuando se produce la degradación de la proteína. La OVA-DQ al igual que la OVA es internalizada mediante el receptor de manosa y dirigida a la ruta endosomal para su procesamiento, por lo que la señal en el canal verde se puede tomar como indicio de procesamiento antigénico.

Empleando esta estrategia, se investigó si flagelina favorecía el procesamiento antigénico *in vitro* en las células dendríticas. Las células se incubaron con OVA-DQ sola o en presencia de FliC durante 15, 45 y 90 minutos, tiempo tras el cual se determinó el porcentaje de células CD11c^{POS} positivas para fluorescencia en el canal verde.

Los gráficos de barras presentados en la *Figura IV.5.6* mostraron que el tratamiento con flagelina no aumentó de forma significativa el porcentaje de células que procesaron el antígeno a los tiempos indicados.

Además se realizó el análisis del índice medio de fluorescencia (IMF: definido como la media de fluorescencia del grupo estimulado/media de fluorescencia del grupo sin estimular). Aunque las células tratadas con FliC presentaron un IMF mayor que el control sin estimular o tratado con FliC tripsinizada, la diferencia fue sutil. Histogramas representativos del análisis se muestran en la *Figura IV.5.6*. y el valor del IMF para cada grupo se detalla en la *Tabla IV.5.i*.

Tabla IV.5.i: Nivel de procesamiento antigénico (OVA-DQ) en células dendríticas derivadas de médula ósea expresado como Índice Medio de Fluorescencia (IMF) en FITC						
	15 minutos		45 minutos		90 minutos	
	<i>IMF</i>	<i>Desvío</i>	<i>IMF</i>	<i>Desvío</i>	<i>IMF</i>	<i>Desvío</i>
OVA	4.33	0.13	7.46	0.49	7.43	0.02
OVA+FliC	5.63	0.11	8.38	0.46	7.67	0.01
OVA+LPS	5.77	0.17	8.29	0.17	6.98	0.15
OVA+FliC/T	4.58	0.01	6.81	0.42	7.26	0.52
S/est	1.01	0.01	1.00	0.1	1.00	0

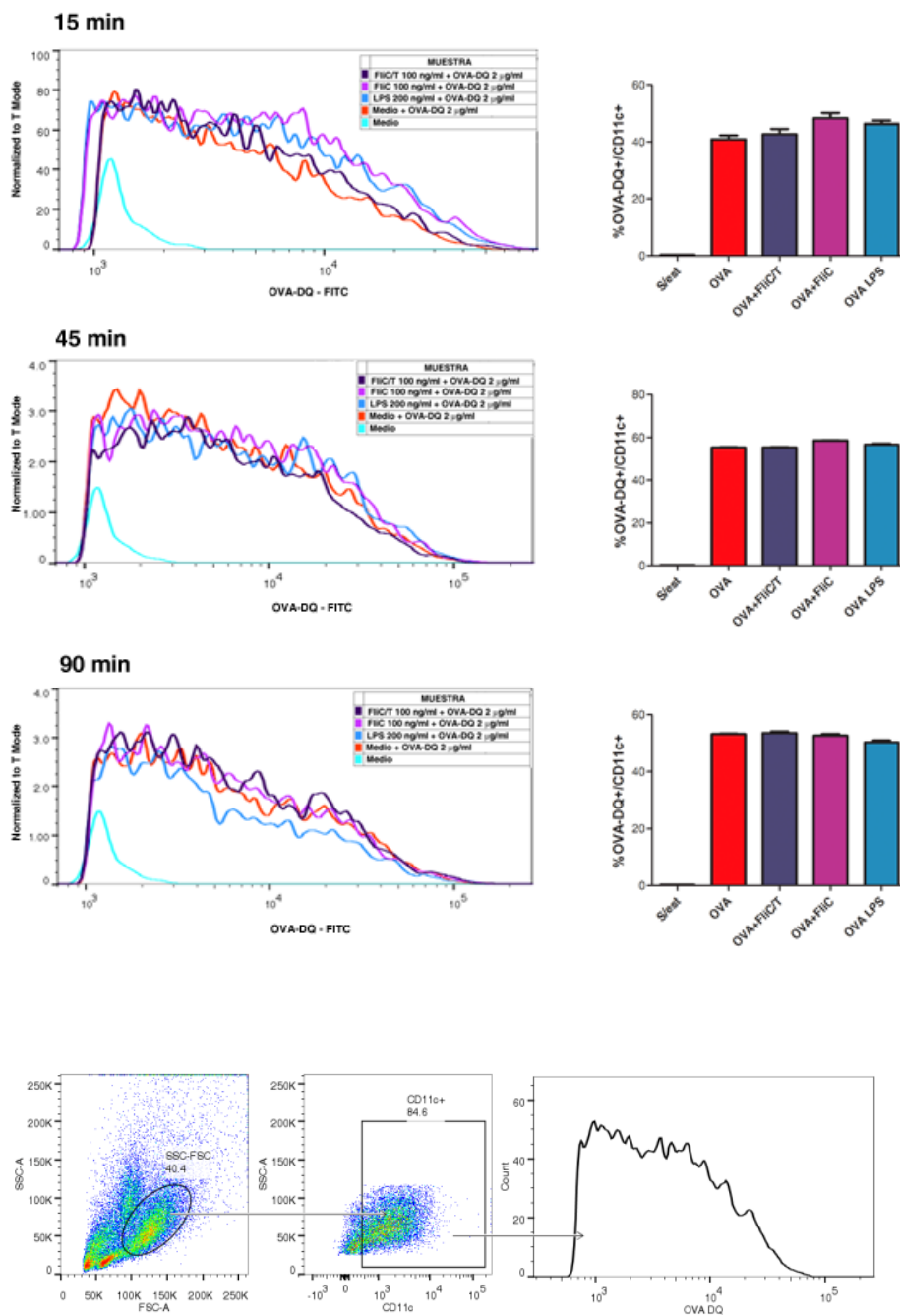


Figura IV.5.6. Procesamiento antigénico en células dendríticas derivadas de médula ósea. Las células dendríticas derivadas de médula ósea fueron estimuladas con 2 µg/ml de OVA-DQ sola o con 100 ng/ml de FIIC durante 15, 45 o 90 minutos. Al cabo del tiempo de incubación, las células se incubaron en hielo y se marcaron con ant-CD11c-PECy5.5, previo bloqueo de los receptores Fc. La cantidad de OVA internalizada y procesada se midió como fluorescencia en el canal verde. Los histogramas muestran la fluorescencia en el canal verde para células sin estimular (celeste), estimuladas con FIIC (violeta) y OVA sola (rojo). Como control de estimulación se emplearon células incubadas en presencia de 200 ng/ml de LPS (azul). Para descartar efectos por contaminación por LPS de la flagelina, se empleó flagelina tripsinizada en la misma concentración que la no hidrolizada (morado). Las barras representan el porcentaje promedio de células positivas para la señal verde respecto del total de CD11c positivas de los duplicados de cada condición. Los diagramas de puntos en el panel inferior de la figura esquematizan la estrategia de análisis empleadas.

IV.5.5. Estudios preliminares:

Potenciación de la respuesta humoral frente a un toxoide de derivado de neumolisina administrado por ruta sublingual con flagelina.

La capacidad de flagelina de inducir un aumento de la respuesta humoral se evaluó de forma preliminar empleando un antígeno proteico derivado de la citolisina de neumococo neumolisina. Este antígeno, en adelante denominado PLYt, consiste en un toxoide truncado que carece de la región carboxilo terminal responsable de la actividad hemolítica de la proteína nativa y que ha sido empleado exitosamente para la vacunación por ruta subcutánea [135,319].

PLYt fue administrado en una dosis de 30 μ g/ratón por ruta sublingual solo o en conjunto con 10 μ g de flagelina. Los animales fueron inmunizados 3 veces a régimen de una dosis semanal. A los 7 días de la última dosis, se tomaron muestras de suero y el contenido de IgG total específica para el toxoide se determinó por ELISA (Figura IV.5.7).

Aunque las diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas debido a una importante variación interindividual, los ratones vacunados con el toxoide en conjunto con flagelina mostraron cierto aumento en la cantidad de IgG total específica para el toxoide de neumolisina. Estos resultados sugieren que flagelina es un adyuvante eficaz independientemente del antígeno empleado. Estudios adicionales serán conducidos en el futuro para confirmar estos resultados.

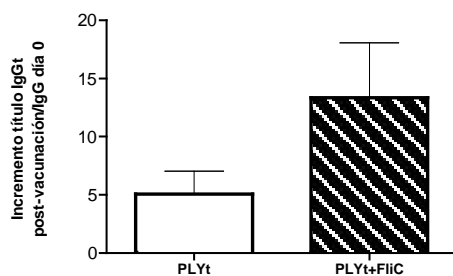


Figura IV.5.7: Vacunación sublingual con un antígeno derivado de neumococo en combinación con flagelina: efecto sobre la respuesta humoral específica en suero. Ratones C57/BL6 de 8-10 semanas de edad (n=6) fueron vacunados por ruta s.l. con 3 dosis de 30 μ g de PLYt o 30 μ g PLYt + 10 μ g de FliC a régimen semanal. Siete días después de la última dosis los niveles de IgG total específico para PLYt se evaluaron por ELISA. Las barras representan la media \pm SEM del incremento del título luego de la vacunación respecto al título a día cero, ambos calculados como UA/ml con respecto a un suero positivo empleado como referencia.

Análisis comparativo de la biodistribución del antígeno administrado por ruta sublingual e intranasal.

La distribución de OVA tras una inmunización sublingual o intranasal, sola o en conjunto con FliC se analizó en el tiempo empleando un sistema de imagenología molecular *in vivo*. La OVA fue marcada covalentemente con una sonda fluorescente (Cyto750). Los animales recibieron 50 y 20 μg de OVA marcada (en adelante OVA-Cyto), sola o con 10 o 1 μg de FliC por rutas sublingual e intranasal respectivamente. La fluorescencia a 770nm se detectó empleando una xenocámara tras excitación a 740 nm. La localización anatómica del antígeno se determinó por superposición digital de la señal fluorescente con imágenes tomadas por rayos X de alta definición de los animales vacunados.

El *panel A* de la *Figura IV.4.8* muestra las imágenes tras la inoculación intranasal a 0.5, 4, 20 y 24 h post-inmunización. Se destaca la localización en la región craneal tanto para los animales vacunados con el antígeno solo o en conjunto con FliC que se mantuvo incluso pasadas 20 horas de la inoculación. El antígeno también fue detectado en pulmones aunque con menor intensidad. La eliminación fue principalmente por vía renal.

Tras la inoculación sublingual (*Panel B*), la señal fluorescente se detectó en la zona craneal por corto tiempo. A las 4 horas de la inoculación no se observó fluorescencia en el cráneo sino que la señal quedó confinada a la región correspondiente al piso de boca, sin detectarse en la región frontal de la cabeza. El procesamiento antigénico parece tener una etapa de procesamiento hepático sugerida por la localización abdominal de la señal a tiempos más avanzados. A diferencia de lo observado tras la inoculación intranasal, no se observó señal colocalizando con riñones o vejiga.

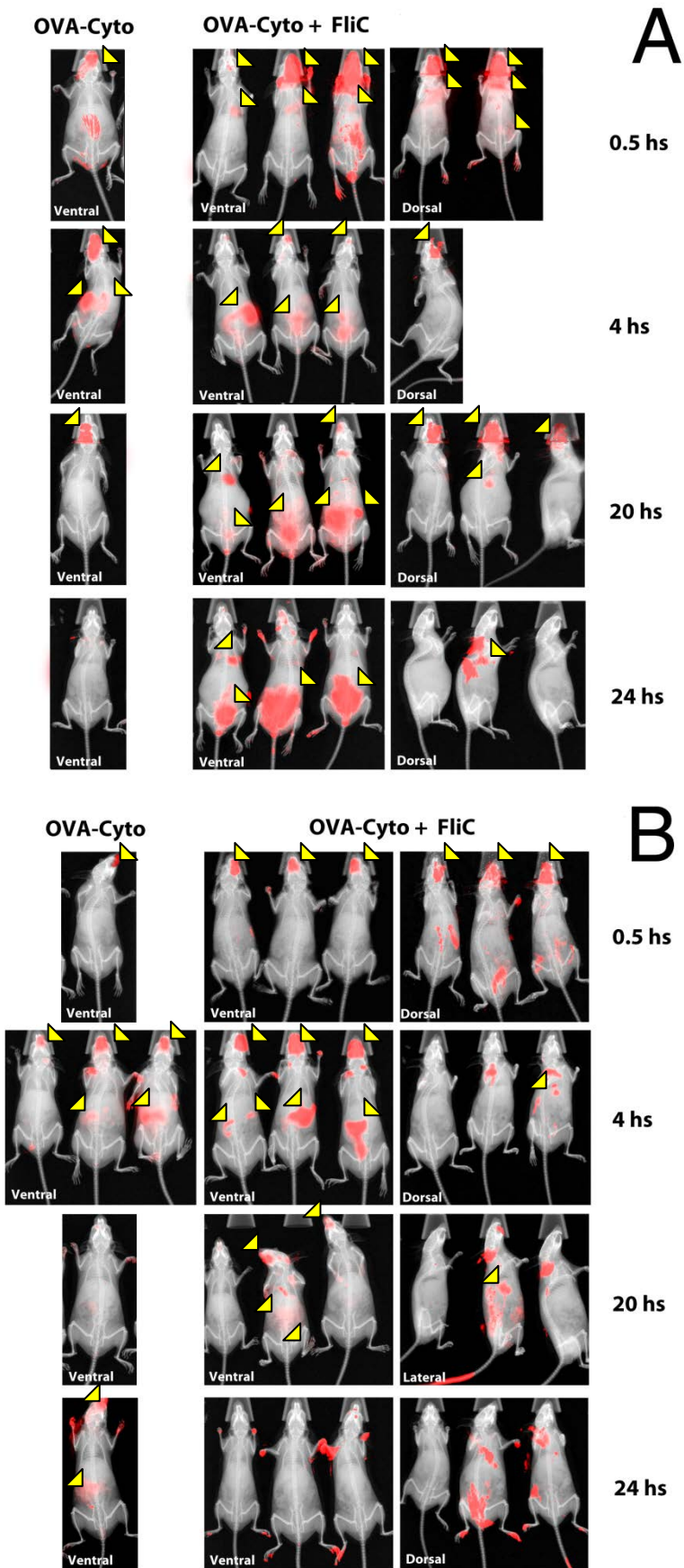


Figura IV.5.8. Biodistribución del antígeno tras la vacunación sublingual o intranasal con OVA y flagelina. La OVA acoplada covalentemente a la sonda fluorescente Cyto750 fue administrada a los animales a una concentración de 50 o 20 microgramos por ruta sublingual e intranasal en un volumen de 10 o 30 μ l respectivamente. Algunos animales recibieron el antígeno marcado junto con 10 μ g de FliC para la inoculación s.l. o 1 μ g i.n.. El seguimiento de la señal fluorescente se realizó en xenocámara MS-FX-Pro Carestream empleando una longitud de onda de excitación de 748 nm y filtro para detectar la fluorescencia emitida a 770 nm. Los animales se mantuvieron bajo anestesia inhalatoria durante la obtención de las imágenes. Además se realizaron rayos X de alta definición para la determinación de la localización anatómica. El análisis de las imágenes se realizó en MI y MS CarestreamImaging software. Las puntas de flecha amarillas indican señal correspondiente al antígeno marcado.

IV.5.4. Discusión Sección IV.5.

Flagelina es un potente activador de la respuesta inmune y sus variados efectos tanto sobre células del sistema inmune innato y adaptativo, así como sobre células estructurales han sido bien documentados (revisado en [101]). Su capacidad de inducir la producción de diversas citoquinas proinflamatorias y quimioquinas que promueven el reclutamiento leucocitario, han convertido a flagelina en un candidato ideal a ser empleado como adyuvante en vacunas. Un gran número de estudios han demostrado que flagelina es un potente adyuvante cuando es administrada por ruta sistémica o mucosa en conjunto con antígenos variados en forma de simples mezclas del antígeno y flagelina [232], como proteínas de fusión [320-324] e incluso empleando sistemas de entrega como nanopartículas [325].

Sin embargo, hasta el momento no existen reportes sobre la capacidad adyuvante de flagelina administrada por ruta sublingual. Los importantes efectos de la administración sublingual de flagelina en el contexto del desarrollo de terapias contra la neumonía, motivaron entonces el estudio de su capacidad adyuvante por esta ruta.

La vacunación sublingual con flagelina como adyuvante promovió el incremento del título de anticuerpos específicos IgM e IgG para OVA en suero. El análisis de las subclases de IgG sugiere una respuesta de perfil mixto Th2/Th1, que se deduce del aumento en IgG1, IgG2a e IgG2b. El mismo tipo de patrón se observó para la administración intranasal. Estos resultados se encuentran en acuerdo con varios trabajos que reportan un perfil similar de respuesta, aunque la contribución de IgG2b no ha sido analizada de forma sistemática [232,284,326,327]. Es interesante destacar que en dichos trabajos la vacunación fue realizada por diferentes rutas y empleando distintos antígenos y cepas de ratones. En conjunto, los resultados sugieren que el perfil de subclases observado cuando flagelina se emplea como adyuvante es independiente de dichos factores.

La activación de las vías de señalización de los TLRs y su vínculo con la inducción de respuestas adaptativas, ha sido atribuida a su capacidad de promover respuestas innatas de gran magnitud. Se ha propuesto que la activación de los TLRs beneficia la captura y presentación antigénica favoreciendo el reclutamiento leucocitario al sitio de administración del antígeno y la maduración de células presentadoras capaces de activar respuestas T y B específicas mediante la secreción de citoquinas inflamatorias. Dichas citoquinas juegan además un rol fundamental en el tipo de respuesta adaptativa a desarrollarse, determinando la diferenciación hacia los perfiles Th1, Th2, Th17, Th9 o T regulador inducible (iTreg) (revisado en [328-330]). Esto ha motivado el empleo de ligandos de TLRs como adyuvantes en vacunas, entre ellos flagelina [202,331-333]. Sin embargo, más recientemente ha surgido evidencia indicando que la señalización a través de estos receptores innatos no es indispensable para potenciación de la respuesta adaptativa por parte de adyuvantes que incluyen a sus ligandos. Un ejemplo claro de este hecho se observó para Ribi/MPL un adyuvante basado en ligandos de TLR4 que es eficiente aun en ratones deficientes en MyD88 (molécula involucrada al menos parcialmente en la señalización a través de todos los TLRs excepto TLR3) o TRIF (esencial para señalización vía TLR3 y parcialmente por TLR4) [334]. A partir de dichas observaciones, el grupo de Andrew Gewirtz demostró que el efecto adyuvante de flagelina no depende de la inducción

de altos niveles de citoquinas proinflamatorias, ni de la señalización por TLR5 dado que el efecto se mantiene en ratones deficientes en TLR5 o MyD88, aunque la respuesta en los últimos está parcialmente afectada. Puesto que flagelina también es ligando de NLRC4, estudiaron el rol de este receptor en el efecto adyuvante de FliC empleando ratones NLRC4^{-/-}, encontrando un resultado similar al observado en los TLR5^{-/-}. Interesantemente, flagelina no fue capaz de inducir la respuesta humoral en ratones deficientes para ambos receptores [335].

En este trabajo se empleó una estrategia diferente basada en el uso de ratones normales y flagelinas mutadas incapaces de señalizar por uno u otro receptor, obteniéndose resultados similares. Cabe destacar que el resultado es particularmente interesante puesto que el trabajo aquí presentado y el de Gewirtz y cols. emplean rutas de inmunización diferentes, siendo administración parenteral la utilizada por Gewirtz y cols.. La capacidad de FliC- Δ TLR5 de promover la respuesta humoral resulta un hallazgo interesante por tratarse en este caso de una inmunización mucosa, puesto que la señalización por este receptor ha sido señalada como fundamental para el efecto adyuvante de flagelina cuando es administrada por ruta intranasal [284].

El efecto adyuvante de flagelina en la vacunación sublingual también fue evidenciado por el aumento de la proliferación de linfocitos T vírgenes en los experimentos de transferencia adoptiva de linfocitos OT-II. La mayor proliferación tras la vacunación sublingual se observó en los ganglios hacia donde drena la mucosa sublingual. Dado que el pasaje directo de dos macromoléculas como la OVA y la flagelina a través de la mucosa sublingual resulta poco probable, el resultado podría sugerir que la mucosa sublingual cuenta con todos los elementos necesarios como para dar inicio a la respuesta adaptativa y que flagelina es capaz de activarlos. La captura del antígeno por parte de células dendríticas que pudiesen ser activadas por FliC de modo de promover la proliferación de las células T vírgenes en los ganglios próximos al sitio de inoculación, resulta probable. Esta hipótesis encuentra sustento en el trabajo de Song y colaboradores, en el que demuestran que las células dendríticas de fenotipo CCR7^{pos}, CD11c^{pos}, CD8 α ^{neg} capturan el antígeno en la mucosa tras la vacunación sublingual dirigiéndose a los ganglios, donde células CD8 α ^{neg} y CD8 α ^{pos} promueven las respuestas T y B específicas [318]. Además, existen células CD11c^{pos} que son reclutadas hacia la mucosa sublingual tras la vacunación empleando toxina colérica como adyuvante en conjunto con OVA [115], por lo que un mecanismo similar podría darse para el caso de FliC. Sin embargo, la capacidad de flagelina de activar a las células dendríticas es controvertida [238] y de hecho no todos los tipos de células dendríticas expresan TLR5, vía por la que FliC activa directamente a estas las células [336].

La flagelina de *S. Typhimurium* logró activar células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea induciendo la expresión de moléculas coestimuladoras. Sin embargo, la captación y procesamiento del antígeno no se vio significativamente afectada por el tratamiento con FliC. Las células empleadas para los ensayos, pueden no ser exactamente equivalentes a nivel funcional a las encontradas en la mucosa sublingual. De todos modos, el fenotipo definido por los marcadores de superficie se corresponde con el de las células dendríticas mieloides o convencionales similares a las descritas por Bates y colaboradores [336], siendo la diferencia más importante la expresión de CD8 α , marcador positivo para las dendríticas convencionales residentes en órganos linfoides y negativo para el mismo tipo de célula en tejidos no linfoides [337]. Sin duda, la realización de este ensayo

empleando células purificadas directamente de la región sublingual sería apropiado para validar el resultado.

Cabe mencionar que otro modo de acción ha sido planteado para el efecto adyuvante de flagelina cuando es aplicada en mucosas, en particular en la mucosa respiratoria. Existe evidencia que indica que esta propiedad de FliC depende de las células epiteliales de las vías respiratorias y su capacidad de responder por la vía de TLR5. El mecanismo propuesto, plantea que la activación del epitelio pulmonar es responsable de la activación subsecuente de las células dendríticas [284]. Un mecanismo similar fue propuesto para explicar la inducción de respuestas T específicas en un modelo de asma por parte del LPS [338]. Claramente, investigación adicional es requerida para determinar cuál de los dos mecanismos es más relevante en la vacunación sublingual.

En conjunto los resultados indican que flagelina es un candidato prometedor para potenciar la respuesta adaptativa en vacunas de aplicación sublingual. Además los resultados preliminares de la vacunación conjunta con el toxoide de neumolisina, indican que los efectos observados empleando un antígeno modelo como es OVA, muy probablemente puedan ser reproducidos con antígenos relevantes para la prevención de infecciones. Sin embargo, no puede obviarse el hecho de que la respuesta inducida por la vacunación sublingual fue de menor magnitud que la intranasal aún habiéndose empleado una cantidad de antígeno y de adyuvante 10 veces mayor. Esto fue por demás notorio en los ensayos de activación de células T vírgenes, donde la administración intranasal indujo una potente activación incluso en regiones anatómicas distantes al sitio de aplicación de la vacuna. Sin embargo, el riesgo de toxicidad cerebral de esta ruta no puede ser dejado de lado ya que las imágenes obtenidas en tiempo real tras la vacunación intranasal, confirman la localización a nivel craneal del antígeno por un tiempo considerable, fenómeno no observado para el caso de la inmunización sublingual. Existen opciones variadas para mejorar la eficacia y la entrega de los antígenos y adyuvantes; éstas incluyen desde la generación de proteínas de fusión que facilitarían la entrega de ambos a una misma célula, la carga en nanopartículas que previenen la degradación y favorecen la entrega del antígeno y el efecto del adyuvante por más tiempo, o el uso de sustancias mucoadhesivas que previenen la degradación del antígeno y que favorecerían también el efecto de flagelina ya que se trata de una proteína. En vista de los promisorios resultados obtenidos, sería importante estudiar otras formulaciones para mejorar los efectos observados y hacer uso de las ventajas de la aplicación sublingual y el efecto inmuno-potenciador de flagelina para la generación de nuevas vacunas que puedan ser probadas en modelos preclínicos de infección.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN GENERAL & PERSPECTIVAS

En este trabajo hemos explorado el potencial de diferentes agonistas de receptores innatos como agentes terapéuticos y profilácticos para el tratamiento de la neumonía neumocócica invasiva, empleando rutas mucosas como vía de administración.

En el entendido de que una activación local de las defensas innatas que supere en magnitud y/o calidad la respuesta naturalmente estimulada por el patógeno, puede ser suficiente para inducir protección frente a la neumonía aguda, se trabajó en el establecimiento de un modelo de neumonía aguda en ratones en el que se estudió la capacidad de diversos agonistas de receptores innatos de conferir protección.

Se establecieron dos modelos de tratamiento: un modelo de estimulación local de la mucosa respiratoria a través de la administración intranasal de los agonistas de PRRs y otro modelo basado en la aplicación de los compuestos en una mucosa distante, la mucosa sublingual. Dentro de los compuestos seleccionados se probaron algunos capaces de activar receptores estimulados por la propia bacteria (agonistas a los que llamamos homólogos) y otros capaces de activar receptores no vinculados a neumococo (agonistas heterólogos).

Flagelina fue elegido para caracterizar en mayor profundidad el efecto protector y los cambios inducidos en la mucosa respiratoria tras la instilación intranasal o sublingual durante la infección.

Por último, se abordó brevemente el estudio del potencial de flagelina para ser empleado como adyuvante en vacunas de aplicación sublingual, estrategia que en un futuro podría ser de gran utilidad para la profilaxis de la neumonía neumocócica y otras infecciones.

Agonistas de PRRs como agentes terapéuticos de aplicación intranasal contra la neumonía neumocócica.

Evaluación las vías más apropiadas para la inducción de protección.

Uno de los eventos que lleva a la activación de las defensas innatas está basado en el reconocimiento de motivos moleculares conservados presentes en los microorganismos, denominados de forma genérica Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), o en su definición más general, Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos (MAMPs). Aunque conservados, la naturaleza de estos motivos moleculares es muy variada incluyendo lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y proteínas. Los receptores del sistema inmune innato codificados en la línea germinal, han debido evolucionar para reconocer una gran variedad de microorganismos a

través de un repertorio finito de receptores y desencadenar respuestas acordes a la naturaleza de cada patógeno. Quizás, debido a la cantidad limitada de estructuras que reconoce la inmunidad innata en comparación al virtualmente infinito repertorio de receptores de la inmunidad adaptativa, la respuesta inmune innata durante largos años fue considerada como una respuesta inespecífica, cuya función era simplemente desencadenar un conjunto general de mecanismos que, agrupados bajo el nombre de respuesta inflamatoria, proporcionaban un medio de contención del patógeno hasta que la respuesta adaptativa específica tenía lugar. Esa concepción simplista de la respuesta innata ha evolucionado y hoy sabemos que, a pesar de reconocer un número limitado de motivos moleculares, la activación de los diversos PRRs no es equivalente en términos de los mecanismos efectores activados [75,339].

En años recientes, el conocimiento ganado ha sido trasladado hacia el desarrollo de variadas intervenciones clínicas que hacen uso de las de los mecanismos innatos para el tratamiento de muchas patologías que van desde las alergias, enfermedades autoinmunes hasta cáncer y enfermedades infecciosas [71,339-341].

En el caso de las infecciones respiratorias, varios trabajos han mostrados que la activación local de las defensas innatas con componentes bacterianos definidos o mezclas complejas de los mismos, puede brindar protección frente a la infección por patógenos no relacionados [104-106,209]. Aproximaciones similares han sido empleadas con éxito frente a la neumonía neumocócica en modelos murinos, donde la administración de compuestos capaces de señalar a través de dos receptores implicados en el reconocimiento natural de la bacteria (TLR2/6 y STING) promovieron la supervivencia de los animales frente a la infección intranasal con neumococo [210,211]. Tomando como punto de partida dichas observaciones, nos propusimos investigar cuán general era el alcance de esta estrategia para conferir protección frente a la neumonía neumocócica. Seleccionamos así 7 agonistas de PRRs diferentes: 5 que señalizan por 4 receptores que reconocen componentes de neumococo durante la infección natural (TLR2/6, TLR9, STING, TCR semi-invariante $V\alpha 14^{+}\beta$), y 2 reconocidos por receptores hasta ahora no implicados en el reconocimiento de esta bacteria (TLR5/NLRC4-NAIP5 y TLR3). Los resultados demostraron que varios agonistas de diferentes PRRs tienen potencial terapéutico para el tratamiento de la neumonía neumocócica. Sin embargo, no todos los compuestos lograron inducir inmunidad protectora cuando fueron coadministrados con el desafío bacteriano. En el protocolo de tratamiento propuesto, la coadministración de α -GalCer y la variante PEGilada y Poli(I:C) fallaron en inducir protección. El caso de Poli(I:C) fue particularmente llamativo puesto que además pareció acelerar la muerte de los animales.

Si bien la eficacia terapéutica de cada PAMP puede cambiar con los diferentes protocolos de tratamiento, hecho que quedó bien ilustrado por la eficacia de α -GalCer cuando fue administrado previo al desafío, este no sería el caso de Poli(I:C) ya que la preadministración de dosis repetidas del agonista de TLR3 han sido asociadas con mortalidad incrementada frente a la infección con *S. pneumoniae* [90].

El resultado observado para poli(I:C) tiene grandes implicancias para el desarrollo de terapias anti-infecciosas basadas en la potenciación de la respuesta innata y señala la importancia de la elección racional de los agentes terapéuticos apoyada en el conocimiento de sus efectos sobre la modulación de la respuesta inmune. Los microorganismos presentan variados motivos que pueden ser reconocidos en simultáneo por los PRRs, permitiendo la decodificación de señales complejas que brindan la información que determinará el tipo de respuesta desencadenada. Las interacciones que establecen los PRRs entre sí, permite además la modulación de la respuesta en función de las vías activadas, aportando gran complejidad a la regulación de la respuesta innata [88]. Por ejemplo, la activación de TLR2 inhibe la producción de IL12 y CXCL10 inducida por estimulación de las vías de TLR4 y TLR3 a través de la secreción de IL10 [342]. Por el contrario, la estimulación simultánea de TLR2 y TLR4 tiene efectos sinérgicos sobre la producción de TNF- α , pero cuando la activación es secuencial se observa el fenómeno de tolerancia cruzada entre estos receptores [343]. La evidencia de la regulación cruzada de las vías es numerosa y no solo implica a los TLRs sino también otros PRR de diferentes familias (revisado en [88]). Por tanto, cuando se aplican agonistas de PRRs en el contexto de la infección, la estimulación del agente terapéutico debe ser compatible con la de la infección natural en términos de permitir la generación de una respuesta protectora, procurando evitar efectos negativos que puedan resultar de la inducción de tolerancia entre las vías requeridas para desencadenar los mecanismos efectores, así como efectos sinérgicos que puedan potenciar la exacerbación patológica de la inflamación.

Mecanismos de protección implicados en el empleo de flagelina como agente terapéutico por ruta intranasal y sublingual

Estudio de los principales actores del efecto terapéutico por ruta intranasal.

Flagelina fue el PAMP que confirió mayor protección contra la neumonía invasiva cuando fue administrada por ruta intranasal conjuntamente con la infección. Se destaca además el hecho de que fue empleada en una dosis más baja que cualquiera de los otros agonistas probados. La protección estimulada por flagelina fue independiente de las características genéticas de los animales empleados, induciendo la protección en varias cepas de ratones y frente a dos tipos capsulares diferentes de neumococo.

La inducción de protección funcionó en una ventana temporal acotada, sugiriendo una activación transitoria de los mecanismos inmunes. En consistencia con ello, el análisis del perfil transcripcional y del reclutamiento leucocitario en pulmones, demostró que la instilación intranasal de flagelina durante la infección provoca un aumento importante de los mensajeros de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias, que es acompañado de la infiltración masiva pero transitoria de neutrófilos hacia el parénquima pulmonar y los espacios alveolares. La cantidad de neutrófilos en las vías aéreas retornó

a los valores normales antes de las 48 horas. Además, del análisis histológico se pudo concluir que en los animales tratados con FliC, la arquitectura del pulmón retornaba a la normalidad tan pronto como 7 días tras haberse producido la infección.

Se determinó que el mecanismo de protección no requiere de componentes de la inmunidad innata como ser células B, T, o anticuerpos, pero si depende de los neutrófilos. Esto es interesante ya que tanto las células T como los anticuerpos naturales han sido implicados en la protección temprana contra neumococo[66,258].

A pesar de la importancia de los neutrófilos en la protección, no pudo demostrarse que flagelina tuviese efectos directos sobre dichas células, al menos en términos de modificar su capacidad de activar el estallido respiratorio. Otros autores si han descrito efectos directos de flagelina sobre los PMN. Como ya se mencionó antes, en esos estudios flagelina indujo cambios en la expresión de L-selectina, cambios morfológicos así como aumento de la capacidad fagocítica y del estallido respiratorio [82]. Dado que el diseño experimental en dicho trabajo es diferente al aquí empleado, resulta difícil distinguir si la discrepancia es relevante o si obedece a condiciones experimentales no comparables. Otros han reportado que flagelina es capaz de retrasar la apoptosis de estas células lo que podría mejorar el efecto antimicrobiano favoreciendo su acción por tiempo más prolongado [344].

El epitelio de las vías respiratorias juega un rol esencial en el reconocimiento de los motivos bacterianos y en la respuesta frente a la infección. Actúa como primera línea de defensa frente a la invasión de patógenos, desencadenando la producción de una importante batería de productos solubles que abarcan desde péptidos antimicrobianos, hasta las quimioquinas y citoquinas que orquestan el reclutamiento y activación leucocitaria (revisado en [24]). La contribución del epitelio en el reconocimiento de agonistas de TLRs y entre ellos de flagelina, se ha puesto en evidencia en estudios con ratones quiméricos que presentan células epiteliales deficientes en receptores de tipo Toll. Estos estudios apoyan un rol casi exclusivo del epitelio mucoso en la respuesta inmune contra la infección y subrayan la importancia de las células epiteliales en la respuesta frente a flagelina [261,263,345].

Se planteó entonces la hipótesis de una activación indirecta de los neutrófilos a través de la producción de citoquinas y quimioquinas por parte de las células epiteliales capaces de reconocer flagelina por medio de TLR5. La línea celular derivada de epitelio de pulmón A549, que presenta las características de los neumocitos tipo II presentes en el pulmón normal, respondieron intensamente a la estimulación con flagelina, lo que se evidenció por el aumento de mensajeros de *Cxcl8*, *Ccl20*, *Cxcl2*, *Tnfa*, entre otros, en una cinética similar a la observada *in vivo* en los pulmones de los animales tratados con FliC. Otros trabajos han mostrado que la estimulación de células epiteliales intestinales con flagelina, determina un perfil transcripcional similar en estas células al observado en el epitelio pulmonar [346,347] lo que podría sugerir una respuesta prototípica del epitelio ante flagelina. Como continuación de los trabajos iniciados en esta tesis, hemos comenzado a trabajar en la puesta a punto de sistemas de cocultivo celular con la línea epitelial A549 y neutrófilos humanos con el fin de determinar la capacidad del epitelio estimulado con FliC de activar a los PMN. Mediante

el empleo del sistema de cultivo en transwell (que consiste en el cultivo de los dos tipos celulares en compartimientos separados por una membrana microporosa) pretendemos determinar si la activación puede suceder a través de factores solubles, por ejemplo citoquinas y quimioquinas o si requiere una interacción de contacto entre ambos tipos celulares. Para evaluar más precisamente este último escenario, es posible que se requiera además de sistemas de triple cultivo con células endoteliales, ya que la expresión de integrinas en estas células es también un factor importante en la activación de los neutrófilos. Estos ensayos permitirán estudiar diferentes aspectos de la activación de los PMN, permitiendo incluso medir su capacidad migratoria a través de ensayos de transmigración como los descritos en [348,349]. Cabe además destacar que el cultivo de las células epiteliales en este tipo de sistemas favorece la polarización de las mismas, donde se distinguen el borde apical y basolateral de las mismas tal y como sucede *in vivo* con el epitelio. Es interesante destacar que la diferenciación por cultivo en *transwell* aumenta la capacidad de otras líneas celulares epiteliales de responder frente a estímulo inflamatorios. En particular, la línea epitelial Caco-2 es capaz de aumentar la producción de citoquinas inflamatorias en respuesta a la estimulación con *Salmonella*[350]. Sería interesante evaluar si esto también tiene lugar en las células A549 ya que podría determinar cambios en el perfil transcripcional y en su capacidad de respuesta frente a flagelina.

Importancia de lograr una activación controlada de la respuesta inflamatoria en el tratamiento local.

Otro aspecto importante a destacar, es que flagelina indujo el aumento en genes antiinflamatorios tanto cuando fue administrada *in vivo* en los pulmones, como *in vitro* en las células. El aumento correspondió a los mensajeros de *Il10* y *A20*, ambos de gran importancia en la regulación de la respuesta inflamatoria. La respuesta antiinflamatoria resulta tan importante como la inducción de la inflamación, dado que el mantenimiento de la homeostasis es fundamental en las vías aéreas[26]. Estudios de microarreglos en pulmones de animales previamente tratados con flagelina realizados por nuestros colaboradores en el Institut Pasteur de Lille, han mostrado que conjuntamente a la activación de genes inflamatorios, flagelina induce un programa de retorno a la homeostasis que involucra el aumento de varios mensajeros codificantes para reguladores negativos de la inflamación [284]. Entre ellos, además de *A20*, se encuentran *ZPF36*, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y *ATF3*, lo cuales en conjunto ofrecen varios puntos de control para prevenir la exacerbación de la respuesta. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ resulta particularmente importante en la regulación de la vía de $\text{NF}\kappa\text{B}$, ya que es el factor que impide la translocación nuclear de $\text{NF}\kappa\text{B}$ y por tanto la transcripción de genes inflamatorios desencadenada por la activación de las vías de señalización de muchos receptores innatos. *ATF3* y *ZPF36* están involucrados en el control de la transcripción de genes como *Il6*, *Cxcl1*, *Cxcl2* y *Tnfa* y son de gran importancia en el control de la inflamación a nivel respiratorio. La capacidad de inducir un programa de retorno a la homeostasis resulta una cualidad muy importante para cualquier agente inmunoestimulante que pretenda emplearse como agente terapéutico en las vías respiratorias, dado que el control de la inflamación resulta central para la función pulmonar.

Tratamiento de la neumonía mediante la aplicación de flagelina en una mucosa distante: beneficios de la terapia sublingual.

La eficacia de flagelina como agente terapéutico contra la neumonía aplicada por ruta sublingual, brinda una alternativa de tratamiento más segura en términos de disminución de potenciales efectos de toxicidad en el sistema nervioso central asociados con la aplicación de compuestos por vía intranasal.

En términos generales, la activación de las defensas innatas en los pulmones tras la aplicación de FliC sublingual mostró un perfil similar al observado en el tratamiento intranasal en términos de la cinética de producción de las quimioquinas *Cxcl1* y *Ccl20*, así como para la *Il6*. Cuando el tratamiento fue administrado con las bacterias, nuevamente se observó una inducción significativamente mayor en los mensajeros de *Il6* y *Cxcl1* con respecto al grupo que solamente recibió la infección. Aunque la magnitud de la inducción fue menor que la observada para el caso intranasal y a pesar de que mensajeros de otras importantes citoquinas inflamatorias como *Tnfa* no se incrementaron de forma significativa en el grupo control respecto al tratado, la respuesta inducida fue suficiente para proteger al 50% de los animales desafiados.

Es importante destacar que en el caso de la administración sublingual, la eficacia de la preadministración se vio más acotada en el tiempo respecto a lo observado para la terapia intranasal, lo que indica que la duración del efecto es aún más limitada que la observada para la intranasal. Sin embargo, esto no se asoció con un aumento de los mensajeros de *Il10* en los pulmones, lo que sugiere que la terminación de la respuesta no se da del modo propuesto para el tratamiento intranasal. Quizás, debido a que la activación se da en un sitio distante a la mucosa respiratoria los mecanismos de control de la misma también tengan lugar en el sitio de aplicación de FliC.

Dado que los neutrófilos también resultaron células claves en la protección y migraron en mayor número hacia los alvéolos de los animales tratados durante la infección, surge nuevamente la interrogante de cuál es el mecanismo por el que estas células son activadas de modo de eliminar efectivamente las bacterias. En el *Capítulo IV* se plantearon 3 hipótesis que podrían explicar el mecanismo de acción de flagelina, manejándose por una parte el pasaje directo de la proteína al torrente sanguíneo que subsecuentemente permitiría la activación directa de la mucosa pulmonar, o bien la activación directa de la mucosa sublingual que a su vez podría preactivar los neutrófilos en la circulación cercana, o una combinación de ambos fenómenos.

Aunque la ruta sublingual ha sido clásicamente empleada para la entrega de pequeñas moléculas que difunden a través de la mucosa y son dirigidas directamente al torrente sanguíneo, este tipo de transporte es eficiente para moléculas de bajo peso molecular de hasta 300 Da. Las moléculas de tamaño mayor a 1000 Da ya no atraviesan la barrera mucosa por difusión, el cual sería el caso para una proteína del tamaño de flagelina[351]. De no atravesar el epitelio y dado que la saliva contiene aminopeptidasas, es altamente posible que una fracción de la flagelina sea hidrolizada por ellas. La hidrólisis podría o bien generar fragmentos con actividad biológica de un tamaño suficientemente

pequeño como para atravesar la mucosa y alcanzar el torrente sanguíneo, o bien degradarla disminuyendo la capacidad de FliC de estimular al epitelio desde el lado apical, caso que parece más probable porque el tipo de perfil transcripcional observado en los pulmones no coincide con el que se observa cuando flagelina se aplica por vía sistémica [284]. Por tanto, el escenario más probable sería el planteado en la segunda hipótesis, donde flagelina podría ejercer su función directamente sobre las células epiteliales de la mucosa, estimulándolas desde la cara apical y provocando la secreción local de citoquinas.

La activación completa de los neutrófilos requiere de dos pasos: i) preactivación por parte de quimioquinas de la familia ELR-CXC, contacto con el endotelio activado o citoquinas como TNF- α o IL1- β y ii) activación en el sitio de infección o daño por PAMPs, DAMPs u otros factores similares. Diferentes estudios han sugerido que en caso de ser preactivados los neutrófilos pueden circular en ese estado por algunas horas a través de todo el organismo. Se postula que el pulmón cumple una función importante en la desactivación de los PMN preactivados [47]. Entonces, cuando ocurre la preactivación en cualquier sitio anatómico, los PMN circulan y de no encontrar a segunda señal que determine su activación completa antes de llegar a los pulmones o en los propios pulmones, lo mismos retornan a su estado de activación basal y vuelven a la circulación. Si bien el mecanismo de desactivación exacto se desconoce, el mismo es importante para prevenir la activación descontrolada de estas células con alto potencial destructivo. Si en cambio, los neutrófilos preactivados llegan a un sitio donde encuentran segundas señales por ejemplo por presencia de un microorganismo, se activarán inmediatamente, incluso en el pulmón si es allí donde reside el agente invasor (revisado en [47,52]). Esta secuencia de eventos podría estar teniendo lugar en la terapia sublingual, más aún si consideramos que la sangre de la red de vasos sanguíneos de la mucosa sublingual es colectada por la vena yugular y dirigida a través del sistema cava superior al corazón, para ser enviada directamente hacia los pulmones. Por tanto, de existir una infección pulmonar, los neutrófilos preactivados colectados desde la zona sublingual serían dirigidos directamente hacia el sitio de infección donde se daría su activación total.

Este escenario explicaría también el hecho de que no se observe protección cuando FliC es administrada 12 horas antes de la infección. Puesto que la vida media de los neutrófilos en circulación varía entre 4 y 6 horas, de ocurrir el tratamiento 12 horas antes que la infección, los neutrófilos preactivados por la aplicación de FliC sublingual ya habrían sido removidos de la circulación o desactivados en el momento de realizado el desafío.

Resta realizar ensayos para corroborar estas hipótesis, sin embargo la corta vida de los neutrófilos y la dificultad para purificarlos y marcarlos *ex vivo* para realizar ensayos de transferencia y seguir su distribución anatómica dificulta la investigación. Otra opción podría ser comenzar con el marcado fluorescente de flagelina para al menos determinar si la proteína actúa localmente o es translocada a través del epitelio sublingual y dirigida a otras localizaciones anatómicas, entre ellas los pulmones. Asimismo, queda por ensayar la eficacia de la administración sublingual de flagelina en algún tipo de formulación que prevenga su degradación o simplemente en conjunto con inhibidores de las

aminopeptidasas para corroborar si esta estrategia puede aumentar la protección frente a la neumonía neumocócica.

Conclusión general sobre el potencial de la terapia anti-infecciosa con flagelina en la prevención de las infecciones respiratorias.

Otros autores han mostrado que el tratamiento intranasal con flagelina mejora el pronóstico de las infecciones pulmonares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* o *Burkholderia cepacia*[107,226]. Interesantemente, en el caso de *P. aeruginosa*, la protección no dependió del reclutamiento de neutrófilos, sino de la producción de un péptido antimicrobiano CRAMP. En el caso de *B. cepacia* se observó aumento del reclutamiento de neutrófilos así como también capacidad fagocítica aumentada por parte de los macrófagos alveolares. Esto indica que los mecanismos inmunes inducidos por flagelina pueden ser variables de acuerdo al patógeno que esté infectando la mucosa. Por otra parte, dado que las flagelinas empleadas en los estudios mencionados y el aquí presentado fueron aisladas de diferentes orígenes (*P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. Typhimurium* respectivamente) sería importante definir si la diferencia en los efectos observados está relacionada a las diferencias en las flagelinas de los diferentes patógenos.

De forma general podemos concluir que flagelina presenta importantes cualidades que la señalan como un buen candidato para continuar explorando su potencial uso en la clínica fundamentalmente para el tratamiento de las infecciones respiratorias de etiología bacteriana. Flagelina podría ser empleado como agente terapéutico de forma independiente o en combinación con las terapias actuales, por ejemplo para el tratamiento de infecciones por parte de bacterias resistentes a los antibióticos. El tratamiento intraperitoneal con flagelina en combinación con antibióticos fue beneficioso para el tratamiento de la infección intestinal con *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina[352]. Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio indican que la instilación intranasal de flagelina en ratones infectados con *S. pneumoniae* y tratados con dosis sub-óptimas de de antibiótico, mejoran el pronóstico de la infección aumentando la sobrevida de los animales que reciben el tratamiento combinado.

Otra alternativa de aplicación clínica podría ser el empleo de flagelina en combinación con la administración de inmunoglobulina endovenosa para el tratamiento de la neumonía invasiva. De este modo el aporte de anticuerpos (algunos de ellos con reactividad para algunos epítopes presentados por neumococo) aunque fuesen de baja afinidad, podría en conjunto con la activación de los neutrófilos inducida por flagelina, aumentar la sobrevida de los pacientes favoreciendo la rápida eliminación de las bacterias. Resta además por estudiar el potencial de flagelina en el contexto de la colonización nasal y determinar si puede ser empleada para disminuir la presencia de neumococo en la nasofaringe y de este modo reducir la circulación en la población.

Flagelina como adyuvante para vacunas de aplicación sublingual

La vacunación mucosa presenta grandes ventajas respecto a la vacunación parenteral, en particular para prevenir las enfermedades causadas por patógenos que emplean como puerta de entrada las mucosas. Las vacunas mucosas son capaces de inducir respuestas de anticuerpos a nivel sistémico al igual que las parenterales, pero adicionalmente inducen respuestas en las superficies mucosas, en particular promoviendo la producción de IgA secretoria (sIgA). Normalmente, tras la inmunización en mucosas se produce una respuesta de anticuerpos específicos del tipo IgG en suero y de sIgA que se transloca hacia el lumen del órgano donde se indujo la respuesta en primer lugar. Pero la respuesta no solo está confinada al sitio de inmunización, sino que también puede observarse en mucosas distantes. Esto ocurre gracias a la organización particular del sistema inmune de las mucosas que se puede describirse como una serie de "compartimentos interconectados o integrados". Esta interconexión está asociada a la generación de linfocitos caracterizados por la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y el receptor CCR10, que al salir del ganglio, migran preferentemente a través de las mucosas y promueven de este modo la respuesta en sitios distantes al de la vacunación[353-355].

Sin embargo, no todas las mucosas son equivalentes en el sentido que según sea el sitio de la inmunización, cada una favorecerá la respuesta en algunas mucosas distantes pero no en otras. La vacunación sublingual ofrece una alternativa ventajosa para inducir inmunidad en la mucosa respiratoria y de allí nuestro interés en el estudio de esta vía. Aunque la vacunación sublingual ofrece varias ventajas comparada con la intranasal (principalmente en términos de mayor seguridad) y comparada con la oral (puesto que evita la degradación de antígenos y por tanto requiere dosis menores), no existe al presente ninguna vacuna de aplicación sublingual aprobada para uso humano[112,114,353].

Los antecedentes clínicos más cercanos que existen acerca del uso de la ruta sublingual como vía de inducir protección contra las infecciones proviene del uso de lisados bacterianos[117-119]. Sin embargo, la falta de estudios clínicos que avalen la eficacia de estas terapias y las dificultades que se presentan al intentar elucidar las vías de señalización activadas por las complejas preparaciones que constituyen los lisados, ha disminuido su uso clínico.

La vacunación sublingual ha mostrado ser segura incluso para la aplicación de una vacuna basada en virus influenza con capacidad replicativa normal en ratones [300]. Sin embargo, la tendencia de las últimas décadas apunta hacia la formulación de vacunas basadas en compuestos purificados, ya que se entiende que las mismas son más seguras en comparación al empleo de microorganismos vivos atenuados, muertos, o lisados derivados de los mismos.

Dado que la principal limitante para la formulación de vacunas a subunidad es la falta de adyuvantes, nos propusimos evaluar la capacidad de flagelina como adyuvante para vacunas de aplicación sublingual.

En conjunto, los resultados obtenidos demostraron que la administración sublingual de flagelina en conjunto con un antígeno proteico modelo, la OVA, favorece la generación de anticuerpos específicos en suero con un perfil combinado de IgG1, IgG2a e IgG2b, además de observarse el aumento en el título sérico de IgM específica. Al presente se están conduciendo ensayos de vacunación para determinar la capacidad de las formulaciones con flagelina de inducir respuestas de sIgA en lavados broncoalveolares y nasales y también para determinar el perfil de activación de los linfocitos tras la vacunación.

Resulta interesante destacar que la vacunación conjunta con OVA y flagelina indujo mayor proliferación de linfocitos T-CD4⁺ en los ganglios drenantes de la mucosa sublingual. Sin embargo, se desconoce el potencial de flagelina para inducir también la proliferación de células T-CD8⁺. Cuburu y colaboradores reportaron la proliferación de linfocitos T-CD8⁺ tras la inmunización de ratones con OVA en conjunto con toxina colérica como adyuvante. La generación de inmunidad celular de este tipo resulta interesante para la prevención de enfermedades respiratorias causadas por virus como ya se ha demostrado para influenza [300] y por tanto también son de gran interés para la prevención de infecciones del tracto respiratorio y la formulación de vacunas que en un mismo evento de inmunización puedan quizás incorporar antígenos de diversos patógenos que requieran tanto desarrollo de respuestas T-CD4⁺ como T-CD8⁺.

Otro aspecto interesante en el que resta seguir profundizando es definir cuál es el modo de acción del efecto adyuvante cuando la vacunación se produce por ruta sublingual. Como ya se mencionó antes, en sus estudios de tesis doctoral, Laurye Van Maele propuso que la capacidad adyuvante de flagelina administrada por ruta intranasal con OVA como antígeno, depende de las células epiteliales y sucede de forma prácticamente independiente de las células de origen hematopoyético. En el modelo planteado por Van Maele, la activación del epitelio pulmonar vía de TLR5 activaría subsecuentemente a las células presentadoras [284]. En cambio otros autores han planteado que el efecto adyuvante de flagelina se debe a su capacidad de activar directamente las células dendríticas también en un mecanismo dependiente de TLR5 [345,356].

En este trabajo se encontró que flagelina induce el aumento moléculas coestimuladoras en células dendríticas de médula ósea, pero se desconoce la relevancia fisiológica de esta observación. En el futuro se realizarán ensayos para estudiar diversos aspectos de la vacunación sublingual empleando flagelina como adyuvante, entre ellos: el perfil transcripcional en las mantas sublinguales tras la administración del antígeno solo o en conjunto con flagelina, el tipo de células reclutadas a la zona de inmunización y su capacidad de capturar antígenos, la capacidad de las células dendríticas derivadas de médula ósea y pulsadas con el antígeno en presencia de FliC al ser transferidas a ratones vírgenes que serán posteriormente inmunizado por ruta sublingual.

De este modo seguiremos avanzando en la comprensión de los mecanismos inmunológicos que puedan ser relevantes para inducir protección contra patógenos respiratorios. Naturalmente, el primer paso será profundizar en la vacunación empleando el toxoide derivado de la citolisina de neumococo ya probado y determinar las condiciones en el protocolo de vacunación que promuevan inmunidad protectora frente a la neumonía neumocócica aguda así como frente a la colonización nasofaríngea.

Reconocimiento redundante de flagelina: requerimiento de TLR5, NLRC4-NAIP5 o ambos.

En el año 2001 por primera vez Hayashi y colaboradores demostraron que los efectos proinflamatorios asociados al mayor componente del flagelo bacteriano, la flagelina, eran mediados por el receptor TLR5 [94]. No fue hasta casi 7 años más tarde que se presentó evidencia definitiva que mostraba que flagelina podía también ser reconocida en el citosol celular por uno de los NLRs, el NLRC4 o iPAF [357]. Casi inmediatamente otro trabajo reportaba que otro receptor del inflamasoma, NAIP5 participaba también del reconocimiento de flagelina [91]. En los últimos años lograron definirse las regiones responsables en la molécula de flagelina responsables de la señalización a través de dichos receptores, permitiendo la generación de proteínas mutantes que en conjunto con la generación de ratones deficientes en TLR5, NLRC4 y NAIP5 han permitido estudiar la contribución de cada uno en los diferentes efectos biológicos de flagelina (revisado en [358]).

Interesantemente, en la mucosa pulmonar TLR5 aparece como el receptor primordial de flagelina donde media la rápida activación del epitelio para la producción de quimioquinas y citoquinas inflamatorias que culminan en el reclutamiento masivo de fagocitos [263]. Tal parece ser el caso de la protección mediada por flagelina frente a la neumonía neumocócica cuando es aplicada localmente. Empleando los mutantes de flagelina deficientes en la señalización por NLRC4-NAIP5 pero funcionales para TLR5, observamos protección total contra el desafío letal con neumococo. El caso del mutante complementario, deficiente para la señalización vía TLR5 pero no para NLRC4-NAIP5 no confirió protección, confirmando la importancia de TLR5 en la protección. Del mismo modo, TLR5 pero no NLRC4-NAIP5 fue requerido para inducir protección sublingual.

Por el contrario, la señalización por uno solo de los receptores fue suficiente para inducir la producción de anticuerpos específicos contra OVA cuando flagelina se empleó por ruta sublingual. Este resultado está en acuerdo con un trabajo muy reciente que demostró lo mismo para el empleo de flagelina como adyuvante en la vacunación parenteral junto con OVA [335], lo que en conjunto sugiere que la capacidad indistinta de mediar el efecto adyuvante no depende de la vía de aplicación. Si bien es altamente probable que cuando la flagelina se aplica por ruta mucosa las células epiteliales medien ambos efectos, las células hematopoyéticas serían seguramente las principales responsables de mediar la respuesta sistémica.

Por el contrario, para la inmunización intranasal Van Maele describió un rol primordial de TLR5 y del componente epitelial [284], lo que podría estar dando cuenta de un mecanismo diferente al que opera en las vías parenteral y sublingual.

Avanzar en la elucidación del mecanismo adyuvante por cada ruta es importante y uno de los abordajes posibles y capaces de aportar evidencia definitiva sobre el rol de cada receptor, es el empleo de animales deficientes en cada uno de ellos y la generación de animales quiméricos que presenten diferente expresión de uno u otro receptor en las células estromales o hematopoyéticas. Se procurará avanzar en colaboraciones internacionales que permitan este abordaje experimental para poder obtener mayor información sobre este importante aspecto del modo de funcionamiento de flagelina como adyuvante.

Resta por obtener evidencia adicional sobre el rol del complejo NLRC4-NAIP5 y de los receptores individuales en el efecto adyuvante. En este trabajo se empleó la estrategia de la generación de flagelinas mutadas en las regiones descritas como necesarias para la señalización por cada receptor de modo de eliminar su capacidad de señalizar por uno u otro. De momento, la evidencia indica de manera bastante contundente que la mutación de la secuencia de aminoácidos 89 a 95 elimina totalmente la señalización por TLR5 y por tanto consideramos que los resultados obtenidos empleando los mutantes FliC Δ TLR5 son definitivos.

Sin embargo, aunque el mutante de flagelina FliC Δ NLRC4, portador de una delección de los 3 aminoácidos C-terminales reportados como necesarios para la activación de NLRC4-NAIP5, no mostró capacidad de activar el inflammasoma cuando fue testeada en macrófagos, la nueva evidencia propuesta por el grupo de Halff y colaboradores [100] obliga a reevaluar el rol de NAIP5. Este grupo encontró recientemente que flagelinas mutadas en la región responsable de la activación del inflammasoma retenían cierto grado de actividad a pesar de no contar con las 3 leucinas C-terminales y sugieren que otros aminoácidos de la región N-terminal pueden ser importantes. No obstante, el mutante FliC Δ NLRC4 no mostró actividad residual según los ensayos realizados en por el Dr. Jean Claude Sirard en colaboración con el Dr. Mohamed Lamkanfi (comunicación personal del Dr. Sirard). Además este mutante fue generado mediante delección de los 3 aminoácidos C-terminales mientras que el empleado en los ensayos de Halff y colaboradores emplearon un mutante con las sustituciones L491A, L493A y L494A, lo que podría dar cuenta del efecto residual observado por dicho grupo. En el entendido de que nuestro mutante no tuvo actividad residual, lo que estaría implicando que no hubo activación del inflammasoma de NLRC4, se entiende que NAIP5 no tendría un rol relevante ya que hasta el momento la acción de NAIP5 se ha descrito asociada a la formación de un complejo multiproteico junto con NLRC4 pero no sola. De hecho Halff y colaboradores demostraron que aún en presencia de flagelina, NAIP5 no es capaz de desencadenar la activación del inflammasoma en ausencia de NLRC4.

El determinar el rol de cada receptor es importante ya que tiene implicancias desde el punto de vista del diseño de flagelinas recombinantes a ser empleadas en el desarrollo de las terapias. Una comprensión clara del rol de cada receptor permitiría diseñar estrategias para activar en cada caso la

respuesta más conveniente empleando mutantes capaces de señalar por una única vía según sea el objetivo de la terapia, sin que deba correrse el riesgo de activar vías no requeridas para el efecto buscado y que puedan favorecer respuestas inflamatorias exacerbadas.

Conclusión final.

En conjunto, los datos presentados en esta tesis y los aportados por la literatura, refuerzan la noción del gran valor de flagelina como candidato para el desarrollo de inmunoterapias de tratamiento y prevención de las infecciones respiratorias. Como mensaje final, quisiera destacar la importancia de continuar avanzando en la caracterización de los efectos biológicos de esta molécula en modelos preclínicos, que puedan aportar evidencia suficiente para promover en el futuro el desarrollo de estudios clínicos que validen su eficacia como agente terapéutico y como adyuvante en seres humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO (2009) Acute Respiratory Infections (Update September 2009).
2. Méndez-Echevarría A, G-MMJ, Baquero-Artigao F., Del-Castillo Martín F. (2008) Neumonía adquirida en la comunidad In: Adolescente. PcpIAEdPdNye, editor. Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Infectología Pediátrica. 1era Edición ed. pp. 56-63.
3. Ramirez JA, Anzueto AR (2011) Changing needs of community-acquired pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 66 Suppl 3: iii3-9.
4. Vacarezza M, Vázquez R, Bartesaghi L, Sicca M, Lerena V, et al. (2010) Neumonía aguda del adulto adquirida en la comunidad. Ensayo terapéutico controlado, Uruguay. *Arch Med Interna* XXXII 31-35.
5. van der Poll T, Opal SM (2009) Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 374: 1543-1556.
6. WHO (2011) Pneumonia - Facts Sheet N°331. Fact sheet
7. Bakir J, De-Gentile A, López-Holtmann G, Procopio A, Vazquez M (2003) Perfil epidemiológico de las infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*. *Arch Pediatr Urug* 74 43-50.
8. Hortal M, Sehabiague G, Camou T, Iraola I, Estevan M, et al. (2008) Pneumococcal pneumonia in hospitalized Uruguayan children and potential prevention with different vaccine formulations. *J Pediatr* 152: 850-853.
9. Gentile A, Bardach A, Ciapponi A, Garcia-Marti S, Aruj P, et al. (2012) Epidemiology of community-acquired pneumonia in children of Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 16: e5-15.....
10. Isturiz RE, Luna CM, Ramirez J (2010) Clinical and economic burden of pneumonia among adults in Latin America. *Int J Infect Dis* 14: e852-856.
11. WHO (2007) Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization WHO position paper *Weekly Epidemiological Record* 12: 93-104.
12. Bogaert D, De Groot R, Hermans PW (2004) *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 4: 144-154.
13. Kayhty H, Auranen K, Nohynek H, Dagan R, Makela H (2006) Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. *Expert Rev Vaccines* 5: 651-667.
14. Malley R, (2010) Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: implications for vaccine development. *J Mol Med (Berl)* 88: 135-142.
15. Goldblatt D, Hussain M, Andrews N, Ashton L, Virta C, et al. (2005) Antibody responses to nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in adults: a longitudinal household study. *J Infect Dis* 192: 387-393.
16. Whatmore AM, King SJ, Doherty NC, Sturgeon D, Chanter N, et al. (1999) Molecular characterization of equine isolates of *Streptococcus pneumoniae*: natural disruption of genes encoding the virulence factors pneumolysin and autolysin. *Infect Immun* 67: 2776-2782.
17. Nieto PA, Riquelme SA, Riedel CA, Kalergis AM, Bueno SM (2013) Gene elements that regulate *Streptococcus pneumoniae* virulence and immunity evasion. *Curr Gene Ther* 13: 51-64.
18. Organization WH (2012) Pneumococcal vaccines, WHO position paper. *Weekly epidemiological record* 14: 129-144.
19. Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS (2010) The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun* 78: 704-715.
20. Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJ, Andrew PW, Saibil HR (2005) Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 121: 247-256.
21. Yuste J, Botto M, Paton JC, Holden DW, Brown JS (2005) Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J Immunol* 175: 1813-1819.
22. Mitchell AM, Mitchell TJ (2010) *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect* 16: 411-418.

23. Standiford TJ, Kunkel SL, Greenberger MJ, Laichalk LL, Strieter RM (1996) Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia. *J Leukoc Biol* 59: 24-28.
24. Evans SE, Tuvim MJ, Fox CJ, Sachdev N, Gibiansky L, et al. (2011) Inhaled innate immune ligands to prevent pneumonia. *Br J Pharmacol* 163: 195-206.
25. Lambrecht BN (2006) Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* 24: 366-368.
26. Holt PG, Strickland DH, Wikstrom ME, Jahnsen FL (2008) Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 8: 142-152.
27. Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, Simard M, Olivier M, et al. (1998) Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun* 66: 912-922.
28. Dallaire F, Ouellet N, Bergeron Y, Turmel V, Gauthier MC, et al. (2001) Microbiological and inflammatory factors associated with the development of pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 184: 292-300.
29. Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, Ridger VC, Ince PG, et al. (2003) Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in a resolving model of pulmonary infection. *J Immunol* 171: 5380-5388.
30. Jambo KC, Sepako E, Heyderman RS, Gordon SB (2010) Potential role for mucosally active vaccines against pneumococcal pneumonia. *Trends Microbiol* 18: 81-89.
31. Thepen T, Van Rooijen N, Kraal G (1989) Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. *J Exp Med* 170: 499-509.
32. Holt PG, Oliver J, Bilyk N, McMenamin C, McMenamin PG, et al. (1993) Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 177: 397-407.
33. Jakubzick C, Tacke F, Llodra J, van Rooijen N, Randolph GJ (2006) Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J Immunol* 176: 3578-3584.
34. Morris DG, Huang X, Kaminski N, Wang Y, Shapiro SD, et al. (2003) Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature* 422: 169-173.
35. Annes JP, Rifkin DB, Munger JS (2002) The integrin alphaVbeta6 binds and activates latent TGFbeta3. *FEBS Lett* 511: 65-68.
36. Khalil N (1999) TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1: 1255-1263.
37. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, et al. (1999) The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96: 319-328.
38. Fillion I, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Sato S, et al. (2001) Role of chemokines and formyl peptides in pneumococcal pneumonia-induced monocyte/macrophage recruitment. *J Immunol* 166: 7353-7361.
39. Gauthier JF, Fortin A, Bergeron Y, Dumas MC, Champagne ME, et al. (2007) Differential contribution of bacterial N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and host-derived CXC chemokines to neutrophil infiltration into pulmonary alveoli during murine pneumococcal pneumonia. *Infect Immun* 75: 5361-5367.
40. Balamayooran G, Batra S, Fessler MB, Happel KI, Jeyaseelan S (2010) Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43: 5-16.
41. Garvy BA, Harmsen AG (1996) The importance of neutrophils in resistance to pneumococcal pneumonia in adult and neonatal mice. *Inflammation* 20: 499-512.
42. Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW (2004) The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* 138: 195-201.
43. Wang E, Simard M, Ouellet N, Bergeron Y, Beauchamp D, et al. (2002) Pathogenesis of pneumococcal pneumonia in cyclophosphamide-induced leukopenia in mice. *Infect Immun* 70: 4226-4238.
44. Marks M, Burns T, Abadi M, Seyoum B, Thornton J, et al. (2007) Influence of neutropenia on the course of serotype 8 pneumococcal pneumonia in mice. *Infect Immun* 75: 1586-1597.
45. Rolston KV (2001) The spectrum of pulmonary infections in cancer patients. *Curr Opin Oncol* 13: 218-223.

46. Craig A, Mai J, Cai S, Jeyaseelan S (2009) Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect Immun* 77: 568-575.
47. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, et al. (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31: 318-324.
48. Yoshida K, Kondo R, Wang Q, Doerschuk CM (2006) Neutrophil cytoskeletal rearrangements during capillary sequestration in bacterial pneumonia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 689-698.
49. Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, Johnston RB, Jr. (1984) Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med* 160: 1656-1671.
50. Sanz MJ, Kubes P (2012) Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *Eur J Immunol* 42: 278-283.
51. Marriott HM, Gascoyne KA, Gowda R, Geary I, Nicklin MJ, et al. (2012) Interleukin-1beta regulates CXCL8 release and influences disease outcome in response to *Streptococcus pneumoniae*, defining intercellular cooperation between pulmonary epithelial cells and macrophages. *Infect Immun* 80: 1140-1149.
52. Kolaczowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13: 159-175.
53. Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, et al. (2007) Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 9: 633-644.
54. Han SH, Kim JH, Martin M, Michalek SM, Nahm MH (2003) Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 71: 5541-5548.
55. McNeela EA, Burke A, Neill DR, Baxter C, Fernandes VE, et al. (2010) Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog* 6: e1001191.
56. Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, et al. (2004) Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 279: 36426-36432.
57. Khan AQ, Chen Q, Wu ZQ, Paton JC, Snapper CM (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. *Infect Immun* 73: 298-307.
58. Albiger B, Sandgren A, Katsuragi H, Meyer-Hoffert U, Beiter K, et al. (2005) Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. *Cell Microbiol* 7: 1603-1615.
59. von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, et al. (2008) Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 321: 691-696.
60. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, et al. (2007) Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 204: 2407-2422.
61. Shu C, Yi G, Watts T, Kao CC, Li P (2012) Structure of STING bound to cyclic di-GMP reveals the mechanism of cyclic dinucleotide recognition by the immune system. *Nat Struct Mol Biol* 19: 722-724.
62. Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, et al. (2011) STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 478: 515-518.
63. Picard C, Puel A, Bustamante J, Ku CL, Casanova JL (2003) Primary immunodeficiencies associated with pneumococcal disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3: 451-459.
64. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, et al. (2002) The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16969-16974.
65. Kadioglu A, Gingles NA, Grattan K, Kerr A, Mitchell TJ, et al. (2000) Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect Immun* 68: 492-501.
66. Kadioglu A, Coward W, Colston MJ, Hewitt CR, Andrew PW (2004) CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect Immun* 72: 2689-2697.

67. Marriott HM, Hellewell PG, Cross SS, Ince PG, Whyte MK, et al. (2006) Decreased alveolar macrophage apoptosis is associated with increased pulmonary inflammation in a murine model of pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 177: 6480-6488.
68. Marques JM, Rial A, Munoz N, Pelay FX, Van Maele L, et al. (2012) Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN-gamma-mediated immunity. *Immunobiology* 217: 420-429.
69. Rial A, (2011) Estudio de los mecanismos inmunes involucrados en la protección frente a la infección por *Streptococcus pneumoniae*. Montevideo: UdelaR. 214 p.
70. Rennie RP (2012) Current and future challenges in the development of antimicrobial agents. *Handb Exp Pharmacol*: 45-65.
71. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA (2010) Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov* 9: 293-307.
72. Hoffman ES, Smith RE, Renaud RC, Jr. (2005) From the analyst's couch: TLR-targeted therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 4: 879-880.
73. Wickelgren I (2006) Immunology. Targeting the tolls. *Science* 312: 184-187.
74. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-820.
75. Kawai T, Akira S (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 21: 317-337.
76. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983.
77. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.
78. Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, et al. (2005) The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9577-9582.
79. Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511.
80. Zarembek KA, Godowski PJ (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168: 554-561.
81. O'Mahony DS, Pham U, Iyer R, Hawn TR, Liles WC (2008) Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci* 5: 1-8.
82. Hayashi F, Means TK, Luster AD (2003) Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102: 2660-2669.
83. Genestier L, Taillardet M, Mondiere P, Gheit H, Bella C, et al. (2007) TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol* 178: 7779-7786.
84. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L (2008) NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ* 15: 226-233.
85. Edwards AD, Diebold SS, Slack EM, Tomizawa H, Hemmi H, et al. (2003) Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* 33: 827-833.
86. Medzhitov R, Horng T (2009) Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* 9: 692-703.
87. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373-384.
88. Trinchieri G, Sher A (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7: 179-190.
89. Mariathasan S, Monack DM (2007) Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7: 31-40.
90. Tian X, Xu F, Lung WY, Meyerson C, Ghaffari AA, et al. (2012) Poly I:C enhances susceptibility to secondary pulmonary infections by gram-positive bacteria. *PLoS One* 7: e41879.

91. Lamkanfi M, Amer A, Kanneganti TD, Munoz-Planillo R, Chen G, et al. (2007) The Nod-like receptor family member Naip5/Birc1e restricts *Legionella pneumophila* growth independently of caspase-1 activation. *J Immunol* 178: 8022-8027.
92. Kumar H, Kawai T, Akira S (2009) Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 420: 1-16.
93. Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC (2004) Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* 12: 509-517.
94. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, et al. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099-1103.
95. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, et al. (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9247-9252.
96. Yoon SI, Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, et al. (2012) Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science* 335: 859-864.
97. Mizel SB, West AP, Hantgan RR (2003) Identification of a sequence in human toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin. *J Biol Chem* 278: 23624-23629.
98. Lightfield KL, Persson J, Brubaker SW, Witte CE, von Moltke J, et al. (2008) Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol* 9: 1171-1178.
99. Lightfield KL, Persson J, Trinidad NJ, Brubaker SW, Kofoed EM, et al. (2011) Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. *Infect Immun* 79: 1606-1614.
100. Half EF, Diebold CA, Versteeg M, Schouten A, Brondijk TH, et al. (2012) Formation and structure of a NAIP5-NLRC4 inflammasome induced by direct interactions with conserved N- and C-terminal regions of flagellin. *J Biol Chem* 287: 38460-38472.
101. Honko AN, Mizel SB (2005) Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunol Res* 33: 83-101.
102. Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* 13: 816-825.
103. Cluff LE, (1970) Effects of endotoxins on susceptibility to infections. *J Infect Dis* 122: 205-215.
104. Cluff CW, Baldrige JR, Stover AG, Evans JT, Johnson DA, et al. (2005) Synthetic toll-like receptor 4 agonists stimulate innate resistance to infectious challenge. *Infect Immun* 73: 3044-3052.
105. Williams AE, Edwards L, Humphreys IR, Snelgrove R, Rae A, et al. (2004) Innate imprinting by the modified heat-labile toxin of *Escherichia coli* (LTK63) provides generic protection against lung infectious disease. *J Immunol* 173: 7435-7443.
106. Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Zeng X, Krieg AM, et al. (2004) CpG oligodeoxynucleotides stimulate protective innate immunity against pulmonary *Klebsiella* infection. *J Immunol* 173: 5148-5155.
107. Yu FS, Cornicelli MD, Kovach MA, Newstead MW, Zeng X, et al. (2010) Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide. *J Immunol* 185: 1142-1149.
108. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL (2007) Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 13: 552-559.
109. Romagne F (2007) Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today* 12: 80-87.
110. McNeela EA, Lavelle EC (2012) Recent advances in microparticle and nanoparticle delivery vehicles for mucosal vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* 354: 75-99.
111. Oliveira ML, Areas AP, Ho PL (2007) Intranasal vaccines for protection against respiratory and systemic bacterial infections. *Expert Rev Vaccines* 6: 419-429.
112. Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S (2012) New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* 30: 142-154.
113. Yuki Y, Kiyono H (2009) Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. *Expert Rev Vaccines* 8: 1083-1097.
114. Baumann U, (2008) Mucosal vaccination against bacterial respiratory infections. *Expert Rev Vaccines* 7: 1257-1276.

115. Cuburu N, Kweon MN, Song JH, Hervouet C, Luci C, et al. (2007) Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine* 25: 8598-8610.
116. Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, et al. (2004) Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 350: 896-903.
117. Alecsandru D, Valor L, Sanchez-Ramon S, Gil J, Carbone J, et al. (2011) Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4+ T cells and impact on clinical outcome. *Clin Exp Immunol* 164: 100-107.
118. Cogo R, Ramponi A, Scivoletto G, Rippoli R (2003) Prophylaxis for acute exacerbations of chronic bronchitis using an antibacterial sublingual vaccine obtained through mechanical lysis: a clinical and pharmaco-economic study. *Acta Biomed* 74: 81-87.
119. Rosaschino F, Cattaneo L (2004) Strategies for optimizing compliance of paediatric patients for seasonal antibacterial vaccination with sublingually administered Polyvalent Mechanical Bacterial Lysates (PMBL). *Acta Biomed* 75: 171-178.
120. Incorvaia C, Masieri S, Berto P, Scurati S, Frati F (2010) Specific immunotherapy by the sublingual route for respiratory allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol* 6: 29.
121. Quercia O, Bruno ME, Compalati E, Falagiani P, Mistrello G, et al. (2012) Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass monomeric allergoid: comparison between two different treatment regimens. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 43: 176-183.
122. Saint-Lu N, Tourdot S, Razafindratsita A, Mascarell L, Berjont N, et al. (2009) Targeting the allergen to oral dendritic cells with mucoadhesive chitosan particles enhances tolerance induction. *Allergy* 64: 1003-1013.
123. Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, et al. (2006) Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 61: 151-165.
124. Kuo CH, Wang WL, Chu YT, Lee MS, Hung CH (2009) Sublingual immunotherapy in children: an updated review. *Pediatr Neonatol* 50: 44-49.
125. Larenas-Linnemann D (2009) Sublingual immunotherapy in children: complete and updated review supporting evidence of effect. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9: 168-176.
126. Buffa V, Klein K, Fischetti L, Shattock RJ (2012) Evaluation of TLR agonists as potential mucosal adjuvants for HIV gp140 and tetanus toxoid in mice. *PLoS One* 7: e50529.
127. Pedersen GK, Ebensen T, Gjeraker IH, Svindland S, Bredholt G, et al. (2011) Evaluation of the sublingual route for administration of influenza H5N1 virosomes in combination with the bacterial second messenger c-di-GMP. *PLoS One* 6: e26973.
128. Pfaar O, Cazan D, Klimek L, Larenas-Linnemann D, Calderon MA (2012) Adjuvants for immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 12: 648-657.
129. Munoz N, Van Maele L, Marques JM, Rial A, Sirard JC, et al. (2010) Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun* 78: 4226-4233.
130. Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RL (2000) Enterotoxigenic *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 105: 1769-1777.
131. Nempont CC, D.; Rumbo, M.; Bompard, C.; Villeret, V.; Sirard, J.C. (2008) Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol* 181: 2036-2043.
132. Muhlradt PF, Kiess M, Meyer H, Sussmuth R, Jung G (1997) Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med* 185: 1951-1958.
133. Ebensen T, Schulze K, Riese P, Morr M, Guzman CA (2007) The bacterial second messenger c-di-GMP exhibits promising activity as a mucosal adjuvant. *Clin Vaccine Immunol* 14: 952-958.
134. Ebensen T, Link C, Riese P, Schulze K, Morr M, et al. (2007) A pegylated derivative of alpha-galactosylceramide exhibits improved biological properties. *J Immunol* 179: 2065-2073.
135. Grotiuz G (2000) Producción y purificación de neumolisina recombinante para su uso en una vacuna contra la infección neumocócica. . Montevideo Facultad de Medicina - UdelaR.

136. Narciandi RE, Fernandez JR, García J, Madrazo J, Padrón G, et al. (1996) Production and purification of a fused recombinant protein gp-36 (HIV-2) from *Escherichia coli*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 66: 1-6.
137. Parish CR, Warren HS (2002) Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Curr Protoc Immunol Chapter 4: Unit 4 9*.
138. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17: 62-70.
139. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402-408.
140. Rial A, Lens D, Betancor L, Benkiel H, Silva JS, et al. (2004) Intranasal immunization with a colloid-formulated bacterial extract induces an acute inflammatory response in the lungs and elicits specific immune responses. *Infect Immun* 72: 2679-2688.
141. Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, et al. (2003) Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta* 331: 103-110.
142. Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S (2008) Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clin Microbiol Rev* 21: 666-685.
143. Mizgerd JP, Skerrett SJ (2008) Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L387-398.
144. Rubins JB, Charboneau D (2000) Effect of anesthetics on pathogenesis of experimentally induced murine pneumococcal pneumonia. *Comp Med* 50: 292-295.
145. Castaneda E, Agudelo CI, Regueira M, Corso A, Brandileone MC, et al. (2009) Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries: a SIREVA II project, 2000-2005. *Pediatr Infect Dis J* 28: e265-270.
146. Ciencia CCdPdIAe (1998) Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación In: Prof. Leopoldo Estol DRD, Secretaria Ejecutiva Consejo Canadiense de Protección de Animales, editor. 2nd ed. Ottawa, Ontario-Canada: Consejo Canadiense de Protección de los Animales.
147. van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, Buurman WA, Kopf M, et al. (1997) Interleukin-6 Gene-Deficient Mice Show Impaired Defense against Pneumococcal Pneumonia. *Journal of Infectious Diseases* 176: 439-444.
148. Hatta M, Yamamoto N, Miyazato A, Ishii N, Nakamura K, et al. (2010) Early production of tumor necrosis factor-alpha by Gr-1 cells and its role in the host defense to pneumococcal infection in lungs. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58: 182-192.
149. Ivanov S, Fontaine J, Paget C, Macho-Fernandez E, Van-Maele L, et al. (2012) Key role for respiratory CD103+ dendritic cells, IFN-gamma and IL-17 in protection against *Streptococcus pneumoniae* infection in response to alpha-galactosylceramide. *J Infect Dis* In press.
150. Lu YJ, Yadav P, Clements JD, Forte S, Srivastava A, et al. (2011) Options for inactivation, adjuvant, and route of topical administration of a killed, unencapsulated pneumococcal whole-cell vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 17: 1005-1012.
151. Lundgren A, Bhuiyan TR, Novak D, Kaim J, Reske A, et al. (2012) Characterization of Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae* in humans: comparisons between adults and children in a developed and a developing country. *Vaccine* 30: 3897-3907.
152. Malley R, Srivastava A, Lipsitch M, Thompson CM, Watkins C, et al. (2006) Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide. *Infect Immun* 74: 2187-2195.
153. Zhang Z, Clarke TB, Weiser JN (2009) Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *J Clin Invest* 119: 1899-1909.
154. Iwakura Y, Ishigame H (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116: 1218-1222.
155. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, et al. (2008) IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14: 275-281.
156. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK (2007) Interleukin-17 in pulmonary host defense. *Exp Lung Res* 33: 507-518.
157. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK (2007) Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol* 19: 377-382.

158. Nelson AL, Barasch JM, Bunte RM, Weiser JN (2005) Bacterial colonization of nasal mucosa induces expression of siderocalin, an iron-sequestering component of innate immunity. *Cell Microbiol* 7: 1404-1417.
159. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, et al. (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203: 2271-2279.
160. Ivanov S, Bozinovski S, Bossios A, Valadi H, Vlahos R, et al. (2007) Functional relevance of the IL-23-IL-17 axis in lungs in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 442-451.
161. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, et al. (2008) Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 14: 282-289.
162. Vignali DA, Kuchroo VK (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* 13: 722-728.
163. Huber M, Brustle A, Reinhard K, Guralnik A, Walter G, et al. (2008) IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20846-20851.
164. Dittrich AM, Meyer HA, Hamelmann E (2013) The role of lipocalins in airway disease. *Clin Exp Allergy* 43: 503-511.
165. Ruvinsky R, Gentile, A. Regueira, M. y Corso, A., Pace, P., Bakir, J., Di Fabio, J.L., Rossi, A. (2004) Infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*: estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia. *Arch Pediatr Urug* 75: 91-103.
166. Kerr AR, Irvine JJ, Search JJ, Gingles NA, Kadioglu A, et al. (2002) Role of inflammatory mediators in resistance and susceptibility to pneumococcal infection. *Infect Immun* 70: 1547-1557.
167. Gingles NA, Alexander JE, Kadioglu A, Andrew PW, Kerr A, et al. (2001) Role of genetic resistance in invasive pneumococcal infection: identification and study of susceptibility and resistance in inbred mouse strains. *Infect Immun* 69: 426-434.
168. Preston JA, Beagley KW, Gibson PG, Hansbro PM (2004) Genetic background affects susceptibility in nonfatal pneumococcal bronchopneumonia. *Eur Respir J* 23: 224-231.
169. Kadioglu A, Andrew PW (2005) Susceptibility and resistance to pneumococcal disease in mice. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4: 241-247.
170. Tsuchiya K, Toyama K, Tsuprun V, Hamajima Y, Kim Y, et al. (2007) Pneumococcal peptidoglycan-polysaccharides induce the expression of interleukin-8 in airway epithelial cells by way of nuclear factor-kappaB, nuclear factor interleukin-6, or activation protein-1 dependent mechanisms. *Laryngoscope* 117: 86-91.
171. Kirby AC, Raynes JG, Kaye PM (2005) The role played by tumor necrosis factor during localized and systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 191: 1538-1547.
172. Rijneveld AW, van den Dobbelsteen GP, Florquin S, Standiford TJ, Speelman P, et al. (2002) Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *J Infect Dis* 185: 123-126.
173. Rijneveld AW, Florquin S, Branger J, Speelman P, Van Deventer SJ, et al. (2001) TNF-alpha compensates for the impaired host defense of IL-1 type I receptor-deficient mice during pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 167: 5240-5246.
174. Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W (1993) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 177: 1277-1286.
175. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, et al. (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9: 899-909.
176. Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, et al. (1997) Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol* 159: 3595-3602.
177. Kobayashi Y (2008) The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 13: 2400-2407.
178. Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, et al. (2003) Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 74: 448-455.

179. Yung SC, Murphy PM (2012) Antimicrobial chemokines. *Front Immunol* 3: 276.
180. Olliver M, Hiew J, Mellroth P, Henriques-Normark B, Bergman P (2011) Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 79: 4210-4217.
181. Freitas A, Alves-Filho JC, Victoni T, Secher T, Lemos HP, et al. (2009) IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. *J Immunol* 182: 7846-7854.
182. Godinez I, Raffatellu M, Chu H, Paixao TA, Haneda T, et al. (2009) Interleukin-23 orchestrates mucosal responses to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestine. *Infect Immun* 77: 387-398.
183. Ma J, Wang J, Wan J, Charboneau R, Chang Y, et al. (2010) Morphine disrupts interleukin-23 (IL-23)/IL-17-mediated pulmonary mucosal host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 78: 830-837.
184. Meeks KD, Sieve AN, Kolls JK, Ghilardi N, Berg RE (2009) IL-23 is required for protection against systemic infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 183: 8026-8034.
185. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, et al. (2001) Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194: 519-527.
186. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, et al. (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421: 744-748.
187. Wiekowski MT, Leach MW, Evans EW, Sullivan L, Chen SC, et al. (2001) Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *J Immunol* 166: 7563-7570.
188. Qian X, Ning H, Zhang J, Hoft DF, Stumpo DJ, et al. (2011) Posttranscriptional regulation of IL-23 expression by IFN-gamma through tristetraprolin. *J Immunol* 186: 6454-6464.
189. Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ (2007) IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 282: 34605-34610.
190. Spolski R, Leonard WJ (2008) The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Immunol* 20: 295-301.
191. Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, Sprent J, Mackay CR, et al. (2008) A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* 29: 127-137.
192. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, et al. (2008) Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29: 138-149.
193. Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, et al. (2002) A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298: 1630-1634.
194. Pene J, Gauchat JF, Lecart S, Drouet E, Guglielmi P, et al. (2004) Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J Immunol* 172: 5154-5157.
195. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK (2012) The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1826: 129-169.
196. Hansman D, Devitt L, Miles H, Riley I (1974) Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea. *Med J Aust* 2: 353-356.
197. Appelbaum PC (1996) Emerging resistance to antimicrobial agents in gram-positive bacteria. *Pneumococci. Drugs* 51 Suppl 1: 1-5.
198. Appelbaum PC, Gladkova C, Hryniewicz W, Kojouharov B, Kotulova D, et al. (1996) Carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* by children in eastern and central Europe--a multicenter study with use of standardized methods. *Clin Infect Dis* 23: 712-717.
199. Choi EH, Lee HJ (1998) Clinical outcome of invasive infections by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Korean children. *Clin Infect Dis* 26: 1346-1354.
200. Appelbaum PC (1992) Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin Infect Dis* 15: 77-83.
201. Link C, Gavioli R, Ebensen T, Canella A, Reinhard E, et al. (2004) The Toll-like receptor ligand MALP-2 stimulates dendritic cell maturation and modulates proteasome composition and activity. *Eur J Immunol* 34: 899-907.

202. Rharbaoui F, Drabner B, Borsutzky S, Winckler U, Morr M, et al. (2002) The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. *Eur J Immunol* 32: 2857-2865.
203. Knothe S, Mutschler V, Rochlitzer S, Winkler C, Ebensen T, et al. (2011) Local treatment with BPPcysMPEG reduces allergic airway inflammation in sensitized mice. *Immunobiology* 216: 110-117.
204. Prajeeth CK, Jirmo AC, Krishnaswamy JK, Ebensen T, Guzman CA, et al. (2010) The synthetic TLR2 agonist BPPcysMPEG leads to efficient cross-priming against co-administered and linked antigens. *Eur J Immunol* 40: 1272-1283.
205. Escobar D, Pons J, Clemente A, Iglesias J, Regueiro V, et al. (2010) Defective B cell response to TLR9 ligand (CpG-ODN), *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* extracts in common variable immunodeficiency patients. *Cell Immunol* 262: 105-111.
206. Karaolis DK, Means TK, Yang D, Takahashi M, Yoshimura T, et al. (2007) Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. *J Immunol* 178: 2171-2181.
207. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738.
208. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, et al. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5: 730-737.
209. Clement CG, Evans SE, Evans CM, Hawke D, Kobayashi R, et al. (2008) Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 1322-1330.
210. Ogunniyi AD, Paton JC, Kirby AC, McCullers JA, Cook J, et al. (2008) c-di-GMP is an effective immunomodulator and vaccine adjuvant against pneumococcal infection. *Vaccine* 26: 4676-4685.
211. Reppe K, Tschernig T, Luhrmann A, van Laak V, Grote K, et al. (2009) Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40: 474-481.
212. Karaolis DK, Newstead MW, Zeng X, Hyodo M, Hayakawa Y, et al. (2007) Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia. *Infect Immun* 75: 4942-4950.
213. Schroder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, et al. (2003) Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 278: 15587-15594.
214. Weber JR, Freyer D, Alexander C, Schroder NW, Reiss A, et al. (2003) Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity* 19: 269-279.
215. Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, et al. (2002) Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 186: 798-806.
216. Knapp S, Wieland CW, van 't Veer C, Takeuchi O, Akira S, et al. (2004) Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J Immunol* 172: 3132-3138.
217. Mills E, Pultz IS, Kulasekara HD, Miller SI (2011) The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol* 13: 1122-1129.
218. Ebensen T, Schulze K, Riese P, Link C, Morr M, et al. (2007) The bacterial second messenger cyclic diGMP exhibits potent adjuvant properties. *Vaccine* 25: 1464-1469.
219. Kinjo Y, Illarionov P, Vela JL, Pei B, Girardi E, et al. (2011) Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol* 12: 966-974.
220. McCarthy C, Shepherd D, Fleire S, Stronge VS, Koch M, et al. (2007) The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. *J Exp Med* 204: 1131-1144.
221. Zygmunt BM, Weissmann SF, Guzman CA (2012) NKT cell stimulation with alpha-galactosylceramide results in a block of Th17 differentiation after intranasal immunization in mice. *PLoS One* 7: e30382.

- 222.Lu YJ, Forte S, Thompson CM, Anderson PW, Malley R (2009) Protection against Pneumococcal colonization and fatal pneumonia by a trivalent conjugate of a fusion protein with the cell wall polysaccharide. *Infect Immun* 77: 2076-2083.
- 223.Lu YJ, Gross J, Bogaert D, Finn A, Bagrade L, et al. (2008) Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog* 4: e1000159.
- 224.Kawabata M, Kurono Y (2011) Polyinosine-polycytidylic acid enhances cellular adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Laryngoscope* 121: 2443-2448.
- 225.Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI (1995) *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377: 435-438.
- 226.Zgair AK (2012) Flagellin administration protects respiratory tract from *Burkholderia cepacia* infection. *J Microbiol Biotechnol* 22: 907-916.
- 227.Coccia MR, Facklam RR, Saravolatz LD, Manzor O (1998) Recurrent pneumococcal bacteremia: 34 episodes in 15 patients. *Clin Infect Dis* 26: 982-985.
- 228.Grandsden WR, Eykyn SJ (1992) Recurrent pneumococcal bacteremia. *Clin Infect Dis* 15: 1072-1073.
- 229.Mason EO, Jr., Wald ER, Tan TQ, Schutze GE, Bradley JS, et al. (2007) Recurrent systemic pneumococcal disease in children. *Pediatr Infect Dis J* 26: 480-484.
- 230.Orlicek SL, Herrod HG, Leggiadro RJ, Luedtke G, English BK (1997) Repeated invasive pneumococcal infections in young children without apparent underlying immunodeficiency. *J Pediatr* 130: 284-288.
- 231.Honko AN, Mizel SB (2004) Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect Immun* 72: 6676-6679.
- 232.Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB (2006) Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 74: 1113-1120.
- 233.McEwen J, Levi R, Horwitz RJ, Arnon R (1992) Synthetic recombinant vaccine expressing influenza haemagglutinin epitope in *Salmonella* flagellin leads to partial protection in mice. *Vaccine* 10: 405-411.
- 234.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: 3797-3808.
- 235.Wang BZ, Xu R, Quan FS, Kang SM, Wang L, et al. (2010) Intranasal immunization with influenza VLPs incorporating membrane-anchored flagellin induces strong heterosubtypic protection. *PLoS One* 5: e13972.
- 236.Choi YH, Roehrl MH, Kasper DL, Wang JY (2002) A unique structural pattern shared by T-cell-activating and abscess-regulating zwitterionic polysaccharides. *Biochemistry* 41: 15144-15151.
- 237.Cobb BA, Kasper DL (2005) Zwitterionic capsular polysaccharides: the new MHCII-dependent antigens. *Cell Microbiol* 7: 1398-1403.
- 238.Mizel SB, Bates JT (2010) Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol* 185: 5677-5682.
- 239.Parker D, Prince A (2011) Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 189-201.
- 240.Marriott HM, Dockrell DH (2007) The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp Lung Res* 33: 493-505.
- 241.Bootsma HJ, Egmont-Petersen M, Hermans PW (2007) Analysis of the in vitro transcriptional response of human pharyngeal epithelial cells to adherent *Streptococcus pneumoniae*: evidence for a distinct response to encapsulated strains. *Infect Immun* 75: 5489-5499.
- 242.Robson RL, Reed NA, Horvat RT (2006) Differential activation of inflammatory pathways in A549 type II pneumocytes by *Streptococcus pneumoniae* strains with different adherence properties. *BMC Infect Dis* 6: 71.
- 243.Schmeck B, Huber S, Moog K, Zahlten J, Hocke AC, et al. (2006) Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappaB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L730-L737.

244. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, et al. (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 7: 576-582.
245. Wang JX, Bair AM, King SL, Shnayder R, Huang YF, et al. (2012) Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a beta2-integrin-dependent mechanism. *Blood* 120: 1489-1498.
246. Jonker MA, Sano Y, Hermsen JL, Lan J, Kudsk KA (2010) Proinflammatory cytokine surge after injury stimulates an airway immunoglobulin A increase. *J Trauma* 69: 843-848.
247. Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, et al. (1995) Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13: 257-261.
248. Fernandez S, Jose P, Avdiushko MG, Kaplan AM, Cohen DA (2004) Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. *J Immunol* 172: 2613-2620.
249. Holt PG (1993) Regulation of antigen-presenting cell function(s) in lung and airway tissues. *Eur Respir J* 6: 120-129.
250. Soltys J, Bonfield T, Chmiel J, Berger M (2002) Functional IL-10 deficiency in the lung of cystic fibrosis (cfr(-/-)) and IL-10 knockout mice causes increased expression and function of B7 costimulatory molecules on alveolar macrophages. *J Immunol* 168: 1903-1910.
251. Poe SL, Arora M, Oriss TB, Yarlagadda M, Isse K, et al. (2013) STAT1-regulated lung MDSC-like cells produce IL-10 and efferocytose apoptotic neutrophils with relevance in resolution of bacterial pneumonia. *Mucosal Immunol* 6: 189-199.
252. Sawa T, Corry DB, Gropper MA, Ohara M, Kurahashi K, et al. (1997) IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Immunol* 159: 2858-2866.
253. Bowen T, Jenkins RH, Fraser DJ (2013) MicroRNAs, transforming growth factor beta-1, and tissue fibrosis. *J Pathol* 229: 274-285.
254. Xu P, Liu J, Derynck R (2012) Post-translational regulation of TGF-beta receptor and Smad signaling. *FEBS Lett* 586: 1871-1884.
255. De Boeck M, ten Dijke P (2012) Key role for ubiquitin protein modification in TGFbeta signal transduction. *Ups J Med Sci* 117: 153-165.
256. Haiqi H, Yong Z, Yi L (2011) Transcriptional regulation of Foxp3 in regulatory T cells. *Immunobiology* 216: 678-685.
257. Lysenko ES, Clarke TB, Shchepetov M, Ratner AJ, Roper DI, et al. (2007) Nod1 signaling overcomes resistance of *S. pneumoniae* to opsonophagocytic killing. *PLoS Pathog* 3: e118.
258. Baxendale HE, Johnson M, Stephens RC, Yuste J, Klein N, et al. (2008) Natural human antibodies to pneumococcus have distinctive molecular characteristics and protect against pneumococcal disease. *Clin Exp Immunol* 151: 51-60.
259. McCool TL, Hoey JG, Montileone F, Goldenberg HB, Mordechai E, et al. (2008) Discovery and analysis of *Bartonella henselae* antigens for use in clinical serologic assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 60: 17-23.
260. Sharma M (2010) Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. *Crit Rev Biotechnol* 30: 1-22.
261. Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, et al. (2008) Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med* 205: 323-329.
262. Morris AE, Liggitt HD, Hawn TR, Skerrett SJ (2009) Role of Toll-like receptor 5 in the innate immune response to acute *P. aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L1112-1119.
263. Janot L, Sirard JC, Secher T, Noulin N, Fick L, et al. (2009) Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur J Immunol*.
264. Im J, Jeon JH, Cho MK, Woo SS, Kang SS, et al. (2009) Induction of IL-8 expression by bacterial flagellin is mediated through lipid raft formation and intracellular TLR5 activation in A549 cells. *Mol Immunol* 47: 614-622.
265. Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, et al. (2004) Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 777-783.

266. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP (2004) Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 358-364.
267. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A (2004) *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 627-634.
268. Botelho FM, Bauer CM, Finch D, Nikota JK, Zavitz CC, et al. (2011) IL-1alpha/IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice. *PLoS One* 6: e28457.
269. Bhatia M, Zemans RL, Jeyaseelan S (2012) Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 566-572.
270. Conti P, DiGiacchino M (2001) MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc* 22: 133-137.
271. Maune S, Werner JA, Sticherling M, Schroder JM (1997) Fibroblasts obtained from human nasal, laryngeal and tracheal mucosa produce the chemokine RANTES. *Otolaryngol Pol* 51: 3-10.
272. Hiemstra PS (2007) The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Exp Lung Res* 33: 537-542.
273. Guo FH, Erzurum SC (1998) Characterization of inducible nitric oxide synthase expression in human airway epithelium. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 5: 1119-1124.
274. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, et al. (2004) The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 5: 1052-1060.
275. Oshima N, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Mishima Y, et al. (2010) A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signalling in intestinal epithelial cells during inflammation. *Clin Exp Immunol* 159: 185-198.
276. Welch DF, Sword CP, Brehm S, Dusanic D (1979) Relationship between superoxide dismutase and pathogenic mechanisms of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 23: 863-872.
277. Donowitz GR, Reardon I, Dowling J, Rubin L, Focht D (1990) Ingestion of *Legionella micdadei* inhibits human neutrophil function. *Infect Immun* 58: 3307-3311.
278. Robertson MD, Seaton A, Milne LJ, Raeburn JA (1987) Suppression of host defences by *Aspergillus fumigatus*. *Thorax* 42: 19-25.
279. Paton JC, Ferrante A (1983) Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect Immun* 41: 1212-1216.
280. Dahlgren C, Karlsson A (1999) Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 232: 3-14.
281. Perry FE, Elson CJ, Greenham LW, Catterall JR (1993) Interference with the oxidative response of neutrophils by *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* 48: 364-369.
282. Perry FE, Elson CJ, Mitchell TJ, Andrew PW, Catterall JR (1994) Characterisation of an oxidative response inhibitor produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* 49: 676-683.
283. Zgair AK (2012) *Escherichia coli* flagellin stimulates pro-inflammatory immune response. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 2139-2146.
284. Van Maele L (2010) Propriétés immuno-modulatrices de la flagelline de *Salmonella typhimurium*: impact sur la défense anti-bactérienne et le développement d'adjuvants épithéliaux. [Doctorat]: Université Lille nord de France-Université du Droit et de la Santé de Lille II.
285. Shanley TP, Vasi N, Denenberg A (2000) Regulation of chemokine expression by IL-10 in lung inflammation. *Cytokine* 12: 1054-1064.
286. Raychaudhuri B, Fisher CJ, Farver CF, Malur A, Drazba J, et al. (2000) Interleukin 10 (IL-10)-mediated inhibition of inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Cytokine* 12: 1348-1355.
287. Kishore R, Tebo JM, Kolosov M, Hamilton TA (1999) Cutting edge: clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated mRNA destabilization in mouse macrophages. *J Immunol* 162: 2457-2461.
288. Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, Aderem A (2007) TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol* 29: 275-288.

289. Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, et al. (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* 7: 569-575.
290. Jacchieri SG, Torquato R, Brentani RR (2003) Structural study of binding of flagellin by Toll-like receptor 5. *J Bacteriol* 185: 4243-4247.
291. Eddens T, Kolls JK (2012) Host defenses against bacterial lower respiratory tract infection. *Curr Opin Immunol* 24: 424-430.
292. Hawn TR, Berrington WR, Smith IA, Uematsu S, Akira S, et al. (2007) Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with *Legionella pneumophila*. *J Immunol* 179: 6981-6987.
293. Shibata T, Takemura N, Motoi Y, Goto Y, Karuppuchamy T, et al. (2012) PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. *Int Immunol* 24: 613-623.
294. Lewis DJ, Huo Z, Barnett S, Kromann I, Giemza R, et al. (2009) Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of *Escherichia coli* heat labile toxin. *PLoS One* 4: e6999.
295. Lusuardi M (2004) Challenging mucosal immunity with bacterial extracts to prevent respiratory infections: an old therapy revisited. *Monaldi Arch Chest Dis* 61: 4-5.
296. Pozzi E, Serra C (2004) Efficacy of Lantigen B in the prevention of bacterial respiratory infections. *Monaldi Arch Chest Dis* 61: 19-27.
297. Rozy A, Chorostowska-Wynimko J (2008) Bacterial immunostimulants--mechanism of action and clinical application in respiratory diseases. *Pneumonol Alergol Pol* 76: 353-359.
298. Ciepiela O, Zawadzka-Krajewska A, Kotula I, Pyrzak B, Demkow U (2013) Influence of sublingual immunotherapy on the expression of Mac-1 integrin in neutrophils from asthmatic children. *Adv Exp Med Biol* 756: 73-80.
299. Zhang T, Hashizume T, Kurita-Ochiai T, Yamamoto M (2009) Sublingual vaccination with outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* and Flt3 ligand elicits protective immunity in the oral cavity. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 937-941.
300. Song JH, Nguyen HH, Cuburu N, Horimoto T, Ko SY, et al. (2008) Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1644-1649.
301. Cuburu N, Kweon MN, Hervouet C, Cha HR, Pang YY, et al. (2009) Sublingual immunization with nonreplicating antigens induces antibody-forming cells and cytotoxic T cells in the female genital tract mucosa and protects against genital papillomavirus infection. *J Immunol* 183: 7851-7859.
302. Kweon MN (2011) Sublingual mucosa: A new vaccination route for systemic and mucosal immunity. *Cytokine* 54: 1-5.
303. Kauppila JH, Mattila AE, Karttunen TJ, Salo T (2013) Toll-like receptor 5 (TLR5) expression is a novel predictive marker for recurrence and survival in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer* 108: 638-643.
304. Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, et al. (2008) Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 122: 603-609 e605.
305. Mascarell L, Saint-Lu N, Moussu H, Zimmer A, Louise A, et al. (2011) Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice. *Mucosal Immunol* 4: 638-647.
306. Tomalka J, Ganesan S, Azodi E, Patel K, Majmudar P, et al. (2011) A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 7: e1002379.
307. Goswami T, Jasti B, Li X (2008) Sublingual drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 25: 449-484.
308. Kulkarni U, Mahalingam R, Pather SI, Li X, Jasti B (2009) Porcine buccal mucosa as an in vitro model: relative contribution of epithelium and connective tissue as permeability barriers. *J Pharm Sci* 98: 471-483.
309. Squier CA, Hall BK (1985) The permeability of skin and oral mucosa to water and horseradish peroxidase as related to the thickness of the permeability barrier. *J Invest Dermatol* 84: 176-179.

310. Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, et al. (2012) New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Adv Drug Deliv Rev* 64: 16-28.
311. Mascarell L, Lombardi V, Zimmer A, Louise A, Tourdot S, et al. (2009) Mapping of the lingual immune system reveals the presence of both regulatory and effector CD4+ T cells. *Clin Exp Allergy* 39: 1910-1919.
312. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Songhet P, Dumoutier L, et al. (2010) TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *J Immunol* 185: 1177-1185.
313. Fujikuyama Y, Tokuhara D, Kataoka K, Gilbert RS, McGhee JR, et al. (2012) Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity. *Expert Rev Vaccines* 11: 367-379.
314. Loucq C (2013) Vaccines today, vaccines tomorrow: a perspective. *Clin Exp Vaccine Res* 2: 4-7.
315. Foged C (2011) Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems. *Ther Deliv* 2: 1057-1077.
316. Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM (2011) TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* 29: 3341-3355.
317. Villadangos JA, Schnorrer P (2007) Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7: 543-555.
318. Song JH, Kim JI, Kwon HJ, Shim DH, Parajuli N, et al. (2009) CCR7-CCL19/CCL21-regulated dendritic cells are responsible for effectiveness of sublingual vaccination. *J Immunol* 182: 6851-6860.
319. Grotiuz G, Rial A, Pereira M, Chabalgoity JA. Cloning and production of a truncated form of pneumolysin for its use in a streptococcus pneumoniae vaccine. . V Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI). . In: (ALAI) ALAI, editor; 1999; Punta del Este, Uruguay.
320. Mizel SB, Graff AH, Srianganathan N, Ervin S, Lees CJ, et al. (2009) Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol* 16: 21-28.
321. Jeon SH, Ben-Yedidia T, Arnon R (2002) Intranasal immunization with synthetic recombinant vaccine containing multiple epitopes of influenza virus. *Vaccine* 20: 2772-2780.
322. Le Moigne V, Robreau G, Mahana W (2008) Flagellin as a good carrier and potent adjuvant for Th1 response: study of mice immune response to the p27 (Rv2108) Mycobacterium tuberculosis antigen. *Mol Immunol* 45: 2499-2507.
323. McDonald WF, Huleatt JW, Foellmer HG, Hewitt D, Tang J, et al. (2007) A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *J Infect Dis* 195: 1607-1617.
324. Nguyen CT, Kim SY, Kim MS, Lee SE, Rhee JH (2011) Intranasal immunization with recombinant PspA fused with a flagellin enhances cross-protective immunity against Streptococcus pneumoniae infection in mice. *Vaccine* 29: 5731-5739.
325. Salman HH, Irache JM, Gamazo C (2009) Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination. *Vaccine* 27: 4784-4790.
326. Pino O, Martin M, Michalek SM (2005) Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of Salmonella enterica Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. *Infect Immun* 73: 6763-6770.
327. Sanders CJ, Franchi L, Yarovinsky F, Uematsu S, Akira S, et al. (2009) Induction of adaptive immunity by flagellin does not require robust activation of innate immunity. *Eur J Immunol* 39: 359-371.
328. Manicassamy S, Pulendran B (2009) Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol* 21: 185-193.
329. Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5: 987-995.
330. Pasare C, Medzhitov R (2004) Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 6: 1382-1387.

331. Rhee JH, Lee SE, Kim SY (2012) Mucosal vaccine adjuvants update. *Clin Exp Vaccine Res* 1: 50-63.
332. Borsutzky S, Kretschmer K, Becker PD, Muhlradt PF, Kirschning CJ, et al. (2005) The mucosal adjuvant macrophage-activating lipopeptide-2 directly stimulates B lymphocytes via the TLR2 without the need of accessory cells. *J Immunol* 174: 6308-6313.
333. Hammerbeck DM, Burleson GR, Schuller CJ, Vasilakos JP, Tomai M, et al. (2007) Administration of a dual toll-like receptor 7 and toll-like receptor 8 agonist protects against influenza in rats. *Antiviral Res* 73: 1-11.
334. Gavin AL, Hoebe K, Duong B, Ota T, Martin C, et al. (2006) Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* 314: 1936-1938.
335. Vijay-Kumar M, Carvalho FA, Aitken JD, Fifadara NH, Gewirtz AT (2010) TLR5 or NLRC4 is necessary and sufficient for promotion of humoral immunity by flagellin. *Eur J Immunol* 40: 3528-3534.
336. Bates JT, Uematsu S, Akira S, Mizel SB (2009) Direct stimulation of tlr5+/+ CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *J Immunol* 182: 7539-7547.
337. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM (2012) Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13: 1145-1154.
338. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, et al. (2009) House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15: 410-416.
339. Turvey SE, Broide DH (2010) Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125: S24-32.
340. Chabalgoity JA, Dougan G, Mastroeni P, Aspinall RJ (2002) Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer. *Expert Rev Vaccines* 1: 495-505.
341. Wang HY, Wang RF (2012) Enhancing cancer immunotherapy by intracellular delivery of cell-penetrating peptides and stimulation of pattern-recognition receptor signaling. *Adv Immunol* 114: 151-176.
342. Re F, Strominger JL (2004) IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol* 173: 7548-7555.
343. Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, et al. (2000) Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 165: 7096-7101.
344. Salamone GV, Petracca Y, Fuxman Bass JI, Rumbo M, Nahmod KA, et al. (2010) Flagellin delays spontaneous human neutrophil apoptosis. *Lab Invest* 90: 1049-1059.
345. Feuillet V MS, Mondor I, Demaria O, Pagni PP, Galan JE, Flavell RA, and Alexopoulou L (2006) Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12487-12492.
346. Sierro F, Dubois B, Coste A, Kaiserlian D, Kraehenbuhl JP, et al. (2001) Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13722-13727.
347. Zeng H, Carlson AQ, Guo Y, Yu Y, Collier-Hyams LS, et al. (2003) Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J Immunol* 171: 3668-3674.
348. Rothen-Rutishauser BM, Kiama SG, Gehr P (2005) A three-dimensional cellular model of the human respiratory tract to study the interaction with particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 281-289.
349. Woo CH, Yoo MH, You HJ, Cho SH, Mun YC, et al. (2003) Transepithelial migration of neutrophils in response to leukotriene B4 is mediated by a reactive oxygen species-extracellular signal-regulated kinase-linked cascade. *J Immunol* 170: 6273-6279.
350. Yim L, Betancor L, Martinez A, Giossa G, Bryant C, et al. (2010) Differential phenotypic diversity among epidemic-spanning *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates from humans or animals. *Appl Environ Microbiol* 76: 6812-6820.
351. Rossi S. SG, Caramella C. (2005) Buccal Delivery Systems for Peptides: Recent Advances. *Am J Drug Deliv* 3 215-225.

352. Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, et al. (2010) Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J Infect Dis* 201: 534-543.
353. Meeusen EN (2011) Exploiting mucosal surfaces for the development of mucosal vaccines. *Vaccine* 29: 8506-8511.
354. Kunkel EJ, Butcher EC (2003) Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* 3: 822-829.
355. Quiding-Jarbrink M, Nordstrom I, Granstrom G, Kilander A, Jertborn M, et al. (1997) Differential expression of tissue-specific adhesion molecules on human circulating antibody-forming cells after systemic, enteric, and nasal immunizations. A molecular basis for the compartmentalization of effector B cell responses. *J Clin Invest* 99: 1281-1286.
356. Didierlaurent A, Ferrero I, Otten LA, Dubois B, Reinhardt M, et al. (2004) Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol* 172: 6922-6930.
357. Amer A, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Ozoren N, et al. (2006) Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem* 281: 35217-35223.
358. Vijay-Kumar M, Gewirtz AT (2009) Flagellin: key target of mucosal innate immunity. *Mucosal Immunol* 2: 197-205.

PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA & TÉCNICA ASOCIADA A LA TESIS

Publicaciones derivadas de la Tesis:

Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection.

Infection and Immunity, 2010; 78(10):4226 - 4233, 2010. Article selected for Spotlight Section of the issue.

MUÑOZ, N.; Van Maele, L.; Marques, J.M.; Rial, A.; Sirard, J.C.; Chabalgoity, J.A.

Publicaciones Asocidas:

Protection against Streptococcus pneumoniae serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN- γ mediated immunity.

Immunobiology. 2012, 217(4):420-9.

Marques, J.M.; Rial, A.; MUÑOZ, N.; Pelay, FX; Van Maele, L; Leger, H; Camou, T; Sirard, JC; Benecke, A; Chabalgoity, J.A.

Key role for respiratory CD103⁺ dendritic cells, IFN- γ and IL-17 in protection against Streptococcus pneumoniae infection in response to α -galactosylceramide.

Journal of Infectious Diseases, 2012; 206(5):723–34.

Ivanov, S.; Fontaine, J.; Paget, C.; Macho-Fernandez, E.; Van Maele, L.; Renneson, J.; Maillet, I.; MUÑOZ, N.; Rial, A.; Léger, H.; Ryffel, B.; Frisch, B.; Chabalgoity, J.A.; Sirard, J.C.; Benecke, A.; Trottein, F.

Patentes Asocidas:

#WO/2011/161491, "Methods and pharmaceutical compositions for the treatment of respiratory tract infections". Sirard, JC. Chabalgoity, JA

Presentaciones Dictadas:

Using immunopotentiating capacity of flagellin for sublingual immunotherapy.

MUÑOZ-WOLF, N.; Rial, A.; Saavedra, J.; Tabareau, J.; Fougeron, D.; Marqués, J.; Sirard, J.C.; Chabalgoity, J.A.

Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI) (Aceptado). 2013.

Evaluación preclínica de antígenos y adyuvantes para el desarrollo de vacunas antineumocócicas de aplicación sublingual.

MUÑOZ, N., Rial, A.; Marqués, JM; Saavedra,JS; Chabalgoity, JA.

X Encuentro Nacional de Microbiólogos, Montevideo, 2013.

PAMPs as basis for the development of new immune-therapies against *Streptococcus pneumoniae*

MUÑOZ, N.; Marqués, J.M.; Van Maele, L; Rial, A.; Sirard, JC; Chabalgoity, J.A.

9th Latin American Congress of Immunology , Viña del mar , 2009

Dynamics of protective immune responses in *S. pneumoniae* respiratory infection.

Rial, A; Marqués, JM; MUÑOZ, N; Van Maele, L; Sirard, JC; Chabalgoity, JA.

International Mini-Symposium on Respiratory Infections and Immunity at the Institut Pasteur de Lille – France, 2009

Presentaciones en Congresos:

//17a deficient mice show reduced primary and impaired secondary antibody response against capsular PnPS1 after pneumococcal infection.

Marques, J.M.; Rial, A.; MUÑOZ, N.; Crispo, M.; Iwakura, Y.; Sirard, J.C.; Chabalgoity.

Cold Spring Harbor Asia Conference, Infection and Immunity. Suzhou, China , 2011.

TLR5-mediated activation of CD4+CD127+ innate immune cells expressing Th17-related cytokines protects against gut infection.

Carnoy, C; Van Maele, L; MUÑOZ, N.; Chabalgoity, J.A.; Rumbo, M; Hardt, WD; Sirard, JC

9th Latin American Congress of Immunology , Viña del mar , 2009

Manuscritos en Preparación:

Sublingual immunotherapy: new options for treatment and prevention of pneumococcal pneumonia.

MUÑOZ-WOLF, N.; Rial, A.; Saavedra, J.; Tabareau, J.; Fougeron, D.; Marqués, J.; Sirard, J.C.;

Chabalgoity, J.A.

Flagellin is an effective adjuvant for sublingual immunization.

MUÑOZ-WOLF, N.; Rial, A.; Marqués, J.; Saavedra, J.; Tabareau, J.; Fougeron, D.; Sirard, J.C.;

Chabalgoity, J.A.

SPOTLIGHT

Articles of Significant Interest Selected from This Issue by the Editors

Introduce a Foreign Body in the Murine Bladder and Say Hello to Persistent Enterococcal Urinary Tract Infections

Enterococcus species are predominant causative agents of catheter-associated urinary tract infections (CAUTIs). However, the scarcity of appropriate animal models hinders the investigation of enterococcal uropathogenesis. By optimizing a murine model of CAUTI, Guiton and colleagues (p. 4166–4175) show that the presence of a foreign body in the murine bladder induces histological changes, allows biofilm formation, and predisposes the bladder and kidneys to persistent enterococcal colonization. They also demonstrate that virulence in this model is independent of autolytic processes but requires the housekeeping gene encoding sortase A (SrtA). This murine model provides a valuable tool for uncovering novel biofilm and virulence determinants of enterococcal CAUTIs.

Humoral Immunity Correlates with Protection from *Pneumocystis* Colonization and COPD in a Simian Model of HIV Infection

Pulmonary colonization by *Pneumocystis* species is common in HIV-positive subjects and has been associated with development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). In this study, Kling and colleagues (p. 4320–4330) evaluate immunologic parameters associated with susceptibility to *Pneumocystis jiroveci* colonization in a simian-human immunodeficiency virus (SHIV) model. SHIV-infected macaques colonized with *P. jiroveci* develop COPD whereas macaques infected with SHIV alone have normal lung function. Macaques develop a humoral immune response to a *Pneumocystis* kexin-like protease, KEX1, in response to natural exposure to *P. jiroveci*, and low baseline anti-KEX1 titers predict susceptibility to colonization and development of COPD following immunosuppression. These results suggest that low KEX1 antibody titers may be a novel marker of risk of subsequent *Pneumocystis* colonization and development of COPD independent of CD4⁺ T-cell counts.

Microbes To Fight Microbes: Protecting against *Streptococcus pneumoniae* by Activation of Innate Defenses Using Microbe-Associated Molecular Patterns from Other Pathogens

Streptococcus pneumoniae remains the leading cause of community-acquired pneumonia worldwide. Innate defenses are essential to control pneumococcal infection, and several Toll-like receptors (TLRs) are involved in early detection and clearance of pneumococcus from the lungs. Using purified flagellin from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Muñoz and colleagues (p. 4226–4233) show that stimulation of innate immunity in the lung by a TLR that is not naturally engaged by *S. pneumoniae* can be highly protective against pneumonia caused by this organism. Protection is dependent on TLR5 signaling and polymorphonuclear leukocyte recruitment but independent of antibodies and T and B cells. This work highlights the potential of the alternative activation of innate defenses with microbe-associated molecular patterns (MAMPs) to control infections.

Mucosal Administration of Flagellin Protects Mice from *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection[▽]

Natalia Muñoz,¹† Laurye Van Maele,²† Juan M. Marqués,¹ Analía Rial,¹
Jean-Claude Sirard,² and José A. Chabalgoity^{1*}

Laboratory for Vaccine Research, Department of Biotechnology, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay,¹ and Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, CNRS, UMR 8204, and Université Lille Nord de France, Lille, France²

Received 5 March 2010/Returned for modification 14 April 2010/Accepted 13 July 2010

Streptococcus pneumoniae is a major cause of pneumonia in infants and the elderly. Innate defenses are essential to the control of pneumococcal infections, and deficient responses can trigger disease in susceptible individuals. Here we showed that flagellin can locally activate innate immunity and thereby increase the resistance to acute pneumonia. Flagellin mucosal treatment improved *S. pneumoniae* clearance in the lungs and promoted increased survival of infection. In addition, lung architecture was fully restored after the treatment of infected mice, indicating that flagellin allows the reestablishment of steady-state conditions. Using a flagellin mutant that is unable to signal through Toll-like receptor 5 (TLR5), we established that TLR5 signaling is essential for protection. In the respiratory tract, flagellin induced neutrophil infiltration into airways and upregulated the expression of genes coding for interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), CXCL1, CXCL2, and CCL20. Using depleting antibodies, we demonstrated that neutrophils are major effectors of protection. Further, we found that B- and T-cell-deficient SCID mice clear *S. pneumoniae* challenge to the same extent as immunocompetent animals, suggesting that these cell populations are not required for flagellin-induced protection. In conclusion, this study emphasizes that mucosal stimulation of innate immunity by a TLR not naturally engaged by *S. pneumoniae* can increase the potential to cure pneumococcal pneumonia.

Streptococcus pneumoniae (pneumococcus) causes respiratory infections among infants and the elderly worldwide (40, 44). Capsular polysaccharide is the main virulence factor, and its composition defines 91 serotypes of pneumococcus (42). Certain serotypes colonize the human nasopharynx asymptotically, representing a reservoir for interindividual transmission of the bacteria. In some individuals, colonization may progress to pneumococcal pneumonia and invasive disease (19, 36). In contrast, other serotypes, such as serotype 1, are rarely associated with colonization but cause invasive infections (28).

Activation of innate defenses is essential for the control of pneumococcal infection (1, 20). Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and TLR9, as well as the adaptor MyD88, participate in the early detection and clearance of pneumococcus in the lungs (reviewed in reference 42). The cytosolic receptors Nod1 (nucleotide-binding oligomerization domain 1) and Nod2 are also involved in the recognition of pneumococci (29). TLR signaling activates mucosal innate responses that culminate with the recruitment of phagocytes, such as polymorphonuclear neutrophils (PMN) and macrophages, and the production of microbicidal agents (for a review, see reference 8). This process triggers rapid eradication of the pathogen by phagocytosis as

well as by extracellular killing. In MyD88-deficient animals, *S. pneumoniae* is unable to intrinsically trigger any PMN recruitment into the airways, and animals thus have increased susceptibility to pneumonia (1). The contribution of TLR signaling in humans has been highlighted by a recent study showing that some MyD88 polymorphisms are associated with increased susceptibility to pneumococcal infection (43).

The modulation of immunity by the activity of innate receptors to elicit protective responses against infections is an emerging concept (6, 35). The rationale is to promote innate responses that greatly exceed in magnitude, quality, and dynamics the innate response triggered by the pathogen itself. The effectiveness of TLR agonists for therapeutic treatment of infectious diseases has been demonstrated in several animal models, including models of respiratory infections (6, 21, 35). TLR5 senses bacterial flagellins, which are the main constituents of flagella. Various cells of the pulmonary tract, including the epithelial cells (14, 33), express TLR5, and mucosal administration of flagellin induces MyD88-dependent signaling, characterized by the swift production of various proinflammatory cytokines and chemokines (3, 10, 15, 16, 27, 33), as well as by rapid and heavy neutrophil infiltration into the airways (2, 10, 16). Although *S. pneumoniae* does not have flagella, we hypothesized that activation of TLR5 signaling may promote new and appropriate protective innate defenses against ongoing acute pneumococcal infections. Here we report that local stimulation of innate immunity by flagellin from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium blocks the progression of pneumococcal pneumonia in mice.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Biotechnology, Laboratory for Vaccine Research, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11600, Uruguay. Phone: (598 2) 487 12 88, ext. 1120. Fax: (598 2) 487 30 73. E-mail: jachabal@higiene.edu.uy.

† N.M. and L.V.M. contributed equally to the present work.

[▽] Published ahead of print on 19 July 2010.

TABLE 1. Sequences of primers used for qRT-PCR

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product length (bp)
<i>Actb</i>	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	CGTCATCCATGGCGAACTG	68
<i>Cxcl1</i>	CTTGGTTTCAGAAAATTGTCCAAA	ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT	84
<i>Cxcl2</i>	CCCTCAACGGAAGAACCAAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC	72
<i>Ccl20</i>	TTTTGGGATGGAATTGGACAC	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC	69
<i>Il4</i>	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	95
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA	78
<i>Il17a</i>	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC	GGGTCTTCATTGCGGTGG	69
<i>Il17f</i>	CCCATGGGATTACAACACTACTC	CCTGGGCCCTCAGCGATC	66
<i>Il23a</i>	GCCCCGTATCCAGTGTGAAG	CGGATCCTTTGCAAGCAGAA	78
<i>Tgfb1</i>	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT	GAGTTTGTATCTTTGCTGTCACAAGA	76
<i>Tnf</i>	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	CCTCCACTTGGTGGTTTGTCT	63

MATERIALS AND METHODS

Bacterial preparation. *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 (clinical isolate E1586) was obtained from the National Reference Laboratory, Ministry of Health, Montevideo, Uruguay (39). Working stocks were prepared as follows. Todd-Hewitt yeast broth (THYB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was inoculated with fresh colonies of *S. pneumoniae* grown on blood agar plates, and the culture was incubated at 37°C until it reached an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.7 to 0.9. Cultures were stored at -80°C in THYB plus 12% (vol/vol) glycerol for as long as 3 months. For mouse infection, working stocks were thawed, washed with sterile physiological saline solution (saline), and diluted to the appropriate concentration. The number of bacteria in stocks was confirmed by plating serial dilutions onto blood agar plates.

Proteins. Native flagellin (FliC) from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SIN22 and recombinant flagellin mutants (FliC_{Δ174-400} and FliC_{Δ174-400/89-96*}) were prepared as described previously (27). Both mutants lack the hypervariable domain of flagellin, and FliC_{Δ174-400/89-96*} also carries a further amino acid substitution (amino acids [aa] 89 to 96) that prevents TLR5 signaling (27). All proteins contained low levels of lipopolysaccharide (LPS) (less than 30 pg LPS per μg, as determined with the *Limulus* assay). In some experiments, trypsin-hydrolyzed FliC (FliC/T) was used as a control. Native FliC was heated for 5 min at 65°C before use to ensure that the proteins were mostly monomers. The dose of flagellin used was 1 μg for all the experiments, since we and others have previously shown that administration of this dose by the intranasal (i.n.) route is optimal for eliciting strong local immune activation (15, 16). Further, unless otherwise specified, FliC, FliC/T, FliC_{Δ174-400} or FliC_{Δ174-400/89-96*} was always coadministered i.n. with the *S. pneumoniae* suspension. To exclude any direct effect of flagellin on bacterial viability, viable counts were determined prior to and after the incubation of *S. pneumoniae* with the same concentration of flagellin used for the *in vivo* assay. There were no significant differences between the number of bacteria recovered after incubation with flagellin and that recovered under the control condition.

Animal infections. Female mice of the BALB/c, C57BL/6J, and outbred NMRI strains (6 to 8 weeks old) were obtained from the National Division of Veterinary Laboratories (Uruguay) or the Janvier Laboratories (France). Female SCID mice (C.B-17 SCID) were obtained from the Institut Pasteur de Lille breeding facilities. These mice are characterized by the lack of B and T lymphocytes and by agammaglobulinemia. Animals were maintained in individually ventilated cages and were handled in a vertical laminar flow cabinet (class II A2; Esco, Hatboro, PA) for infection. All experiments complied with current national and institutional regulations and ethical guidelines (CHEA [Universidad de la República, Montevideo, Uruguay] and A59107 [Institut Pasteur de Lille]). Mice were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of 2.2 mg ketamine (Richmond Vet Pharma, Grand Bourg, Buenos Aires, Argentina) plus 0.11 mg xylazine (Portinco, Montevideo, Uruguay) in a total volume of 200 μl or by inhalation of isoflurane (Belamont, SAS, France) using a non-rebreathing anesthesia system (DRE Compact 150; DRE Veterinary, Louisville, KY). Bacteria and flagellins were administered into the nostrils of mice in 20 to 50 μl of saline. The survival of mice was recorded daily.

For depletion of granulocytes, 100 μg of anti-Gr-1 (RB6-8C5) or an isotype control (HB152) was administered i.p. 24 h before i.n. challenge with *S. pneumoniae* (24). The anti-Gr1 injection was found to deplete 96.8% ± 1.2% of PMN in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid after intranasal flagellin treatment.

Determination of bacterial loads in lungs and spleens. Lungs and spleens were collected at selected time points after intranasal challenge and were homogenized with an Ultra Turrax homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany).

Viable counts were determined by plating serial dilutions onto blood agar plates.

Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). Lungs were homogenized in Trizol reagent (Invitrogen, CA) with an Ultra Turrax homogenizer and were stored at -80°C. RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. Prior to cDNA synthesis, 1 μg total RNA was treated with DNase I (Invitrogen), and first-strand cDNA synthesis was carried out using random primers (Invitrogen) and Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was performed using a QuantiTect SYBR green PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a Rotor-Gene 6000 real-time rotary analyzer (Corbett, Sydney, Australia) according to the following protocol: 15 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The primers are listed in Table 1 and were used at a final concentration of 0.9 μM. The expression of the gene of interest was normalized by using β-actin as a housekeeping gene. Results are presented as fold increases in mRNA levels over those for the saline-treated group.

Determination of PMN infiltration into the airways and lungs. For BAL sampling, the trachea was cannulated, and 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) plus 1 mM EDTA was instilled six times and recovered by gentle aspiration; this process was repeated twice. Cells were suspended in FACS-EDTA buffer (PBS, 0.1% azide, and 1% bovine serum albumin [Sigma-Aldrich] plus 5 mM EDTA). Lung cells were isolated after collagenase and DNase treatment as previously described (34) and were filtered through a 40-μm-pore-size cell strainer. Immune cells were separated in a two-layer Percoll (Sigma-Aldrich) gradient. Briefly, cells were suspended in 35% isotonic Percoll solution, carefully placed on top of a 70% isotonic Percoll solution, and centrifuged for 30 min at 2,600 × g and room temperature without a brake. The top ring of cells, corresponding mostly to epithelial cells, was discarded, and immune cells were recovered from the ring of cells closest to the 70% Percoll layer. Cells were filtered using a 100-μm-pore-size cell strainer, washed, and stained for fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis. Neutrophils were identified by forward scatter-side scatter (FSC-SSC); by positive staining either for anti-Ly6G (clone 1A8) and anti-Ly6C (clone HK1.4) or for anti Gr-1 (clone R6B8c5), as well as for anti-CD11b (clone M1/70); and by negative staining for anti-CD11c (clone HL3). Antibodies were obtained either from BD Biosciences, from BioLegend (San Diego, CA), or from AbD Serotec (United Kingdom). After fixation with 4% paraformaldehyde (PFA), flow cytometry data were acquired on a FACSCalibur cytometer with CellQuest software (version 3.3; BD Biosciences).

Histological analysis. Lungs were fixed in 4% formalin (Sigma-Aldrich) for 24 h and were then embedded in paraffin. Lung blocks were sectioned at a thickness of 5 μm using a Leica microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and were adhered to silanized slides. Three mice per group were analyzed. Six sections from each mouse were stained with hematoxylin and eosin and were analyzed in a double-blind manner by using a Nikon Eclipse 80i microscope and a Nikon DS-Ri1 digital camera. Images were processed using NIS-Elements BR (version 3.0) software (Laboratory Imaging).

Statistical analysis. A log rank (Mantel-Cox) test was performed for analysis of survival curves. For comparison between two groups, the Mann-Whitney test was performed. *P* values of <0.05 were considered significant in all cases. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

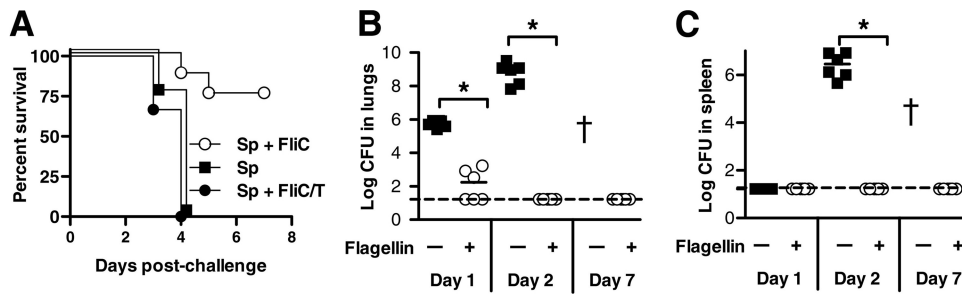


FIG. 1. Flagellin protects BALB/c mice against a lethal respiratory challenge with *S. pneumoniae*. BALB/c mice ($n = 8$) were infected i.n. with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (Sp) serotype 1 in saline alone (filled squares) or in saline supplemented either with $1 \mu\text{g}$ flagellin (FliC) (open circles) or with $1 \mu\text{g}$ trypsin-digested flagellin (FliC/T) (filled circles). (A) The survival of mice was monitored daily. The survival of the FliC-treated group was statistically significantly different from that of the saline group and the FliC/T-treated group. The results are representative of 1 out of 3 experiments. (B and C) CFU counts were determined in the lungs (B) or spleens (C) of mice ($n = 6$) at days 1, 2, and 7 after challenge with *S. pneumoniae* alone (filled squares) or *S. pneumoniae* plus flagellin (open circles). The solid lines represent means, and the dashed lines represent the CFU detection limit. The daggers indicate that all animals in the group were dead by day 7. Significant differences between groups ($P < 0.05$) are indicated by asterisks. Results are representative of 1 out of 2 experiments.

RESULTS

Intranasal delivery of flagellin protects mice against a lethal challenge with *S. pneumoniae*. We first determined the minimal dose of *S. pneumoniae* that causes 100% mortality in BALB/c mice upon intranasal (i.n.) administration. Animals were infected with increasing doses of a clinical isolate of *S. pneumoniae* serotype 1, and survival was assessed daily (data not shown). We defined 4×10^5 CFU as the minimal lethal dose (MLD) that kills all animals within 72 to 120 h.

The capacity of flagellin to control pneumococcal pneumonia was then assessed by comparing the survival of mice challenged intranasally with *S. pneumoniae* to that of mice instilled with flagellin (FliC) and *S. pneumoniae*. As a control, mice were also challenged with *S. pneumoniae* and flagellin that had been hydrolyzed with trypsin previously (FliC/T). As shown in Fig. 1A, FliC-treated mice had a survival rate of 75%, while untreated or FliC/T-treated animals died within 3 to 4 days after challenge. The protection induced by flagellin ranged from 75 to 100% in different independent experiments.

Coadministration of flagellin with *S. pneumoniae* challenge resulted in significant reductions of bacterial counts in the lungs within the first 24 h after challenge compared with those for animals that received *S. pneumoniae* alone. Moreover, bacterial loads in the lungs continued to increase until death in all mice that received no treatment, while in flagellin-treated mice, bacteria were cleared from the lungs by day 2 after infection and could no longer be detected at the local level (Fig. 1B). The capacity of flagellin to protect against systemic infection was also evaluated by assessing bacterial loads in the spleens of treated and untreated mice at different time points after challenge. As shown in Fig. 1C, high numbers of *S. pneumoniae* organisms were detected in the spleens of all untreated animals as early as 48 h after infection. In contrast, bacteria could not be detected in the spleens of flagellin-treated mice at any time point (Fig. 1C).

We also evaluated whether flagellin could exert a protective response against pneumococcal infection when administered before or after the infection. All animals receiving flagellin intranasally 12 to 24 h before pneumococcal challenge survived, while all control mice died by day 4. To assess the

therapeutic value of flagellin administration, BALB/c mice were infected with *S. pneumoniae*, and 24 h later, they either were treated with $1 \mu\text{g}$ of flagellin by the i.n. route or remained untreated. The level of protection among animals receiving flagellin ranged from 60 to 100%, while all untreated mice died of infection. As shown in Fig. 2, therapeutic administration of flagellin induced significant reductions of bacterial loads in the lungs (Fig. 2A) as well as in the spleen (Fig. 2B) as detected 48 h after infection (24 h after flagellin administration). By day 7, *S. pneumoniae* was no longer detectable in the lungs or spleens of surviving animals. Therefore, flagellin shows prophylactic as well as therapeutic effects in pneumococcal pneumonia.

The capacity of flagellin to induce protection was also assessed in C57BL/6 mice and in mice of the outbred strain NMRI. The MLD of *S. pneumoniae* serotype 1 was found to be 2×10^6 CFU for both strains, and flagellin-mediated protection was evaluated with $5 \times$ MLD. Administration of flagellin 12 h before bacterial challenge induced 80% protection in C57BL/6 mice; similarly, 100% protection was achieved in

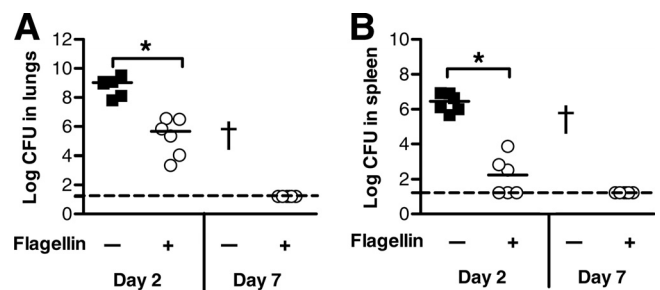


FIG. 2. Therapeutic effect of FliC after *S. pneumoniae* challenge. BALB/c mice were infected intranasally with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (filled squares); 24 h after challenge, $1 \mu\text{g}$ of FliC was administered i.n. to one group of animals (open circles). CFU counts were determined in the lungs (A) or spleens (B) at day 2 and day 7 after challenge with *S. pneumoniae*. Solid and dashed lines represent means and the CFU detection limit, respectively. The dagger indicates that all animals in the group were dead by day 7. Significant differences between groups ($P < 0.05$) are indicated by asterisks. Results are representative of 1 out of 2 experiments.

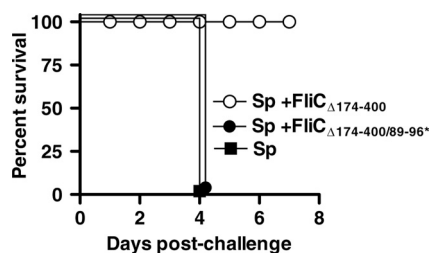


FIG. 3. TLR5 signaling is required for flagellin-mediated protection against *S. pneumoniae* infection. BALB/c mice ($n = 8$) were infected i.n. with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (Sp) serotype 1 in saline either alone (filled square) or supplemented either with $1 \mu\text{g}$ FliC $_{\Delta 174-400}$ (open circles) or with $1 \mu\text{g}$ FliC $_{\Delta 174-400/89-96^*}$, lacking the TLR5-signaling motif (filled circle). Survival of mice was recorded daily. The survival of the FliC $_{\Delta 174-400}$ -treated group was statistically significantly different from that of the untreated and FliC $_{\Delta 174-400/89-96^*}$ -treated groups ($P < 0.05$). Results are representative of 1 out of 2 experiments.

NMRI animals when flagellin was administered 32 h to 6 h before challenge. Flagellin was also protective when coadministered with *S. pneumoniae* to mice of the C57BL/6 and NMRI strains, although to a lower extent (40%). Taken together, these results show that flagellin treatment is protective in different mouse strains.

We next addressed whether TLR5 signaling is necessary for the protection elicited by flagellin treatment. For this purpose, we used the recombinant flagellins FliC $_{\Delta 174-400}$ and FliC $_{\Delta 174-400/89-96^*}$ (27). FliC $_{\Delta 174-400}$ has the same capacity to promote mucosal TLR5 signaling as native flagellin, whereas

FliC $_{\Delta 174-400/89-96^*}$ carries mutations that prevent TLR5 signaling. While all mice that received FliC $_{\Delta 174-400}$ and *S. pneumoniae* survived the challenge, none of those receiving the mutant FliC $_{\Delta 174-400/89-96^*}$ did so (Fig. 3). These results strongly suggest that TLR5 signaling is required for protection.

Flagellin treatment promotes proinflammatory gene expression and exacerbates transient cellular infiltration into the lungs during pneumococcal pneumonia. We then analyzed whether flagellin treatment modifies the lungs' transcriptional response to pneumococcal infection. Mice were challenged with *S. pneumoniae* alone or with *S. pneumoniae* plus flagellin as before. Another group received flagellin alone as a control. Twenty-four hours after treatment and infection, lungs were harvested in order to analyze the expression of selected genes by qRT-PCR. Administration of flagellin alone or in combination with *S. pneumoniae* provoked a dramatic increase in *Cxcl1*, *Cxcl2*, and *Ccl20* mRNA levels over those observed with pneumococcal challenge alone (Fig. 4). Flagellin treatment also increased the expression of *Tnf*, although the difference was consistent, it was not statistically significant. Expression of *Il6* was increased in animals that were challenged and treated with flagellin but not in those that received flagellin or *S. pneumoniae* alone, suggesting a synergistic effect of flagellin and pneumococcal infection on *Il6* expression (Fig. 4). Among all groups, mRNA levels of the *Tgfb1*, *Il17a*, *Il17f*, *Il23*, and *Il4* genes remained unchanged from those for mock-treated animals (data not shown).

To assess if the expression of proinflammatory genes correlated with inflammation and cellular infiltration into the airways, we performed histological analysis of lung tissue ob-

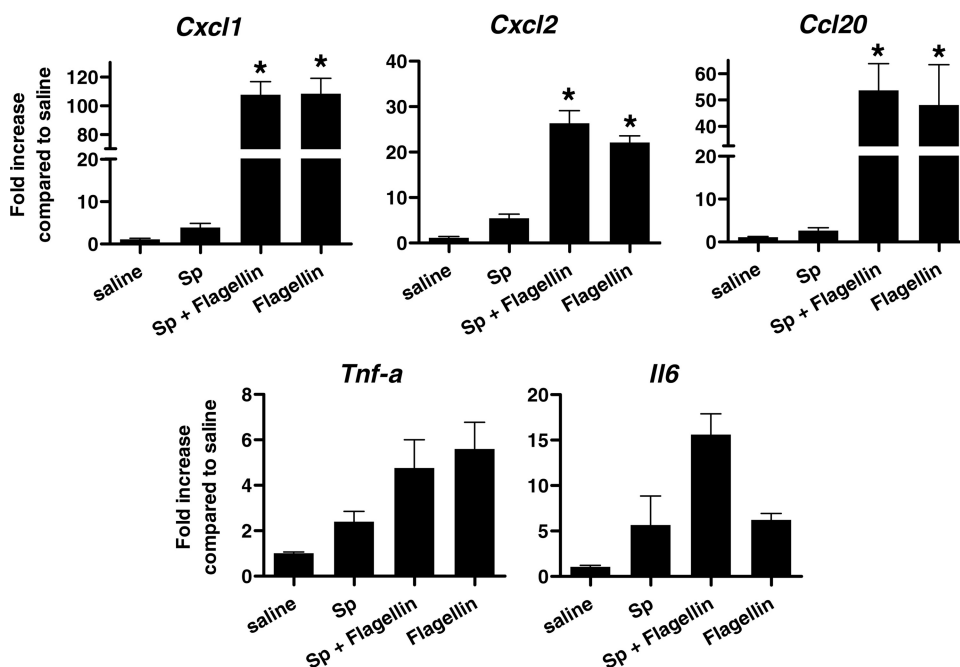


FIG. 4. Flagellin upregulates chemokine and cytokine gene expression in the lungs of infected animals. BALB/c mice ($n = 5$) were instilled i.n. either with saline, with $1 \mu\text{g}$ flagellin (FliC), or with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (Sp) serotype 1 either in saline alone or in saline supplemented with $1 \mu\text{g}$ FliC. Mice were sacrificed 24 h after challenge, and the expression of the *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl20*, *Il6*, and *Tnf* genes was assessed by qRT-PCR on total lung RNA. Values were normalized to that of β -actin mRNA, and the results are expressed relative to mRNA levels in saline-treated mice. Data are means; error bars represent standard errors of the means. Significant differences between groups ($P < 0.05$) are indicated by asterisks. Results are representative of 1 out of 3 experiments.

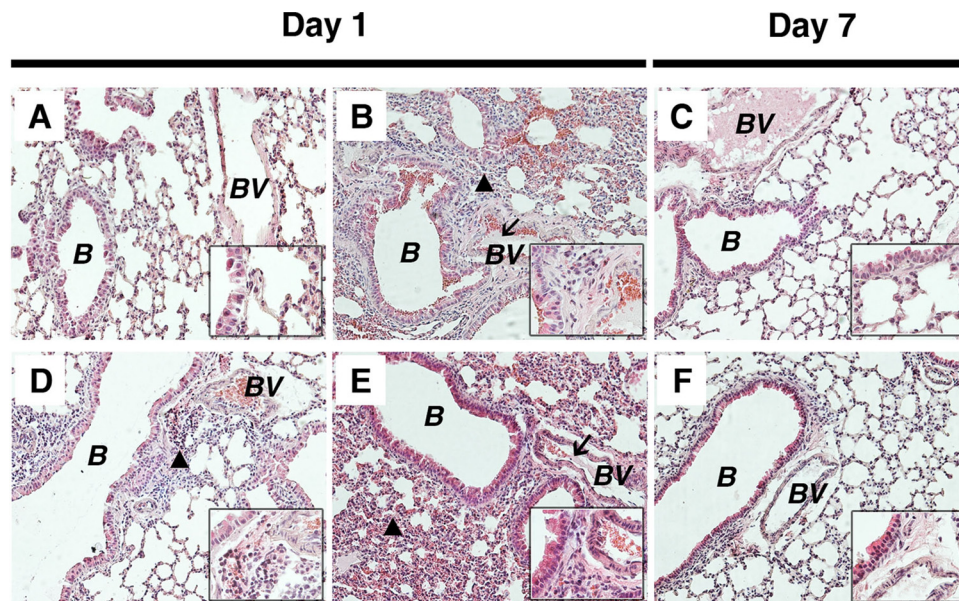


FIG. 5. Flagellin promotes heavy cell infiltration and lung remodeling and induces rapid restoration of tissue architecture. Mouse lungs were obtained at day 1 or day 7 after intranasal instillation of saline (A and F), 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* serotype 1 (D), *S. pneumoniae* plus 1 μ g flagellin (B and C), or flagellin alone (E) and were stained with hematoxylin and eosin. B, bronchiole; BV, blood vessel. Thin arrows indicate edema; arrowheads indicate cellular infiltration. On day 1, edema and recruitment of inflammatory cells were evident in peribronchial and perivascular regions in flagellin-treated animals. Infected but untreated animals showed less inflammatory-cell infiltration and edema at 24 h than flagellin-treated and infected mice. Flagellin-treated animals showed resolution of inflammation by day 7. Total magnification, $\times 200$ for panels and $\times 1,000$ for insets. The images shown are representative of the analysis of 6 sections for each individual and 3 mice per experimental group.

tained 24 h after flagellin treatment and infection. As shown in Fig. 5, *S. pneumoniae* induced moderate cellular infiltration, restricted to certain bronchioles and some perivascular areas close to these bronchioles (Fig. 5D). In contrast, flagellin treatment, alone or together with pneumococci, induced edema, as well as heavy infiltration of cells affecting not only perivascular and peribronchial regions but also some areas of the surrounding lung parenchyma (Fig. 5B and E). Remarkably, at day 7, lungs from mice that had received flagellin and pneumococci showed complete resolution of the inflammation, with no apparent cellular infiltration or edema (Fig. 5C). These results suggest that flagellin induces a strong but transient inflammatory response that promotes the clearance of bacteria without causing any permanent alteration of lung morphology or function.

Flagellin-induced protection requires Gr-1-expressing cells but is independent of B and T lymphocytes. Recruitment of neutrophils into the airways is a hallmark of both pneumococcal infection and nasal flagellin treatment (15, 18), and here we showed that flagellin treatment and infection activated the expression of genes involved in neutrophil recruitment (Fig. 4). Thus, we aimed at comparing the kinetics of neutrophil infiltration in animals challenged with *S. pneumoniae* and either left untreated or treated with flagellin. BAL specimens were collected at different time points after challenge and were stained with anti-Gr-1, anti-CD11b, and anti-CD11c antibodies. As shown in Fig. 6A, pneumococcal challenge induced the recruitment of PMN in all animals. However, mice treated with flagellin at the time of the challenge showed a more rapid and pronounced infiltration of PMN into the airways than mice challenged with *S. pneumoniae* alone. At 24 h, PMN infiltration

peaked in both groups, and the difference between groups was maximal. However, by 48 h, the numbers of PMN were no longer significantly different between groups. Thus, coadministration of flagellin with pneumococci promoted a rapid and transient recruitment of a high number of neutrophils into the airways.

Subsequently, we determined whether neutrophils were critical for flagellin-mediated protection in the coadministration setting of flagellin treatment. For this purpose, animals were injected i.p. with a monoclonal antibody specific for granulocyte receptor-1 (Gr-1, or Ly6G/Ly6C) or an isotype control antibody 24 h before challenge alone or challenge plus treatment. Animals that received the isotype control and were treated with FliC survived the challenge (Fig. 6B). In contrast, anti-Gr-1 treatment depleted $>95\%$ of neutrophils from the airways and abrogated flagellin-mediated protection against *S. pneumoniae*. These results showed that Gr-1-expressing cells, likely PMN, are critical effectors of flagellin-induced protection in pneumococcal infection.

Because the protection induced by coadministration of flagellin relied on a rapid influx of PMN into the lungs, we also analyzed the kinetics of PMN recruitment when flagellin was administered after the establishment of the infection. Animals were infected with *S. pneumoniae* and 24 h later either were treated with flagellin or remained untreated. BAL samples were collected at days 2, 3, and 7 after infection and were used for FACS analysis. Like coadministration of flagellin with the challenge, therapeutic administration of flagellin also induced a peak of PMN infiltration at 24 h after flagellin instillation, which decreased rapidly afterwards. By day 7, no neutrophils were detected in the lungs of animals treated with flagellin

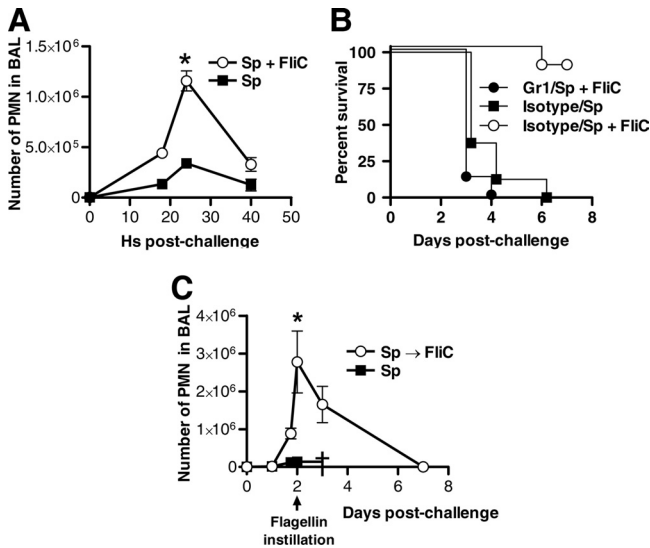


FIG. 6. Flagellin-mediated neutrophil recruitment is required for protection against pneumonia. (A) Kinetics of PMN infiltration. BALB/c mice ($n = 3$) were infected i.n. with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (Sp) serotype 1 in saline alone (filled squares) or in saline supplemented with $1 \mu\text{g}$ flagellin (FliC) (open circles). Animals were sacrificed at the indicated time points after challenge. The total number of cells in bronchoalveolar lavage fluid was determined, and the number of neutrophils (defined as Ly6C⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ cells) was determined by flow cytometry. (B) Depletion of PMN abrogates FliC-mediated protection. BALB/c mice ($n = 6$) were injected with $100 \mu\text{g}$ of an anti-Gr-1 monoclonal antibody or a control antibody. Animals were infected i.n. 24 h later with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* serotype 1 in saline alone (squares) or in saline supplemented with $1 \mu\text{g}$ flagellin (FliC) (circles). Survival was recorded daily. The survival of the nondepleted FliC-treated group was statistically significantly different from that of depleted FliC-treated animals or nondepleted untreated animals ($P < 0.05$). (C) BALB/c mice were infected intranasally with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (filled square); 24 h after challenge, $1 \mu\text{g}$ of FliC was administered i.n. to one group of animals (open circles). At selected time points after infection (days 1, 2, and 7), BAL was carried out for 3 mice per time point in order to perform FACS analysis. The total number of cells in BAL fluid was determined, and the number of neutrophils was determined by flow cytometry. The dagger marks the time point at which all animals in the group were dead. For panels A and C, data are means; error bars represent the standard errors of the means; and significant differences between groups ($P < 0.05$) are indicated by asterisks. The results are representative of 1 out of 2 experiments.

(Fig. 6C). Overall, these results suggest that the mechanism behind flagellin-induced protection in the therapeutic setting is similar to that observed when flagellin was coadministered with the bacterial challenge.

Since B and T lymphocytes are involved in the early phase of pneumococcal infection (12, 17, 18), we evaluated their roles in flagellin-induced protection. SCID mice (deficient in antibodies, B cells, and T cells) as well as immunocompetent BALB/c mice were challenged with 2×10^7 CFU of *S. pneumoniae* either alone or with flagellin. Lungs and spleens were collected 36 h after infection for the determination of bacterial counts. As shown in Fig. 7A, flagellin coadministration promoted the clearance of bacteria in the lungs of SCID mice to an extent similar to that in BALB/c mice. Both SCID and BALB/c mice also showed lower bacterial counts in the spleen upon flagellin treatment (Fig. 7B), demonstrating that they were able to

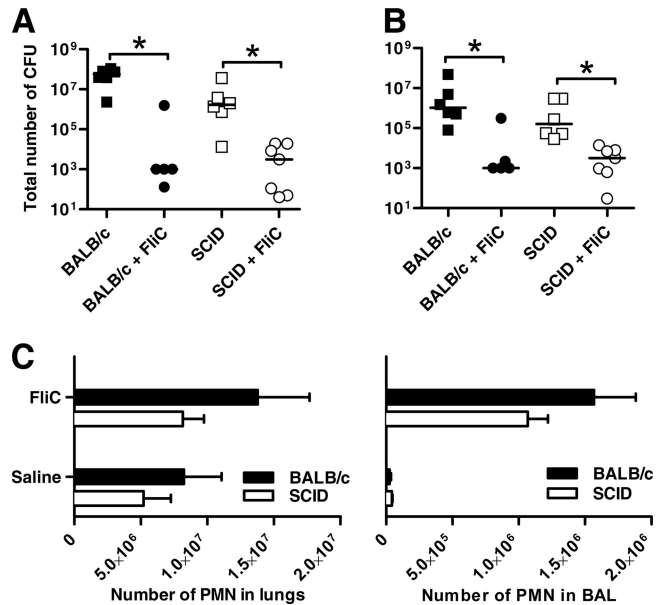


FIG. 7. Flagellin-mediated protection against pneumonia does not depend on B and T lymphocytes. (A and B) BALB/c (solid symbols) or SCID (open symbols) mice ($n = 6$) were infected i.n. with 2×10^7 CFU of *S. pneumoniae* serotype 1 in saline alone (squares) or in saline supplemented with $1 \mu\text{g}$ flagellin (FliC) (circles). Bacterial counts were determined in lung (A) and spleen (B) homogenates 36 h after challenge. Significant differences between groups ($P < 0.05$) are indicated by asterisks. Results are representative of 2 experiments. (C) Recruitment of PMN (defined as Ly6G⁺ Ly6C⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ cells) into BAL fluid and lungs after i.n. instillation of $1 \mu\text{g}$ flagellin for SCID (open bars) or BALB/c (filled bars) mice ($n = 5$). Note that the numbers of PMN recruited in the two strains were not statistically significantly different. The results are presented as medians and standard errors of the means.

control not only local but also systemic infection. SCID mice recruited similar numbers of PMN into the lungs and alveolar spaces as BALB/c mice 16 h after the instillation of flagellin (Fig. 7C). In summary, these results show that Gr-1-expressing cells require neither B cells nor T lymphocytes in order to trigger flagellin-induced protection.

DISCUSSION

Innate immunity is essential for controlling pneumococcal infection, as shown by the requirements for TLR and MyD88 to prevent early colonization of the respiratory tract by *S. pneumoniae* (1, 20). The immune response to pneumococcal airway infection is characterized by a pronounced, brisk recruitment of neutrophils into the lungs (18), and phagocytic killing of pneumococci by PMN is considered a major defense mechanism. Nevertheless, *S. pneumoniae* can evade the host's innate defenses by inhibiting or delaying complement deposition and the respiratory burst of phagocytes (31). Hence, the neutrophil influx is often ineffective at clearing the infection until serotype-specific antibodies are produced and bypass the inhibition of complement deposition, enhancing opsonophagocytosis. In this study we assessed whether exogenous administration of an agonist of a TLR not naturally engaged by *S. pneumoniae*, namely, the TLR5 agonist flagellin, could

strength innate immunity, enabling it to control an acute respiratory pneumococcal infection. We found that local administration of flagellin promoted the survival of mice challenged with a lethal dose of *S. pneumoniae* serotype 1 by enhancing local and systemic bacterial clearance. Flagellin treatment was effective when performed before, during, or after infection establishment in BALB/c, C57BL/6, and NMRI mice.

It has been demonstrated that *in vivo* administration of flagellin upregulates the expression of proinflammatory cytokines (10, 15, 16, 37, 38). Here we show that coadministration of flagellin at the time of *S. pneumoniae* challenge also upregulates the expression of the PMN-specific chemokine/activator genes *Cxcl1* and *Cxcl2*, as well as *Tnf* and *Ccl20*, in the lungs, whereas *S. pneumoniae* alone induces these genes poorly. In agreement with the chemokine and cytokine expression profile, analysis of lung tissue sections showed a heavy infiltration of cells into the peribronchial and perivascular regions that was more pronounced in the lungs of flagellin-treated animals than in those of infected and untreated animals. Of note, despite the pronounced inflammatory response induced by flagellin, lung tissue recovered fully by day 7, while untreated animals died of infection. The analysis of BAL samples suggested that administration of the TLR5 agonist at the time of pneumococcal challenge as well as after the establishment of infection induced accelerated and more-pronounced PMN recruitment. PMN infiltration was transient and peaked at 24 h after flagellin treatment, after which time it started to decrease. Depletion of Gr-1-expressing cells, most likely PMN, abolished the protection, demonstrating that these cells are necessary for controlling pneumococcal lung infections. The self-limiting nature of the flagellin-mediated inflammatory response is a very relevant finding, since exacerbated inflammation could be associated with failure of the lung barrier and function. The molecular mechanisms controlling TLR5 response not only upregulate proinflammatory genes but also trigger response termination. Therefore, mucosal treatment with flagellin could be considered as a therapy against pneumococcal pneumonia, enhancing neutrophil infiltration and concurrently limiting inflammation, that merits further evaluation in clinical trials.

Besides PMN, several studies have also reported that T and B lymphocytes, as well as natural antibodies, may play important roles in the early control of pneumococcal pneumonia. Kadioglu et al. showed that T lymphocytes accumulate in zones of peribronchial inflammation at early stages of the immune response and are involved in the defense against pneumococci, since major histocompatibility complex (MHC) class II-deficient mice lacking CD4⁺ T cells are more susceptible to infection than their wild-type counterparts (17, 18). Haas et al. showed that CD19-deficient mice, which have impaired development of B1a cells and impaired natural antibody production, have increased susceptibility to pneumococcal infection (12). However, as indicated by the results obtained in SCID mice, neither T nor B cells are required for flagellin-induced local and systemic clearance of bacteria. Taken together, our results strongly suggest that changing the PMN dynamic results in effective killing of pneumococci, even in the absence of B and T lymphocytes.

Our results also showed that TLR5 signaling is required for the protection induced by flagellin. In the airways, TLR5 is expressed by alveolar macrophages (30) and epithelial cells

(16, 32, 33), suggesting that these resident cells may be key players in the induction of protective innate defenses against *S. pneumoniae* upon flagellin treatment. In line with this, recent studies have suggested that the airway epithelium is the TLR5-activated tissue involved in chemokine production and PMN recruitment in response to flagellated bacteria (10, 16). On the other hand, murine neutrophils express TLR5 (13, 45); thus, TLR5 signaling may also activate PMN directly and enhance their *S. pneumoniae* killing capacity. Similarly, Lysenko et al. established that heat-killed *Haemophilus influenzae* can specifically increase the capacity of PMN to kill pneumococci in a Nod1-dependent manner (22, 23). Based on this information and our own results, we can postulate that the mechanism behind the early PMN recruitment and protection induced by flagellin most likely depends on soluble mediators produced by nonhematopoietic cells, likely chemokines produced by epithelial cells, and is independent of antibodies as well as of T and B cells.

Besides the TLR5 signaling activity, it has been shown recently that flagellin can also engage the cytoplasmic sensor IPAF/NLRC4 (11, 25, 26). However, since the mutant flagellin used here is unable to signal through TLR5 but still harbors the motif involved in IPAF/NLRC4 signaling (26), we can speculate that this pathway does not make a major contribution to the protective effect induced by flagellin treatment.

Current therapies for the prophylaxis and treatment of *S. pneumoniae* infection have limitations in preventing or curing pneumococcal disease (reviewed in references 4, 19, and 41); thus, new strategies of immune intervention are still required. Several reports (5, 7, 9) have shown that the administration of bacterial lysates and whole heat-killed bacteria stimulates protective responses against infection. However, the undefined nature of these preparations is usually a problem when designing drugs for human use. Our results showed that local stimulation with a single and well-characterized molecule, specifically flagellin, is sufficient for augmenting lung innate immune defenses and controlling pneumococcal pneumonia, highlighting the benefits of using microbe-associated molecular patterns as the basis for developing antimicrobial therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the European Community (STREP grant SavinMucoPath INCO-CT-2006-032296) and ECOS-Sud (U08S02). N. Muñoz and A. Rial were funded by ANII and PEDECIBA, School of Chemistry. L. Van Maele and J. C. Sirard were funded by INSERM, the Institut Pasteur de Lille, and the Région Nord Pas-de-Calais (ARCir Europe and Bourse INSERM-Région).

We thank Teresa Camou for kindly providing the *S. pneumoniae* strain.

REFERENCES

- Albiger, B., A. Sandgren, H. Katsuragi, U. Meyer-Hoffert, K. Beiter, F. Wartha, M. Hornef, S. Normark, and B. H. Normark. 2005. Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. *Cell. Microbiol.* 7:1603–1615.
- Andersen-Nissen, E., T. R. Hawn, K. D. Smith, A. Nachman, A. E. Lampano, S. Uematsu, S. Akira, and A. Aderem. 2007. Tlr5^{-/-} mice are more susceptible to *Escherichia coli* urinary tract infection. *J. Immunol.* 178:4717–4720.
- Balloy, V., A. Verma, S. Kuravi, M. Si-Tahar, M. Chignard, and R. Ramphal. 2007. The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 196:289–296.
- Beall, B. 2007. Vaccination with the pneumococcal 7-valent conjugate: a successful experiment but the species is adapting. *Expert Rev. Vaccines* 6:297–301.

5. Ben-David, I., S. E. Price, D. M. Bortz, C. F. Greineder, S. E. Cohen, A. L. Bauer, T. L. Jackson, and J. G. Younger. 2005. Dynamics of intrapulmonary bacterial growth in a murine model of repeated microaspiration. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **33**:476–482.
6. Brown, K. L., C. Cosseau, J. L. Gardy, and R. E. Hancock. 2007. Complexities of targeting innate immunity to treat infection. *Trends Immunol.* **28**:260–266.
7. Clement, C. G., S. E. Evans, C. M. Evans, D. Hawke, R. Kobayashi, P. R. Reynolds, S. J. Moghaddam, B. L. Scott, E. Melicoff, R. Adachi, B. F. Dickey, and M. J. Tuvim. 2008. Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**:1322–1330.
8. Craig, A., J. Mai, S. Cai, and S. Jayaseelan. 2009. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* **77**:568–575.
9. Empey, K. M., M. Hollifield, and B. A. Garvy. 2007. Exogenous heat-killed *Escherichia coli* improves alveolar macrophage activity and reduces *Pneumocystis carinii* lung burden in infant mice. *Infect. Immun.* **75**:3382–3393.
10. Feuillet, V., S. Medjane, I. Mondor, O. Demaria, P. P. Pagni, J. E. Galán, R. A. Flavell, and L. Alexopoulou. 2006. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:12487–12492.
11. Franchi, L., A. Amer, M. Body-Malapel, T. D. Kanneganti, N. Ozoren, R. Jagirdar, N. Inohara, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, and G. Nunez. 2006. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in salmonella-infected macrophages. *Nat. Immunol.* **7**:576–582.
12. Haas, K. M., J. C. Poe, D. A. Steeber, and T. F. Tedder. 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* **23**:7–18.
13. Hayashi, F., T. K. Means, and A. D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**:2660–2669.
14. Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**:1099–1103.
15. Honko, A. N., and S. B. Mizel. 2004. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect. Immun.* **72**:6676–6679.
16. Janot, L., J. C. Sirard, T. Secher, N. Noulain, L. Fick, S. Akira, S. Uematsu, A. Didierlaurent, T. Hussell, B. Ryffel, and F. Erard. 2009. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur. J. Immunol.* **39**:1587–1596.
17. Kadioglu, A., W. Coward, M. J. Colston, C. R. Hewitt, and P. W. Andrew. 2004. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect. Immun.* **72**:2689–2697.
18. Kadioglu, A., N. A. Gingles, K. Grattan, A. Kerr, T. J. Mitchell, and P. W. Andrew. 2000. Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect. Immun.* **68**:492–501.
19. Käyhty, H., K. Auranen, H. Nohynek, R. Dagan, and H. Makela. 2006. Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. *Expert Rev. Vaccines* **5**:651–667.
20. Khan, A. Q., Q. Chen, Z.-Q. Wu, J. C. Paton, and C. M. Snapper. 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. *Infect. Immun.* **73**:298–307.
21. Lembo, A., M. Pelletier, R. Iyer, M. Timko, J. C. Dudda, T. E. West, C. B. Wilson, A. M. Hajjar, and S. J. Skerrett. 2008. Administration of a synthetic TLR4 agonist protects mice from pneumonic tularemia. *J. Immunol.* **180**:7574–7581.
22. Lysenko, E. S., T. B. Clarke, M. Shchepetov, A. J. Ratner, D. I. Roper, C. G. Dowson, and J. N. Weiser. 2007. Nod1 signaling overcomes resistance of *S. pneumoniae* to opsonophagocytic killing. *PLoS Pathog.* **3**:e118.
23. Lysenko, E. S., A. J. Ratner, A. L. Nelson, and J. N. Weiser. 2005. The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces. *PLoS Pathog.* **1**:e1.
24. Marks, M., T. Burns, M. Abadi, B. Seyoum, J. Thornton, E. Tuomanen, and L.-A. Pirofski. 2007. Influence of neutropenia on the course of serotype 8 pneumococcal pneumonia in mice. *Infect. Immun.* **75**:1586–1597.
25. Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A. E. Clark, M. W. Bader, S. I. Miller, and A. Aderem. 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat. Immunol.* **7**:569–575.
26. Miao, E. A., D. P. Mao, N. Yudkovsky, R. Bonneau, C. G. Lorang, S. E. Warren, I. A. Leaf, and A. Aderem. 2010. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:3076–3080.
27. Nempont, C., D. Cayet, M. Rumbo, C. Bompard, V. Villeret, and J. C. Sirard. 2008. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J. Immunol.* **181**:2036–2043.
28. Normark, B. H., and S. Normark. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* **252**:91–106.
29. Opitz, B., A. Puschel, B. Schmeck, A. C. Hocke, S. Rosseau, S. Hamerschmidt, R. R. Schumann, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. 2004. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **279**:36426–36432.
30. Oshikawa, K., and Y. Sugiyama. 2003. Gene expression of Toll-like receptors and associated molecules induced by inflammatory stimuli in the primary alveolar macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**:649–655.
31. Perry, F. E., C. J. Elson, T. J. Mitchell, P. W. Andrew, and J. R. Catterall. 1994. Characterisation of an oxidative response inhibitor produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* **49**:676–683.
32. Prince, A. 2006. Flagellar activation of epithelial signaling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**:548–551.
33. Ramos, H. C., M. Rumbo, and J. C. Sirard. 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* **12**:509–517.
34. Rial, A., D. Lens, L. Betancor, H. Benkiel, J. S. Silva, and J. A. Chabalgoity. 2004. Intranasal immunization with a colloid-formulated bacterial extract induces an acute inflammatory response in the lungs and elicits specific immune responses. *Infect. Immun.* **72**:2679–2688.
35. Romagne, F. 2007. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov. Today* **12**:80–87.
36. Salyers, A. A., and D. D. Whitt. 2002. Bacterial pathogenesis: a molecular approach, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
37. Sha, Q., A. Q. Truong-Tran, J. R. Plitt, L. A. Beck, and R. P. Schleimer. 2004. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**:358–364.
38. Sierro, F., B. Dubois, A. Coste, D. Kaiserlian, J. P. Kraehenbuhl, and J. C. Sirard. 2001. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:13722–13727.
39. Tomasz, A., A. Corso, E. P. Severina, G. Echániz-Aviles, M. C. Brandileone, T. Camou, E. Castaneda, O. Figueroa, A. Rossi, and J. L. Di Fabio. 1998. Molecular epidemiologic characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive pediatric isolates recovered in six Latin-American countries: an overview. PAHO/Rockefeller University Workshop. Pan American Health Organization. *Microb. Drug Resist.* **4**:195–207.
40. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases. May 2007. The Jordan report: accelerated development of vaccines 2007. NIH publication 06-6057. <http://www.niaid.nih.gov/about/organization/dmid/Documents/jordan2007.pdf>.
41. Van Bambeke, F., R. R. Reinert, P. C. Appelbaum, P. M. Tulkens, and W. E. Peetermans. 2007. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections: current and future therapeutic options. *Drugs* **67**:2355–2382.
42. van der Poll, T., and S. M. Opal. 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**:1543–1556.
43. von Bernuth, H., C. Picard, Z. Jin, R. Pankla, H. Xiao, C. L. Ku, M. Chrabieh, I. B. Mustapha, P. Ghandil, Y. Camcioglu, J. Vasconcelos, N. Sirvent, M. Guedes, A. B. Vitor, M. J. Herrero-Mata, J. I. Arostegui, C. Rodrigo, L. Alsina, E. Ruiz-Ortiz, M. Juan, C. Fortuny, J. Yague, J. Anton, M. Pascal, H. H. Chang, L. Janniere, Y. Rose, B. Z. Garty, H. Chapel, A. Issekutz, L. Marodi, C. Rodriguez-Gallego, J. Banchereau, L. Abel, X. Li, D. Chaussabel, A. Puel, and J. L. Casanova. 2008. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* **321**:691–696.
44. WHO. 2007. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization—WHO position paper. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **82**:93–104.
45. Zhang, X., L. Majlessi, E. Deriaud, C. Leclerc, and R. Lo-Man. 2009. Co-activation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* **31**:761–771.



Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN- γ -mediated immunity

Juan M. Marqués^{a,1}, Analía Rial^{a,1}, Natalia Muñoz^a, Francois-Xavier Pellay^b, Laurye Van Maele^{c,d,e}, Hélène L  ger^b, Teresa Camou^f, Jean-Claude Sirard^{c,d,e}, Arndt Benecke^b, José A. Chabalgoity^{a,*}

^a Laboratory for Vaccine Research, Departamento de Desarrollo Biotecnol  gico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina – UdelaR. Avda. A. Navarro 3051, CP 11600, Montevideo-Uruguay

^b Institut des Hautes   tudes Scientifiques, Bures-sur-Yvette, France

^c Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, Lille, France

^d Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8204, Lille, France

^e Univ Lille Nord de France, Lille, France

^f Departamento de Laboratorios del Ministerio de Salud P  blica, Montevideo-Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2011

Received in revised form 18 October 2011

Accepted 21 October 2011

Keywords:

IL-17A

IFN- γ

Pneumonia

Protective immunity

Streptococcus pneumoniae

Th17

Transcriptome

ABSTRACT

Acute pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* is a major cause of child mortality. Antibodies are considered the main effectors of protection in this clinical presentation of pneumococcal invasive disease. To get new insights into the mechanisms involved in the protective immunity, we established a murine experimental model of protection against acute pneumococcal pneumonia and then evaluated the transcriptional, humoral and cellular responses in protected and non-protected animals. We found that intranasal inoculation of a sublethal dose of *S. pneumoniae* serotype 1 conferred complete protection against a subsequent challenge with a lethal dose of the same strain. Sublethal infection elicited a strong IgM and IgG antibody response against the capsular polysaccharide, as assessed one week later, and an exacerbated influx of neutrophils into the lungs immediately after the lethal challenge. Genome-wide microarray-based transcriptional analysis of whole lungs showed 149 differentially expressed genes among which we found upregulation of *Il17a*, *Ifng* and several IL-17A- and IFN- γ -related genes in protected versus non-protected mice. Kinetics analysis showed higher expression levels of *Il17a* in protected animals at all time points whereas *Ifng* was upregulated early in the protected mice and later in the non-protected animals. Intracellular cytokine staining demonstrated that CD4⁺ T cells account for a great proportion of the IL-17A produced in the lungs of protected animals. Overall, these results showed that an upregulation of IL-17A- and a timely regulation of IFN- γ -related gene expression, together with development of a Th17 response, are relevant characteristics of the protective immunity against *S. pneumoniae* acute pneumonia.

   2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Streptococcus pneumoniae (pneumococcus) is the main etiological agent of human pneumonia and meningitis, otitis media and sinusitis; per year, about 1–2 millions of fatal pneumococcal diseases occur worldwide (van der Poll and Opal 2009). Pneumococcus colonizes asymptotically the human nasopharynx and in some cases colonization may progress to pneumonia and invasive disease (Kayhty et al. 2006; Salyers 2002). Based on differences in the capsular polysaccharide composition 91 pneumococcus serotypes

have been described (van der Poll and Opal 2009). Some serotypes like serotype 1 are rarely associated with carriage and most frequently cause invasive infections (Hortal et al. 2008; Normark and Normark 2002).

Innate immunity plays a critical role in the resistance to *S. pneumoniae* respiratory infection, both in human and mouse (Paterson and Mitchell 2006). Innate protection is characterized by an early influx of inflammatory cells, predominantly neutrophils (Kadioglu et al. 2000; Munoz et al. 2010; Rosseau et al. 2007), although lungs' infiltrating CD4⁺ T cells are also involved in the early resistance to pneumococcal infection (Kadioglu et al. 2000, 2004). Another key component of innate immunity is the deposition and activation of complement C3 component on the surface of pneumococcus and it has been shown to be impaired by capsular polysaccharides (Abeyta et al. 2003). Otherwise, activation of the classical

* Corresponding author. Tel.: +598 2 487 12 88x1120; fax: +598 2 487 30 73.

E-mail address: jachabal@higiene.edu.uy (J.A. Chabalgoity).

¹ These authors contributed equally to this work.

complement pathway by natural IgM antibodies has been demonstrated to be important in preventing a rapid bacteremia during the infection with pneumococcus (Brown et al. 2002).

Activation of innate immunity is not only critical as the first line of defense against pneumococcus but also for the generation of appropriate adaptive immunity (Paterson and Mitchell 2006). It has been proposed that acquired immunity against pneumococcal nasopharyngeal colonization is mediated by CD4⁺ T-cells and independent of antibodies (Basset et al. 2007; Malley et al. 2005; Trzcinski et al. 2005, 2008). Recently, it has been also demonstrated that IL-17A, produced by Th17 cells, is a key factor in protective immunity against pneumococcal colonization (Lu et al. 2008), being essential for the recruitment of macrophages and neutrophils to the nasopharynx (Zhang et al. 2009). However, other groups have shown evidences that antibodies and particularly IgA are necessary in protection against pneumococcal colonization (Fukuyama et al. 2010; Richards et al. 2010; Roche et al. 2007; Roche and Weiser 2010). Overall, these data suggest that both antibodies and cellular responses may have an important role in protection against pneumococcal nasopharyngeal colonization (Richards et al. 2010).

Regarding pneumonia and invasive pneumococcal disease there is a consensus that anti-capsular antibodies play an essential role in protection (AlonsoDeVelasco et al. 1995; Lynch and Zhanel 2009; Malley 2010; WHO 2008). In this sense, available pneumococcal vaccines are designed to elicit protective anti-capsular polysaccharide antibodies (Poolman 2004). The binding of specific antibodies to the bacterial surface facilitates its Fc- and complement-mediated opsonophagocytosis by neutrophils and macrophages (AlonsoDeVelasco et al. 1995).

To gain further insights into the mechanisms involved in protection against invasive pneumococcal disease, we established a murine experimental model of protection against acute pneumococcal pneumonia and then evaluated the transcriptional, humoral and cellular responses in protected and non-protected animals. We confirmed the elicitation of a specific humoral response together with an important influx of neutrophils into the lungs of protected mice. We also found upregulation of IL-17A- and IFN- γ -related genes and we confirmed the presence of Th17 cells in protected animals suggesting that these cells and IFN- γ mediated immunity are related to protection against acute pneumonia.

Materials and methods

Ethics statement

All experiments involving animals complied with current national and institutional regulations and ethical guidelines from "Comisión Honoraria de Experimentación Animal" (CHEA) – Universidad de la República, Uruguay (approval ID: 08-05-10).

Animal studies

Female C57BL/6J mice, 6–8 weeks old, were obtained from the National Division of Veterinary Laboratories. Animals were maintained in individually ventilated cages and handled in a vertical laminar flow cabinet (ESCO, class II A2). Mice were anaesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of 2.2 mg Ketamine plus 0.11 mg Xylazine. Bacteria were administrated onto mice's nostrils in 50 μ l of physiological saline. Mice survival was recorded daily. For lung sampling, mice were sacrificed by cervical dislocation at different times post-infection. Lungs were collected, homogenized in cell dissociation sieve-tissue grinder kit (Sigma–Aldrich), and serial dilutions were plated onto blood-agar plates to determine the degree of bacterial infection. *S. pneumoniae* colonies were detected by the characteristic green halo caused by its α -hemolytic activity.

Lungs for transcriptional studies were stored in RNAlater[®] (Qiagen).

Bacterial cultures

S. pneumoniae serotype 1, clinical isolate E1586 sequence type ST304 (Zemlickova et al. 2005), was provided by the National Reference Laboratory (Ministry of Health, Uruguay). Working stocks were prepared as previously described (Munoz et al. 2010). Briefly, Todd Hewitt Yeast Broth (THYB) was inoculated with fresh colonies of *S. pneumoniae* grown in blood-agar plates and incubated at 37 °C to reach OD_{600nm} 0.7–0.9. Cultures were stored at –80 °C in THYB + glycerol 12% (v/v) up to 3 months. For infections, frozen stocks were thawed, centrifuged 5 min at 2500 \times g, washed and diluted to the appropriate concentration with sterile physiological saline solution. Sublethal and lethal doses were defined as 4 \times 10⁴ CFU and 2 \times 10⁷ CFU per mouse, respectively. Number of bacteria in stocks and inoculums was determined by plating serial dilutions onto blood agar plates.

Detection of IgG and IgM antibodies by ELISA

For detection of IgG, IgM and IgA specific for a whole cell pneumococcal type 1 antigen (WCPn1Ag) 96-well microtiter plates (Maxisorp, Nunc) were coated with 1 μ g/well of WCPn1Ag and incubated overnight (o/n) at 4 °C. WCPn1Ag was prepared by sonication of a bacterial culture of *S. pneumoniae* serotype 1 growth to mid-log phase. Briefly, bacteria were grown to an OD_{630nm} of 0.8–1.0 and then harvested by centrifugation, resuspended in saline and frozen before sonication. After sonication, it was verified by CFU counting that there were not viable bacteria left. The sonicate was then centrifuged, and total protein content was quantified in the supernatant by the method of Pierce. After washing the plates with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T), they were blocked with 200 μ l/well of 1% bovine seroalbumin in PBS-T (PBS-T-BSA) for 1 h at 37 °C. After washing, 100 μ l/well of an appropriate dilution of each serum sample (in PBS-T –0.1%BSA) were added and incubated for 2 h at 37 °C. Plates were washed and 100 μ l of diluted peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG or IgA (Southern Biotech, Birmingham, AL) or IgM (SIGMA) were added and plates were incubated o/n at 4 °C. Finally the ELISA was developed by adding 100 μ l/well of OPD-H₂O₂ (o-phenylenediamine, SIGMA) and readings were taken at 490 using a microplate reader (MRX II, Dynex Technologies). A standard curve prepared with a positive reference sample (arbitrarily assigned with a value of 1000 Arbitrary Units (AU)/ml) was run in each plate and test samples were interpolated.

For the detection of specific IgG, IgM and IgA antibodies against polysaccharide type 1 (PnPS1) we used a modification of the WHO 3rd generation ELISA used for quantification of anti-polysaccharide IgG antibodies in human serum, using both C-polysaccharide (C-PS) and 22F polysaccharide absorption (Wernette et al. 2003). Briefly, 96-well medium binding microtiter plates (Greiner) were coated with 0.2 μ g/well of type 1 specific pneumococcal polysaccharide (American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, Va.) for 5 h at 37 °C, in a humidified chamber. Plates were washed with Tris-buffered saline with 0.01% Brij-35 solution (Wash buffer). Test sera were pre-absorbed with 5 μ g/ml cell wall polysaccharide (C-PS, Staten Serum Institute, Copenhagen, Denmark) and 5 μ g/ml 22F capsular polysaccharide (ATCC), and incubated for 30 min at room temperature (RT). Then, 50 μ l of each sample were transferred to the coated microtiter plate, and incubated o/n at RT. After washing, 100 μ l of diluted peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG or IgA (Southern Biotech, Birmingham, AL) or IgM (SIGMA) were added and plates were incubated o/n at 4 °C. Finally the ELISA was

developed by adding 100 μ l/well of TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, SIGMA) and absorbances at 450 (with reference at 630 nm) were read using a microplate reader (MRX II, Dynex Technologies). A standard curve prepared with a positive reference sample (arbitrarily assigned with a value of 1000 AU/ml) was run in each plate where test samples were interpolated.

Quantitative RT-PCR

RNA later solution was removed, and lungs were homogenized with an Ultra-Turrax in lysis buffer to then extract total RNA using RNeasy Mini Kit (Qiagen). RNA quality and quantity was assessed by spectrophotometric measurements at 260/280 nm. Prior to cDNA synthesis, 1 μ g of total RNA was treated with DNase-I (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Retrotranscription was done in a final volume of 20 μ l in the presence of Random primers (200 ng), dNTPs (0.5 mM), DTT (0.01 M), RNaseOUT (40 U) and SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U), Invitrogen. Real time RT-qPCR was conducted by high throughput methods using TaqMan Low Density Array (TLDA) cards (Applied Biosystems) and the 7900HT System (Applied Biosystems). Real-time PCRs for *Il17a*, *Il17f*, *Il22*, *Ifng* and *Cxcl11* mRNA levels, were also performed using QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen) in a Rotor-Gene 6000 (Corbett) or 7900HT System (Applied Biosystems) (primer sequences are available under request). Beta-Actin encoding gene *Actb* was utilized as house-keeping gene. The relative mRNA amount in each sample was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen 2001) were $\Delta Ct = Ct_{gene\ of\ interest} - Ct_{Actb}$, and expressed as relative mRNA levels in the test group compared to the control group.

Microarrays assays

Total RNA was extracted using NucleoSpin[®] RNA L (Macherey-Nagel) and was concentrated in YM30 Microcon centrifugal filter device (Millipore) by centrifugation at 14,000 \times g during 60 min at 4 °C. RNA quality was evaluated with an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). Poly(A) mRNA from 20 μ g of total RNA was converted into digoxigenin labeled cDNA for hybridization to Mouse Genome Survey Microarrays (Applied Biosystems), using Chemiluminescent RT Labeling Kit for detection in an Applied Biosystems ABI1700 system. The microarray data described in this study is MIAME compliant and they have been deposited in the publicly available database MACE (<http://mace.ihes.fr>) under accession number: 3034545238.

Data analysis

Microarray data were quality-controlled (Brybaert et al. 2010). Statistical analysis of the microarray data was carried out as described previously (Noth and Benecke 2005; Noth et al. 2006; Van Maele et al. 2010).

Ontology enrichment analysis

Combining GO, Kegg and PANTHER annotations, we assigned all probes present on the MGS Version 2.0 array to the PANTHER biological processes. We then calculated the relative representation of those probes detected as significantly regulated. *p*-Values for over- and under-representation of biological processes were calculated using a binominal distribution.

Quantification of IL-17A and IFN- γ by ELISA

γ -interferon (IFN- γ) cytokine concentrations in lung homogenates was assayed by enzyme-linked immunoabsorbent

assay (ELISA) using a pair of specific monoclonal antibodies (capture and detection) against each cytokine and dilutions of the recombinant cytokine for the construction of a standard curve (all reagents were supplied by BD Pharmingen) as previously described (Rial et al. 2004). IL-17A concentration in lung homogenates was quantified using the Ready-Set-Go Mouse IL-17A ELISA Reagent Set from eBioscience (San Diego, CA, USA), according to manufacturer's instructions.

Flow cytometry analysis of lungs cell suspensions

At specified time points after challenge mice were sacrificed by cervical dislocation and the pulmonary and systemic circulation was perfused with saline + 1 mM EDTA to remove the intravascular pool of cells. Lung cells were isolated after collagenase/DNase treatment as previously described (Rial et al. 2004), filtered through a 40 μ m cell strainer (BD) and washed and stained for FACS analysis. Cells were resuspended in FACS EDTA buffer (PBS, 0.1% azide, 1% bovine serum albumin, 5 mM EDTA) and enumerated using a Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, USA) previous to the immunophenotypic analysis by flow cytometry. For neutrophils analysis cells were labeled with Ly6G-PE, CD11b-APC (BD Pharmingen, USA) for 30 min on ice, washed, fixed with PFA 4%, and finally resuspended in FACS EDTA. For intracellular cytokine staining, lung cells were stimulated with 50 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA, SIGMA) and 500 ng/ml ionomycin (SIGMA) in the presence of 10 μ g/ml Brefeldin A (SIGMA), for 5 h at 37 °C, 5% CO₂. Cells were surface stained, for 30 min on ice, with specific antibodies against CD45, CD3 and CD4 (BD), washed with FACS EDTA and then with PBS. After fixing with PFA 4%, cells were permeabilized with 0.5% saponin (SIGMA) in PBS-0.1% BSA and intracellularly stained with antibodies against specific cytokines (PE- IL-17A and Alexa488- or PE- IFN- γ , all from BD) for 30 min, at RT, and then washed. Cells prepared for flow cytometry were analyzed after gating for CD45⁺ viable cells using a FACSCalibur (BD, San Jose, CA) equipped with argon and red diode lasers used for excitation at 488 and 635 nm. For data acquisition and analysis CellQuest 3.3 software package (BD) was used. Experiments were performed a minimum of three times in an independent manner.

Statistics

Statistical analyses were assessed by non-parametric Mann-Whitney *U* test or Student *T* test and differences were regarded as significant with *p* < 0.05 (*) and very significant with *p* < 0.01 (**).

Results

A sublethal infection protects against acute S. pneumoniae serotype 1 pneumonia

We first set up an experimental model of acute pneumonia with a clinical isolate of *S. pneumoniae* serotype 1 (Pn1) based on intranasal (i.n.) administration of 2×10^7 CFU of Pn1 to C57BL/6J mice. The infection was lethal for animals within 4 days and was invasive since bacteria were found at 24 h in the blood. We then established a model of protection against the lethal challenge by prior intranasal administration of a sublethal dose of the same pneumococcus strain. Mice treated with 4×10^4 CFU of Pn1 cleared the infection from the lungs by 24 h and all survived a subsequent lethal challenge with 2×10^7 CFU of Pn1 administered either one week (Fig. 1A) or 2 months (results not shown) after treatment, while all saline-treated mice died after the lethal challenge. Both protected and non-protected animals showed similar bacterial loads in the lungs at 4 h and 24 h post-challenge (Fig. 1B).

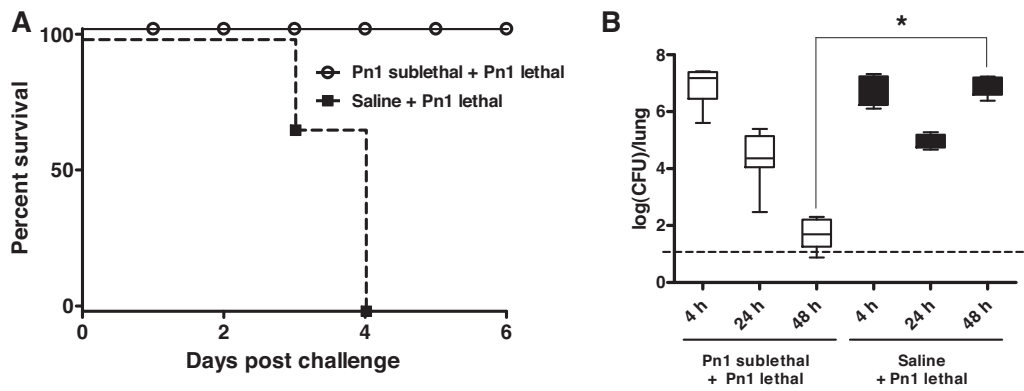


Fig. 1. A sublethal dose of *S. pneumoniae* protects against a subsequent challenge with a lethal dose. On day 0, C57BL/6 mice were treated i.n. with a sublethal dose of *S. pneumoniae* serotype 1 (Pn1, 4×10^4 CFU) or saline. On day 7, mice were challenged i.n. with a Pn1 lethal dose (2×10^7 CFU). (A) Survival rate of animals ($n = 6$ per group). (B) Box-Whiskers plot of lung bacterial load 4, 24 and 48 h after the challenge of protected and saline-treated control mice. Lungs were harvested at the indicated time point and homogenized to count bacteria in blood agar plate ($n = 4$ per group at different time point). Results are representative of more than 3 independent experiments.

However, by 48 h protected animals have almost cleared the infection from the lungs while bacterial load was significantly increased in the non-protected group (Fig. 1B). Bacteria were found in the blood of all saline-treated animals 24 h after lethal infection while blood cultures were negative for all protected animals (data not shown). In conclusion, our data showed that pre-treatment with a sublethal dose of Pn1 confers solid and long-lasting protection to invasive pneumococcal infection with the same strain.

Sublethal Pn1 infection elicited early IgM and IgG specific antibodies

Antibodies have been long recognized as the main effectors of protection against pneumococcal invasive diseases. Therefore, we evaluated the humoral response in our model of protection. We analyzed IgG and IgM antibodies specific for whole cell pneumococcal serotype 1 antigen (WcPn1Ag) and capsular pneumococcal

polysaccharide type 1 (PnPS1) in serum obtained 7 days after treatments, just before challenge. Mice that received a sublethal dose of Pn1 showed increased levels of specific anti-WcPn1Ag IgM antibodies, while no significant levels of specific IgG (Fig. 2A) nor IgA (data not shown) antibodies were detected. Interestingly, these animals developed significant levels of both IgM and IgG antibodies specific to type 1 capsular polysaccharide (Fig. 2B). Thus, a sublethal i.n. Pn1 infection induced significant IgM and IgG anti-capsular antibodies as early as one week after administration that could be associated with protection against pneumonia.

Transcriptional analysis showed upregulation of Il17a and Ifng in protected mice

To further investigate the immune mechanisms involved in protection, we evaluated whether protection correlated to a specific transcriptional signature in the lungs. For this, we conducted

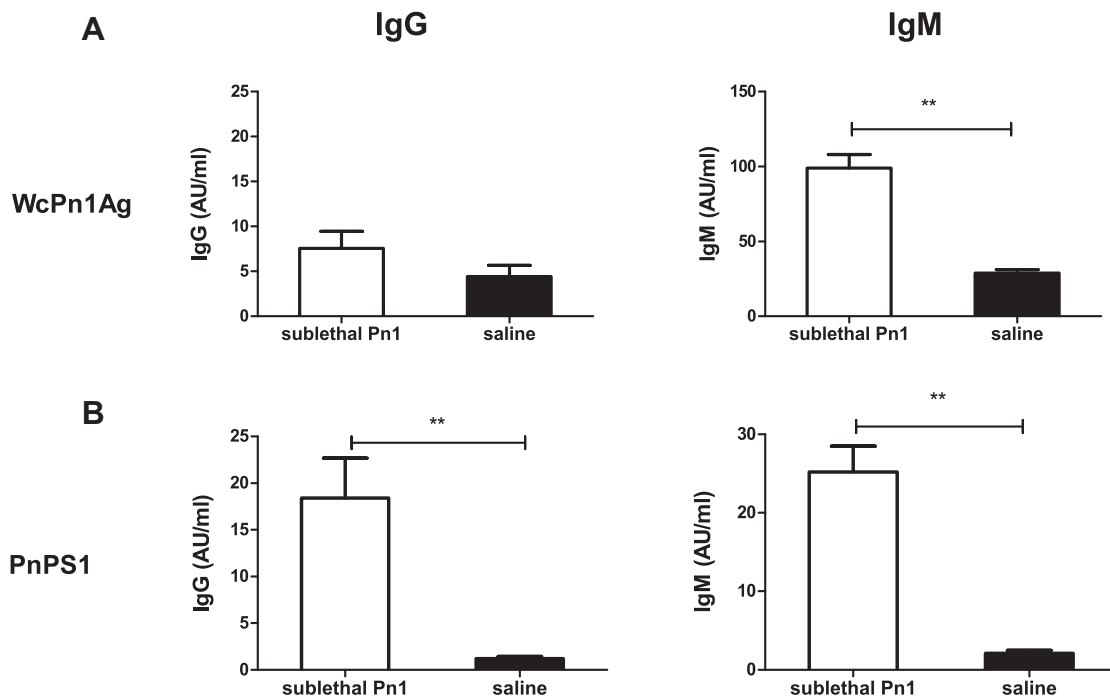


Fig. 2. Treatment with a sublethal intranasal dose of *S. pneumoniae* induces the production of serum specific antibodies. Mice receiving 4×10^4 CFU were bled 7 days later and specific IgG and IgM antibodies against whole cell pneumococcal type 1 antigen (WcPn1Ag) (A) or purified pneumococcal polysaccharide type 1 (PnPS1) (B) were detected by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM of 8 mice/group. For statistical analysis Mann-Whitney Test was used.

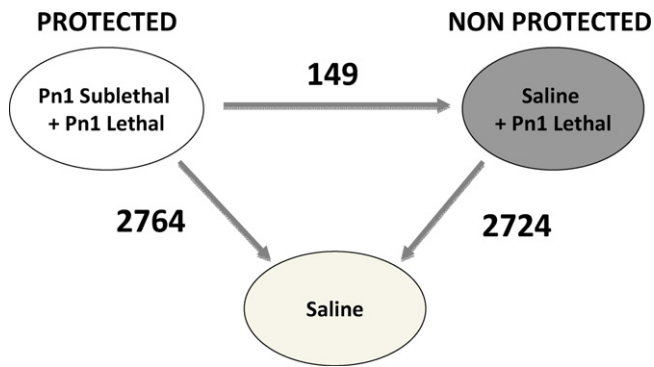


Fig. 3. Protected and non-protected mice show similar lung transcriptional profile. Diagram showing microarrays analysis and the number of statistically significant ($p < 0.01$) differentially expressed genes in the comparison between 2 groups ($n = 3$ per group).

microarray-based genome-wide expression analysis. First, we evaluated the global lung transcriptional response associated with acute pneumonia at 24 h. We found that infected mice presented 2724 differentially expressed genes as compared with saline-treated animals: 1174 transcripts were downregulated and 1550 were upregulated (Fig. 3 and Supplementary Table 1). Most altered biological processes were those related to immunity and defense, like interferon-mediated immunity and B-cell and antibody-mediated immunity, as well as those related to signal transduction, cell adhesion, cell communication and cell proliferation (Supplementary Table 2). Our results closely correlated with previously reported observations (Supplementary Fig. 1) (Rosseau et al. 2007). In conclusion, we observed that acute pneumonia induces transcriptional alterations in the lungs that correlate in part with the induction of a strong immune response that is unable to control the infection.

We next compared the lung transcriptional profile of protected and non-protected mice sacrificed 24 h after the lethal challenge. Both protected and non-protected groups presented similar pattern and number of statistically altered genes when compared to saline-treated animals (2764 and 2724 respectively, Fig. 3). Of note, comparison between protected versus non-protected mice showed only 149 genes that were statistically significant ($p < 0.01$) differentially expressed: 133 genes were up-regulated while only 16 were down-regulated (Fig. 3 and Supplementary Table 3). Within differentially expressed genes there was a clear dominance of those related to immunity (Table 1) and the principal altered biological processes were all related to immunity such as macrophage-, interferon-, B cell- and antibody-, T cell-, cytokine- and chemokine-, granulocyte-mediated immunity processes (Table 2). These data were validated by real time RT-qPCR for a set of relevant genes related to immunity (Supplementary Fig. 2).

Among differentially expressed genes related to immunity, we identified *Ifng* and *Il17a* as relevant genes associated to protection against pneumococcal infection (Table 1). Additionally to *Ifng* there were other altered genes related to IFN- γ -like *Cxcl9*, *Cxcl11*, *Tap1*, *Gbp2*, *Irf1*, *Irf8* and *Socs1*, reinforcing the relevance of IFN- γ -mediated immunity. Similarly, upregulation of genes associated with T-cell mediated immunity like *C2ta* (class II transactivator), *Gzma* (granzyme A), *Ctla4* (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein), *Icos* (inducible T-cell co-stimulator) were also a hallmark of protection (Table 1). We found upregulation of several genes related to B-cell- and antibody-mediated immunity like *Igj* (immunoglobulin joining chain), *Igk* (immunoglobulin kappa chain) and *Cd40* (CD40 antigen) that could be associated with the induced humoral response against pneumococcus. Other

upregulated genes included *Gzmb*, a gene related to granulocyte mediated immunity, and the chemokine ligand 1 *Xcl1* related to chemokine mediated immunity (Table 1). Overall the pattern of altered genes and altered biological processes suggested an important role of immune response involving granulocytes, B- and T-cells in protection.

IL-17 and IFN- γ responses are accelerated and strengthened in protected animals

We then decided to focus our study on genes related to IL-17A and IFN- γ and we evaluated their kinetic of expression by RT-qPCR in protected and non-protected mice. For IL-17A related genes we extended the analysis to genes like *Il17f* and *Il22* that only emerged as differentially expressed genes in the microarray analysis when considering $p < 0.05$ instead of $p < 0.01$. For IFN- γ -related genes we analyzed *Ifng* and *Cxcl11*, and also *Socs1* which is involved in the negative control of IFN- γ signaling pathway.

Early as 8 h after challenge mRNA levels of *Il17a* and *Il17f* were already significantly higher in protected animals (Fig. 4A). The difference between groups peaked by 24 h and was maintained at all time points. By 24 h we found a 7–8 fold increase in *Il17a* mRNA level that correlated with a similar fold increase in protein levels (Fig. 4A and C). Transcript levels of *Il22* were also significantly upregulated at 24 h although they decreased at 48 h reaching similar levels as those in the non-protected group (Fig. 4A). These results showed that upregulation of IL-17-related genes expression is a hallmark of protection.

Regarding IFN- γ -related genes, we found that mRNA levels of *Ifng* and *Cxcl11* did also peaked at 24 h in protected animals (Fig. 4B); we also confirmed augmented levels of IFN- γ protein at this time point (Fig. 4C). However, and contrary to what it was observed for IL-17-related genes, *Ifng* and *Cxcl11* were strongly upregulated by 48 h in the non-protected group, and transcript levels were similar or even higher than in protected animals (Fig. 4B). Several other IFN- γ -related genes like *Cxcl9*, *Tap1*, *Irf1*, *Irf8* and *Gbp2* have similar behavior (data not shown). Thus, protected animals displayed an early upregulation of *Ifng* and other IFN- γ -related genes that seem to be regulated as suggested by the concurrent upregulation of *Socs1*, whereas in animals that were going to die the IFN- γ mediated inflammatory response was delayed.

CD4⁺ T cells are an important source of IL-17A but not of IFN- γ

The upregulation of IL17A and cytokines related to Th17-cells like IL-17F and IL-22 in protected mice suggested the presence of Th17-cells in the lungs of these mice. Using intracellular cytokine detection we found a significant increase in the percentage of IL17A expressing cells in protected mice compared to non-protected mice sacrificed 24 h after Pn1 lethal challenge (Fig. 5A). Therefore, the increase in IL-17A mRNA and protein levels correlated with the increase in IL17A-expressing cells. Regarding IFN- γ -expressing cells no statistically significant difference was observed between protected and non-protected mice but both groups showed increased numbers compared to naïve animals (Fig. 5A). However IFN- γ positive cells from protected mice showed higher IFN- γ mean fluorescence intensity than those from non-protected mice (data not shown). Almost 40% of IL17A-producing cells in the lungs of protected mice were identified as CD4⁺ T cells (Fig. 5B). Nevertheless, T CD4⁺ cells represented a minor IFN- γ producer population in protected mice as well as in the other groups (Fig. 5B). Overall, these data indicated that protection against Pn1 acute pneumonia is associated with the presence of Th17 cells but not Th1 cells in the lungs.

Table 1

Genes related to immune response in lung microarray comparison of protected versus non-protected animals. On day 0, C57BL/6 mice were treated i.n. with a sublethal dose of *S. pneumoniae* serotype 1 (Pn1, 4×10^4 CFU) or saline. On day 7, mice were challenged i.n. with a Pn1 lethal dose (2×10^7 CFU). The table shows statistically significant ($p < 0.01$) differentially expressed genes related to immunity 24 h after the administration of a lethal dose in the lungs of protected (sublethal + lethal Pn1) versus non-protected mice (saline + lethal Pn1), 3 animals per group. LogQ is the logarithmic base 2 fold change. PANTHER annotation is shown.

Gene	Gene.Name	Celera ID	Entrez ID	LOG.Q
Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	mCG12528.2	17329	3.04
Ifng	interferon gamma	mCG1237.1	15978	2.97
Igk-V21	immunoglobulin kappa chain variable 21 (V21)	mCG142161.1	16098	2.93
Gzmb	granzyme B	mCG130827	14939	2.55
U29423	cDNA sequence U29423	mCG1050270	243461	2.47
Igj	immunoglobulin joining chain	mCG21585.1	16069	2.13
Alox12e	arachidonate lipoxygenase, epidermal	mCG21175.1	11685	1.99
Il17a	interleukin 17a	mCG7914.1	16171	1.97
C2ta	class II transactivator	mCG126563.1	12265	1.97
Igk	immunoglobulin kappa chain complex	mCG142162.1	626145 545854	1.87
Gbp6	guanylate binding protein family, member 6	mCG3631.2	634650	1.85
Mgl1	macrophage galactose specific lectin 1	mCG21504.2	17312	1.83
Igk-v8-21	immunoglobulin kappa variable 8–21	null	620400	1.81
Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2	mCG122229	14469	1.79
Irf8	interferon regulatory factor 8	mCG21199.1	15900	1.69
Gbp6	guanylate binding protein 6	mCG142489 mCG142653	236573	1.66
Gbp8	guanylate-binding protein 8	mCG20328.2	76074	1.65
Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	mCG130574.2	56620	1.63
Gbp1	guanylate nucleotide binding protein 1	mCG122231	14468	1.60
Xcl1	chemokine (C motif) ligand 1	mCG8362.2	16963	1.51
Icos	inducible T-cell co-stimulator	mCG113578.1	54167	1.44
Lair1	leukocyte-associated Ig-like receptor 1	mCG59003.2	52855	1.43
Irf1	interferon regulatory factor 1	mCG13768.1	16362	1.41
Il18bp	interleukin 18 binding protein	mCG6766.2	16068	1.39
Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	mCG16378.1	12774	1.39
Gbp4	guanylate nucleotide binding protein 4	mCG21119.2	55932	1.37
Gzma	granzyme A	mCG4516.2	14938	1.34
Aif1	allograft inflammatory factor 1	mCG15923.1	11629	1.31
Lect2	leukocyte cell-derived chemotaxin 2	mCG5202.1	16841	1.30
Sell	selectin, lymphocyte	mCG9377.2	20343	1.26
Ifi47	interferon gamma inducible protein 47	mCG14415.3	15953	1.25
Cd209c	CD209c antigen	mCG1026173.1 mCG1028293.1	628890 170776	1.24
Cd244	CD244 natural killer cell receptor 2B4	mCG10012.1	18106	1.11
Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette	mCG23012.2	21354	1.10
Igk-V8	immunoglobulin kappa chain-V8	mCG131871.2	384422 545854 16071	1.10
Prf1	perforin 1 (pore forming protein)	mCG15751.1	18646	1.10
Tap2	transporter 2, ATP-binding cassette	mCG23013.2	21355	1.06
Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	mCG52384.1	20306	1.06
Clec7a	C-type lectin domain family 7	mCG130109.2	56644	1.06
Cd40	CD40 antigen	mCG17530.2	21939	1.05
Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	mCG8493.1	55985	-1.09
Plat	plasminogen activator, tissue	mCG13091.1	18791	-1.18

Protected animals showed higher recruitment of PMNs

Flow cytometry analysis of lung single cell suspensions showed that lethal Pn1 challenge induced a high recruitment of neutrophils (PMNs) both in sublethal Pn1 and saline treated mice compared to naïve mice, when evaluated 24 h after challenge (Fig. 6). More

importantly, protected mice showed higher amounts of PMNs than non-protected mice. PMNs have been considered as one of the principal effectors cells in the clearance of pneumococcus, most likely working in conjunction with specific anti-PS antibodies. In this sense, both generated antibodies and recruited PMNs seem to be critical for the observed protection.

Table 2

Microarrays analysis shows altered biological processes related to immune response. Ontology enrichment analysis for biological processes based on the 149 differentially expressed genes (3 between protected and non-protected animals 24 h after the lethal challenge).

Biological process	p-Value
Immunity and defense	9.31E-10
Macrophage-mediated immunity	8.65E-07
Interferon-mediated immunity	1.40E-06
B-cell- and antibody-mediated immunity	1.77E-04
Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	2.19E-04
T-cell mediated immunity	1.02E-02
Granulocyte-mediated immunity	1.57E-02
Cytokine/chemokine mediated immunity	1.79E-02
Proteolysis	2.23E-02
Signal transduction	3.47E-02
Nucleoside, nucleotide and nucleic acid transport	3.47E-02

Discussion

It is largely assumed that systemic antibodies to the capsular polysaccharide primarily determine the immunity against pneumococcal invasive disease (Malley 2010). To gain further insights into the molecular and cellular basis of this protection we established and characterized a murine model of protection against acute pneumonia using a clinical isolate of *S. pneumoniae* serotype 1. Then, we evaluated several aspects of transcriptional, humoral and cellular responses in protected and non-protected animals.

We showed that a sublethal Pn1 infection elicited specific antibodies against both pneumococcal polysaccharide type 1 (PnPS1) and whole cell antigen (WcPn1Ag), and resulted in 100% survival after a subsequent homologous lethal challenge. Anti-whole cell antigen antibodies were exclusively of IgM isotype, whereas the elicited anti-capsular antibodies were of both IgM and IgG

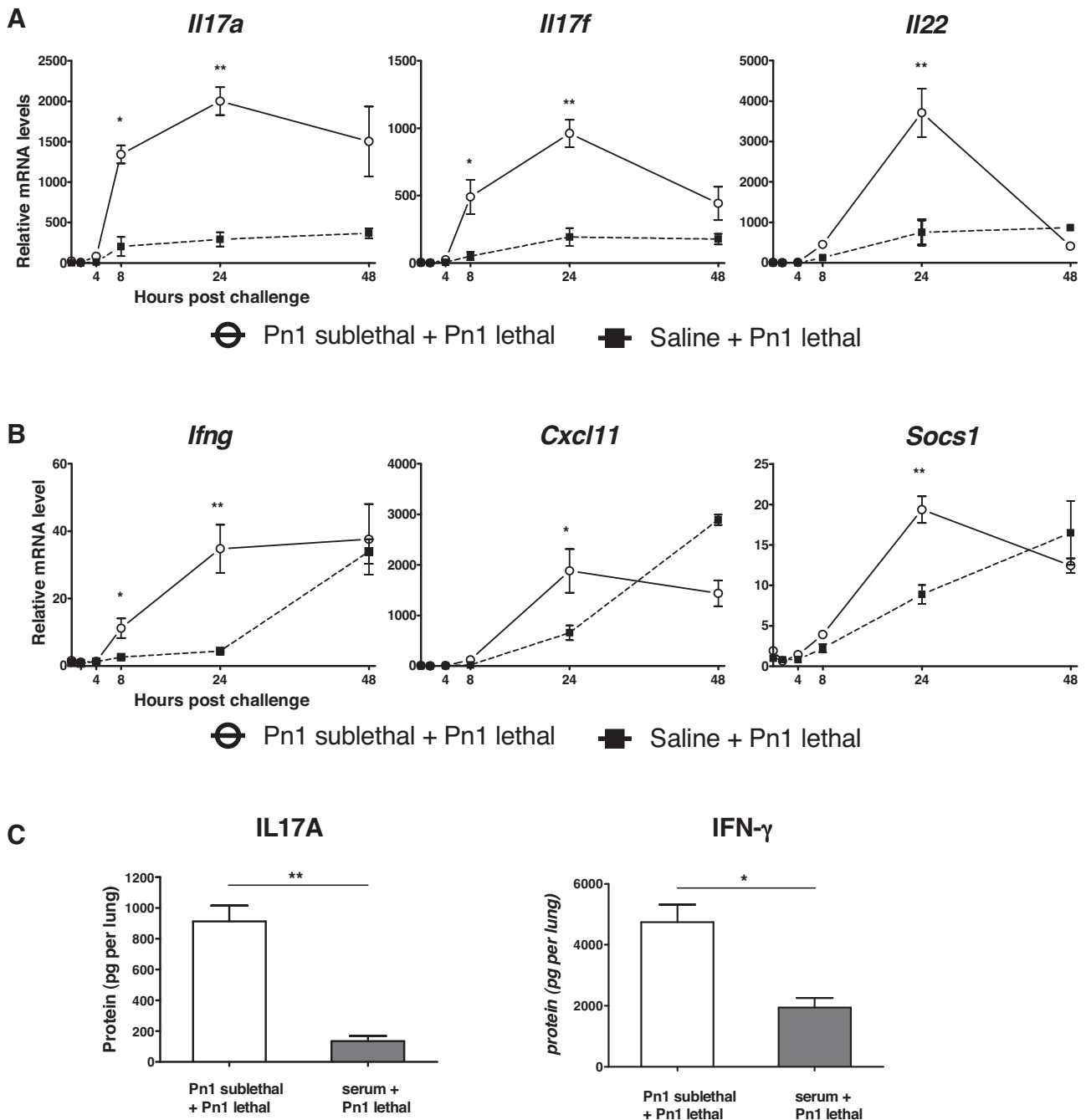


Fig. 4. In protected animals there is a strongly IL-17A- and an early IFN- γ -related genes response. On day 0, C57BL/6 mice were treated i.n. with a sublethal dose of *S. pneumoniae* serotype 1 (Pn1, 4×10^4 CFU) or saline. On day 7, mice were challenged i.n. with a Pn1 lethal dose (2×10^7 CFU). Lungs were harvested at 1.5, 4, 8, 24 and 48 h after the lethal dose ($n=7$ at 24 h and $n=3$ for other time points). Kinetics of relative mRNA levels referred to saline control group is shown for the Th17 related cytokines *Il17a*, *Il17f* and *Il22* (A), *Ifng*, *Cxcl11* and *Socs1* for IFN- γ related genes (B). Quantity of IL-17A and IFN- γ protein per lung 24 h after challenge (C). Statistics are shown for Pn1sublethal + Pn1lethal compared to saline + Pn1 lethal groups in kinetic point utilizing Mann–Whitney Test when possible or Student's *T* test.

isotypes. A previous work reported that early anti-capsular antibodies raised during a *S. pneumoniae* infection were mainly of IgM isotype (Richards et al. 2010), whereas in our work we found high levels of both IgM and IgG anti-PnPS1. Unlike other pneumococcal serotypes, capsular polysaccharide type 1 has the particularity of presenting a zwitterionic motif within each repeating structural unit (Cobb and Kasper 2005). It has been shown that zwitterionic polysaccharides, and particularly PnPS1, can activate CD4⁺ T cells both *in vivo* and *in vitro* through a MHCII-dependent mechanism (Velez et al. 2009), conferring T-dependent properties to this

antigen (Cobb and Kasper 2005; Chung et al. 2003; Groneck et al. 2009). Therefore, we suggest that the early presence of high levels of anti-PnPS1 IgG observed in our model may be due to the zwitterionic characteristic of type 1 pneumococcal polysaccharide.

The results obtained from the microarray assays showed that i.n. challenge with a high dose of pneumococcus induced a strong immune response with 2274 differentially expressed genes that is nevertheless unable to control the infection. Instead, comparative analysis of lungs from protected *versus* non-protected animals showed a comparatively small amount of genes

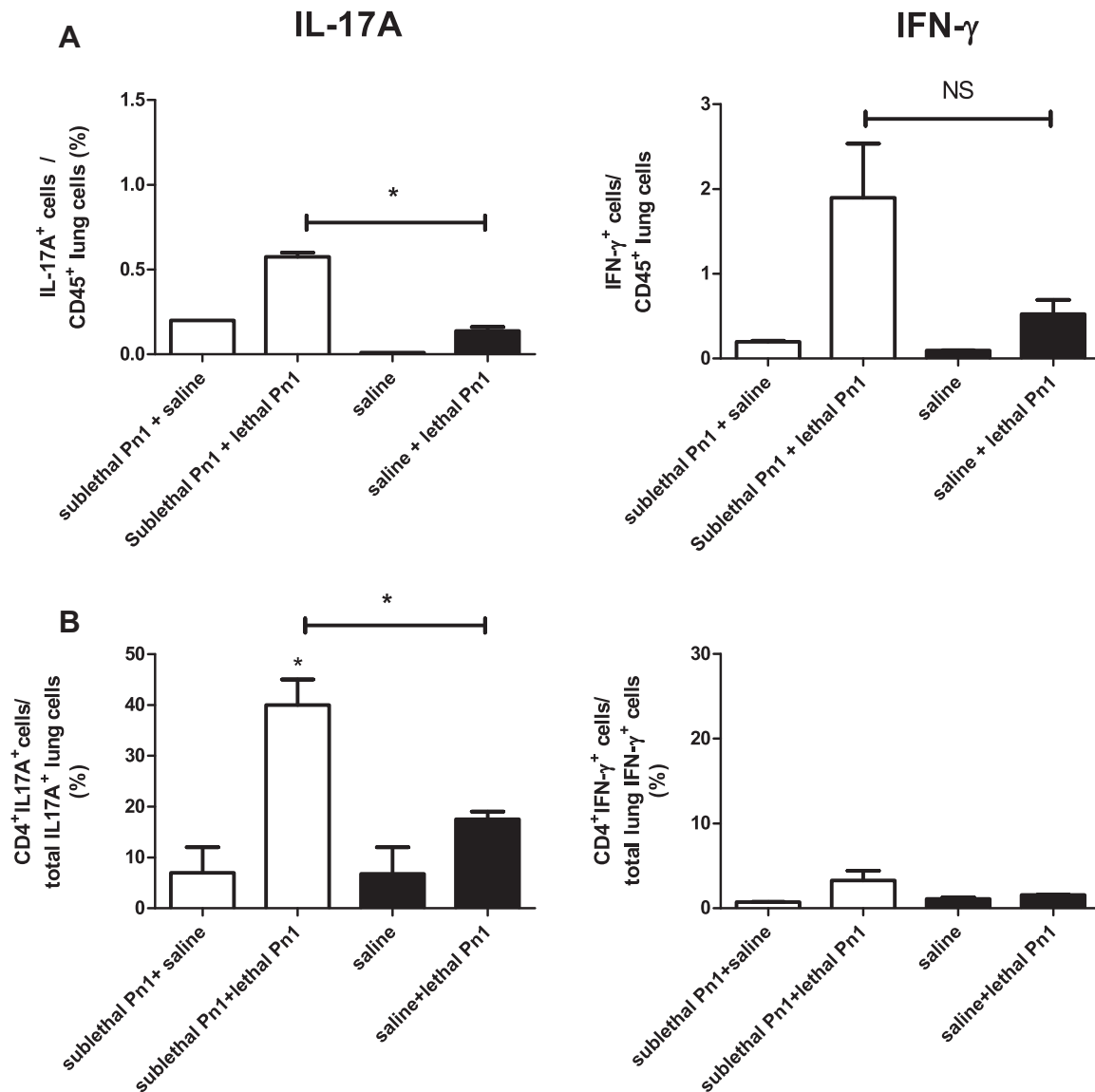


Fig. 5. Protected mice showed increased IL-17A⁺ CD4⁺ T-cells. On day 0, C57BL/6 mice were treated i.n. with a sublethal dose of *S. pneumoniae* serotype 1 (Pn1, 4×10^4 CFU) or saline. On day 7, mice were challenged i.n. with a Pn1 lethal dose (2×10^7 CFU) or saline. Lungs were harvested 24 h after the lethal dose ($n=3$) and processed for flow cytometry analysis. (A) Results are expressed as mean \pm SEM of the percentage of IL17A⁺ or IFN γ ⁺ positive cells in the total of CD45⁺ viable cells acquired for each group. (B) Mean \pm SEM of the percentage of CD3⁺CD4⁺IL17A⁺ or CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ cells in the total of IL17A- or IFN γ -positive cells, respectively for each group. For statistical analysis Student's *T* test was used.

differentially expressed (149 genes), with an overrepresentation of genes belonging to biological processes related to immunity and defense. Among these genes, we found a clear signature of upregulated IL17- as well as IFN- γ -related genes in protected animals. We also found marked differences in the dynamic of *Il17a*- and *Ifng*-related genes expression between protected and non-protected animals. In non-protected animals, transcript levels of *Il17*-related genes remained low at all time points, whereas IFN- γ and IFN- γ -related genes were highly upregulated by 48 h even surpassing the level of expression found in protected animals. This could be in line with previous reports showing that IFN- γ do not have a protective role in pneumococcal pneumonia (Rijneveld et al. 2002; van der Poll and Opal 2009). However, in protected animals we also found consistent evidence that a strong IFN- γ related response is present earlier in time. This response seems to be also regulated as seen by the upregulation of the negative factor *Socs1*. These results are consistent with other reports that postulated a beneficial role of IFN- γ as a phagocyte-activating cytokine in the

clearance of *S. pneumoniae* (Rubins and Pomeroy 1997; Yamamoto et al. 2004). Altogether, these results suggest the importance of a timely regulated IFN- γ response; an early response may be associated with protection, whereas a delayed response may contribute to the uncontrolled proinflammatory response that is a hallmark of pneumococcal pneumonia.

The T helper type 17 (Th17) cells produce several effectors cytokines including IL-17A, IL-17F and IL-22 and all have been shown to be critical for mucosal immunity against extracellular pathogens (Aujla et al. 2007; Curtis and Way 2009; Kolls and Khader 2010; Ye et al. 2001) and particularly in prevention of pneumococcal colonization (Lu et al. 2008; Moffitt et al. 2011). Moreover, it has been shown that zwitterionic polysaccharides like PnPS1 and Cell wall pneumococcal polysaccharide are able to induce IL-17A production and Th17 responses (Groneck et al. 2009; Lu et al. 2008). Accordingly, our results confirmed the presence of Th17 cells in lungs of protected animals. Furthermore, we showed that CD4⁺ T cells are one of the main IL-17A producing cell populations, but the

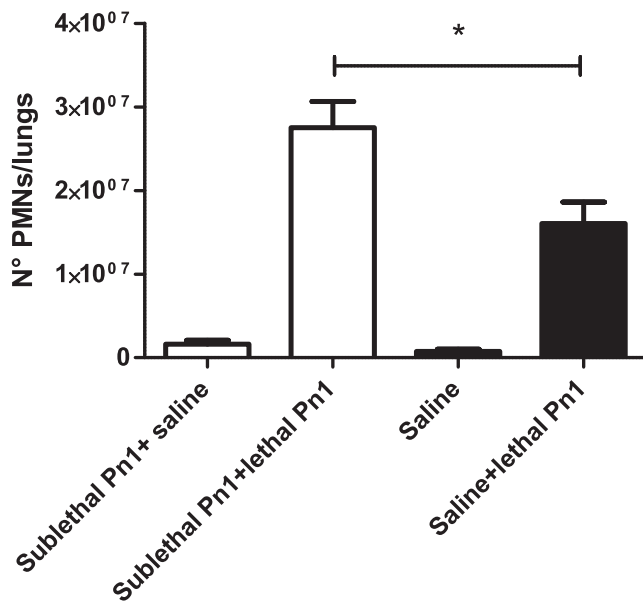


Fig. 6. Protected mice showed increased numbers of neutrophils. On day 0, C57BL/6 mice were treated i.n. with a sublethal dose of *S. pneumoniae* serotype 1 (Pn1, 4×10^4 CFU) or saline. On day 7, mice were challenged i.n. with a Pn1 lethal dose (2×10^7 CFU) or saline. Lungs were harvested 24 h after the lethal dose ($n=5$) and processed for flow cytometry analysis. Neutrophils (PMNs) were identified as Ly6G⁺ CD11b⁺ cells. Results are expressed as mean \pm SEM for each group. Mann–Whitney Test was used for statistical analysis.

results also suggested that there are other cell populations involved in IL-17A production in the lungs. Other populations that might produce IL-17A include $\gamma\delta$ T cells (Ley et al. 2006), NKT cells (Michel et al. 2007), NKT-like cells (Ley et al. 2006), and CD8⁺ T cells (Happel et al. 2003). In particular, it has been recently shown that infection by pneumococcus induces the generation of IL-17A by $\gamma\delta$ T cell (McNeela et al. 2010).

Contrary to our findings regarding IL-17A, we found that CD4⁺ T cells were not the main producers of IFN- γ in protected animals. A recent report identified NK cells as the main source of IFN- γ in the lungs (McNeela et al. 2010). Instead, preliminary experiments conducted by us identified CD8⁺ T cells as a major producer of IFN- γ in the lungs (results not shown), but so far we cannot discard that lung NK cells are also a main producer in our experimental setup. Work aimed at evaluating this is currently undergoing.

It is well known that IL-17A mediates direct recruitment, differential activation and increased survival of neutrophils and macrophages (Kolls and Linden 2004; Lu et al. 2008; Miyamoto et al. 2003), and also plays an important role in activating epithelial innate immune responses (Ishigame et al. 2009). Otherwise, IL-17A has also been shown as an activating T cell cytokine in antigen-specific T-cell-mediated immune responses (Ishigame et al. 2009; Nakae et al. 2002). More recently, a single work using myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T-cell receptor transgenic mice (D2) has proposed that Th17 cells may serve as effective B-cell helpers (Mitsdoerffer et al. 2010). Here we show that protected mice had increased numbers of neutrophils, specific antibodies and a Th17 response. Overall, our results suggest that in protected animals Th17 cells may collaborate with B-cells in the production of specific antibodies to the zwitterionic PnPS1 that work together with recruited neutrophils for clearance of the infection.

In summary, our results support the critical role that antibodies and PMNs play in the protection against acute pneumococcal pneumonia, and also suggest that upregulation of IL-17- and a timely regulated IFN- γ -related gene expression response, together with development of a Th17 cell response, are relevant characteristics

of the protective immunity against *S. pneumoniae* acute pneumonia. This information may be relevant for the development of new vaccines against *S. pneumoniae* infection.

Acknowledgments

This work was supported by a grant of the European Community (STREP grant SavinMucoPath INCO-CT-2006-032296) and ECOS-Sud (U08S02) as well as a grant from the Genopole Evry (to A.B.). F.X.P. was a recipient of a PhD fellowship from the Nausica combat sa Leucémie Association.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.imbio.2011.10.012.

References

- Abeysa, M., Hardy, G.G., Yother, J., 2003. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 71, 218.
- AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A.F., Verhoeff, J., Snippe, H., 1995. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol. Rev.* 59, 591.
- Aujla, S.J., Dubin, P.J., Kolls, J.K., 2007. Interleukin-17 in pulmonary host defense. *Exp. Lung Res.* 33, 507.
- Basset, A., Thompson, C.M., Hollingshead, S.K., Briles, D.E., Ades, E.W., Lipsitch, M., Malley, R., 2007. Antibody-independent, CD4⁺ T-cell-dependent protection against pneumococcal colonization elicited by intranasal immunization with purified pneumococcal proteins. *Infect. Immun.* 75, 5460.
- Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M., Holden, D.W., Paton, J.C., Ehrenstein, M.R., Walport, M.J., Botto, M., 2002. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16969.
- Brybaert, G., Pellay, F.X., Noth, S., Benecke, A., 2010. Quality assessment of transcriptome data using intrinsic statistical properties. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 8, 57.
- Cobb, B.A., Kasper, D.L., 2005. Zwitterionic capsular polysaccharides: the new MHCII-dependent antigens. *Cell. Microbiol.* 7, 1398.
- Curtis, M.M., Way, S.S., 2009. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126, 177.
- Chung, D.R., Kasper, D.L., Panzo, R.J., Chitnis, T., Grusby, M.J., Sayegh, M.H., Tzianabos, A.O., 2003. CD4⁺ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J. Immunol.* 170, 1958.
- Fukuyama, Y., King, J.D., Kataoka, K., Kobayashi, R., Gilbert, R.S., Oishi, K., Hollingshead, S.K., Briles, D.E., Fujihashi, K., 2010. Secretory-IgA antibodies play an important role in the immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol.* 185, 1755.
- Groneck, L., Schrama, D., Fabri, M., Stephen, T.L., Harms, F., Meemboor, S., Hafke, H., Bessler, M., Becker, J.C., Kalka-Moll, W.M., 2009. Oligoclonal CD4⁺ T cells promote host memory immune responses to zwitterionic polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 77, 3705.
- Happel, K.I., Zheng, M., Young, E., Quinton, L.J., Lockhart, E., Ramsay, A.J., Shellito, J.E., Schurr, J.R., Bagby, G.J., Nelson, S., Kolls, J.K., 2003. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Immunol.* 170, 4432.
- Hortal, M., Sehabiaque, G., Camou, T., Iraola, I., Estevan, M., Pujadas, M., 2008. Pneumococcal pneumonia in hospitalized Uruguayan children and potential prevention with different vaccine formulations. *J. Pediatr.* 152, 850.
- Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., Sudo, K., Nakae, S., Sasakawa, C., Iwakura, Y., 2009. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 30, 108.
- Kadioglu, A., Coward, W., Colston, M.J., Hewitt, C.R., Andrew, P.W., 2004. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect. Immun.* 72, 2689.
- Kadioglu, A., Gingles, N.A., Grattan, K., Kerr, A., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., 2000. Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect. Immun.* 68, 492.
- Kayhty, H., Auranen, K., Nohynek, H., Dagan, R., Makela, H., 2006. Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. *Expert Rev. Vaccines* 5, 651.
- Kolls, J.K., Khader, S.A., 2010. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 443.
- Kolls, J.K., Linden, A., 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467.
- Ley, K., Smith, E., Stark, M.A., 2006. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol. Res.* 34, 229.

- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ method. *Methods* 25, 402.
- Lu, Y.J., Gross, J., Bogaert, D., Finn, A., Bagrade, L., Zhang, Q., Kolls, J.K., Srivastava, A., Lundgren, A., Forte, S., Thompson, C.M., Harney, K.F., Anderson, P.W., Lipsitch, M., Malley, R., 2008. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog.* 4, e1000159.
- Lynch 3rd, J.P., Zhanel, G.G., 2009. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 30, 189.
- Malley, R., 2010. Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: implications for vaccine development. *J. Mol. Med.* 88, 135.
- Malley, R., Trzcinski, K., Srivastava, A., Thompson, C.M., Anderson, P.W., Lipsitch, M., 2005. CD4⁺ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4848.
- McNeela, E.A., Burke, A., Neill, D.R., Baxter, C., Fernandes, V.E., Ferreira, D., Smeaton, S., El-Rachkidy, R., McLoughlin, R.M., Mori, A., Moran, B., Fitzgerald, K.A., Tschopp, J., Petrilli, V., Andrew, P.W., Kadioglu, A., Lavelle, E.C., 2010. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog.* 6, e1001191.
- Michel, M.L., Keller, A.C., Paget, C., Fujio, M., Trottein, F., Savage, P.B., Wong, C.H., Schneider, E., Dy, M., Leite-de-Moraes, M.C., 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J. Exp. Med.* 204, 995.
- Mitsdoerffer, M., Lee, Y., Jager, A., Kim, H.J., Korn, T., Kolls, J.K., Cantor, H., Bettelli, E., Kuchroo, V.K., 2010. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14292.
- Miyamoto, M., Prause, O., Sjostrand, M., Laan, M., Lotvall, J., Linden, A., 2003. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J. Immunol.* 170, 4665.
- Moffitt, K.L., Gierahn, T.M., Lu, Y.J., Gouveia, P., Alderson, M., Flechtner, J.B., Higgins, D.E., Malley, R., 2011. T(H)17-based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Cell Host Microbe* 9, 158.
- Munoz, N., V.A.N.M., L., Marques, J.M., Rial, A., Sirard, J.C., Chabalgoity, J.A., 2010. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect. Immun.*
- Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., Iwakura, Y., 2002. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17, 375.
- Normark, B.H., Normark, S., 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 252, 91.
- Noth, S., Benecke, A., 2005. Avoiding inconsistencies over time and tracking difficulties in Applied Biosystems ABI 7000/Panther probe-to-gene annotations. *BMC Bioinformatics* 6, 307.
- 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* 4, 90.
- Paterson, G.K., Mitchell, T.J., 2006. Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology* 152, 285.
- Poolman, J.T., 2004. Pneumococcal vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 3, 597.
- Rial, A., Lens, D., Betancor, L., Benkiel, H., Silva, J.S., Chabalgoity, J.A., 2004. Intranasal immunization with a colloid-formulated bacterial extract induces an acute inflammatory response in the lungs and elicits specific immune responses. *Infect. Immun.* 72, 2679.
- Richards, L., Ferreira, D.M., Miyaji, E.N., Andrew, P.W., Kadioglu, A., 2010. The immunising effect of pneumococcal nasopharyngeal colonisation; protection against future colonisation and fatal invasive disease. *Immunobiology* 215, 251.
- Rijneveld, A.W., Lauw, F.N., Schultz, M.J., Florquin, S., Te Velde, A.A., Speelman, P., Van Deventer, S.J., Van Der Poll, T., 2002. The role of interferon-gamma in murine pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.* 185, 91.
- Roche, A.M., King, S.J., Weiser, J.N., 2007. Live attenuated *Streptococcus pneumoniae* strains induce serotype-independent mucosal and systemic protection in mice. *Infect. Immun.* 75, 2469.
- Roche, A.M., Weiser, J.N., 2010. Identification of the targets of cross-reactive antibodies induced by *Streptococcus pneumoniae* colonization. *Infect. Immun.* 78, 2231.
- Rosseau, S., Hocke, A., Mollenkopf, H., Schmeck, B., Suttrop, N., Kaufmann, S.H., Zerrahn, J., 2007. Comparative transcriptional profiling of the lung reveals shared and distinct features of *Streptococcus pneumoniae* and influenza A virus infection. *Immunology* 120, 380.
- Rubins, J.B., Pomeroy, C., 1997. Role of gamma interferon in the pathogenesis of bacteremic pneumococcal pneumonia. *Infect. Immun.* 65, 2975.
- Salys, A.W.D., 2002. *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*, 2nd edition. ASM Press.
- Trzcinski, K., Thompson, C., Malley, R., Lipsitch, M., 2005. Antibodies to conserved pneumococcal antigens correlate with, but are not required for, protection against pneumococcal colonization induced by prior exposure in a mouse model. *Infect. Immun.* 73, 7043.
- Trzcinski, K., Thompson, C.M., Srivastava, A., Basset, A., Malley, R., Lipsitch, M., 2008. Protection against nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* is mediated by antigen-specific CD4⁺ T cells. *Infect. Immun.* 76, 2678.
- van der Poll, T., Opal, S.M., 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 374, 1543.
- Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Songhet, P., Dumoutier, L., Ferrero, I., Janot, L., Erard, F., Bertout, J., Leger, H., Sebbane, F., Benecke, A., Renaud, J.C., Hardt, W.D., Ryffel, B., Sirard, J.C., 2010. TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127⁺ immune cells in spleen and mucosa. *J. Immunol.* 185, 1177.
- Velez, C.D., Lewis, C.J., Kasper, D.L., Cobb, B.A., 2009. Type I *Streptococcus pneumoniae* carbohydrate utilizes a nitric oxide and MHC II-dependent pathway for antigen presentation. *Immunology* 127, 73.
- Wernette, C.M., Frasch, C.E., Madore, D., Carlone, G., Goldblatt, D., Plikaytis, B., Benjamin, W., Quataert, S.A., Hildreth, S., Sikkema, D.J., Kayhty, H., Jonsdottir, I., Nahm, M.H., 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 514.
- WHO, 2008. 23-Valent pneumococcal polysaccharide vaccine. WHO position paper. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 83, 373.
- Yamamoto, N., Kawakami, K., Kinjo, Y., Miyagi, K., Kinjo, T., Uezu, K., Nakasone, C., Nakamatsu, M., Saito, A., 2004. Essential role for the p40 subunit of interleukin-12 in neutrophil-mediated early host defense against pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*: involvement of interferon-gamma. *Microbes Infect.* 6, 1241.
- Ye, P., Garvey, P.B., Zhang, P., Nelson, S., Bagby, G., Summer, W.R., Schwarzenberger, P., Shillito, J.E., Kolls, J.K., 2001. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 335.
- Zemlickova, H., Crisostomo, M.I., Brandileone, M.C., Camou, T., Castaneda, E., Corso, A., Echaniz-Aviles, G., Pasztor, M., Tomasz, A., 2005. Serotypes and clonal types of penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in five Latin American countries. *Microb. Drug Resist.* 11, 195.
- Zhang, Z., Clarke, T.B., Weiser, J.N., 2009. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 1899.

Key Role for Respiratory CD103⁺ Dendritic Cells, IFN- γ , and IL-17 in Protection Against *Streptococcus pneumoniae* Infection in Response to α -Galactosylceramide

Stoyan Ivanov,^{1,2,3,4,5} Josette Fontaine,^{1,2,3,4,5} Christophe Paget,^{1,2,3,4,5,a} Elodie Macho Fernandez,^{1,2,3,4,5} Laurye Van Maele,^{1,2,3,4,5} Joelle Renson,^{1,2,3,4,5} Isabelle Maillat,⁶ Natalia Muñoz Wolf,⁷ Analia Rial,⁹ Hélène Léger,⁸ Bernard Ryffel,⁶ Benoit Frisch,⁷ José A. Chabalgoity,⁹ Jean Claude Sirard,^{1,2,3,4,5} Arndt Benecke,⁸ Christelle Faveeuw,^{1,2,3,4,5} and François Trottein^{1,2,3,4,5}

¹Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, ²Université Lille Nord de France, ³Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8204, ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, and ⁵Institut Fédératif de Recherche 142, Lille, ⁶Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6218, Université d'Orléans, Orléans, ⁷Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7199, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, and ⁸Centre National de la Recherche Scientifique, USR 3078, Institut des Hautes Études Scientifiques, Bures sur Yvette, France; and ⁹Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, CP-11600 Montevideo, Uruguay

Background. Exogenous activation of pulmonary invariant natural killer T (iNKT) cells, a population of lipid-reactive $\alpha\beta$ T lymphocytes, with use of mucosal α -galactosylceramide (α -GalCer) administration, is a promising approach to control respiratory bacterial infections. We undertook the present study to characterize mechanisms leading to α -GalCer-mediated protection against lethal infection with *Streptococcus pneumoniae* serotype 1, a major respiratory pathogen in humans.

Methods and Results. α -GalCer was administered by the intranasal route before infection with *S. pneumoniae*. We showed that respiratory dendritic cells (DCs), most likely the CD103⁺ subset, play a major role in the activation (IFN- γ and IL-17 release) of pulmonary iNKT cells, whereas alveolar and interstitial macrophages are minor players. After challenge, *S. pneumoniae* was rapidly (4 hours) eliminated in the alveolar spaces, a phenomenon that depended on respiratory DCs and neutrophils, but not macrophages, and on the early production of both IFN- γ and IL-17. Protection was also associated with the synthesis of various interferon-dependent and IL-17-associated genes as revealed by transcriptomic analysis.

Conclusions. These data imply a new function for pulmonary CD103⁺ DCs in mucosal activation of iNKT cells and establish a critical role for both IFN- γ and IL-17 signalling pathways in mediating the innate immune response to *S. pneumoniae*.

The extracellular, gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* (also called pneumococcus) is a

serious human pathogen that causes more than 50% of the cases of community-acquired bacterial pneumonia [1, 2]. Innate immunity is crucial in the early phase of natural anti-pneumococcal host defence and alveolar macrophages and neutrophils play key roles in the clearance of bacteria. However, in situations in which the immune system is overwhelmed (for instance, after infection with a high dose of *S. pneumoniae*) or deficient, bacterial replication is not controlled and hosts die of immune cell-mediated pneumonia and sepsis because of bacterial dissemination. Stimulation of the lung-innate immunity with use of bacterial crude extracts or purified flagellin protects against lethal respiratory pneumococcal infection in mouse

Received 10 November 2011; accepted 27 February 2012; electronically published 21 June 2012.

^aPresent affiliation: Peter MacCallum Cancer Centre, St. Andrew's Place, Melbourne, Victoria Australia.

Correspondence: Dr. François Trottein, Center for Infection and Immunity of Lille, Inserm U1019-CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France (francois.trottein@pasteur-lille.fr).

The Journal of Infectious Diseases 2012;206:723–34

© The Author 2012. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jis413

models [3–5]. In these settings, activation of Toll-like receptors (TLRs) in stromal (epithelial cells) and/or hematopoietic (dendritic cells [DCs], macrophages) cells is a crucial step to promote macrophage and/or neutrophil-mediated bacterial clearance. In this study, we assessed the role of α -galactosylceramide (α -GalCer), a synthetic, non-TLR agonist glycolipid known to activate potent innate responses, in the control of acute respiratory pneumococcal infection.

Invariant natural killer T (iNKT) cells are innate-like $\alpha\beta$ T lymphocytes expressing markers associated with the NK lineage. These cells express a semi-invariant TCR and rapidly secrete cytokines upon stimulation with certain lipid antigens (Ags), such as α -GalCer, which is presented by the nonpolymorphic CD1d molecule expressed by Ag-presenting cells (APC) [6–10]. In the mouse system, iNKT cells can be subdivided into 2 main populations based on the expression of NK1.1; the NK1.1⁺ subset is described to preferentially produce IFN- γ and IL-4, and the NK1.1⁻ subset is more prone to release IL-17 [7, 11, 12]. Human iNKT cells can also produce IFN- γ , IL-4, and IL-17 [7]. iNKT cells are critical regulators of the immune response to infectious agents, and therapies to promote iNKT cell activation may represent a promising approach to treat respiratory (antibiotic-resistant) bacterial infections [7, 13]. Here, we first sought to identify the role of pulmonary APC in the primary activation of lung iNKT cells after intranasal (i.n.) administration of α -GalCer. Using a pathogenic strain of *S. pneumoniae* serotype 1, a major serotype associated with invasive disease in humans [14], we then studied the mechanisms underlying α -GalCer-mediated protection against a lethal *S. pneumoniae* challenge.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Abs

α -GalCer was from Axxora Life Sciences (Coger). Cyanine (Cy)5-conjugated α -GalCer [15] and clodronate-containing liposomes [16] were produced as described elsewhere. Monoclonal Abs against mouse CD3 (APC-conjugated), NK1.1 (PE- or PerCp-Cy5.5-conjugated), TCR- β (FITC or Pacific Blue-conjugated), CD69 (PerCp-Cy5.5-conjugated), CD11b (PerCp-Cy5.5-conjugated), Ly6G (PE-conjugated), CD103 (PE-conjugated), CD11c (APC or PE-Cy7-conjugated), F4/80 (PerCp-Cy5.5 or PE-Cy7-conjugated), CD45 (FITC or eFluor605NC-conjugated), CD1d (biotin-conjugated), Streptavidin (Alexa Fluor-700-conjugated), IFN γ (Alexa Fluor-488-conjugated), IL-17A (Alexa Fluor-647-conjugated), and isotype controls were purchased from BD Pharmingen. The LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit was from Invitrogen. PE-conjugated PBS-57 glycolipid-loaded CD1d tetramer was from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA).

Mice

Wild-type (WT) C57BL/6 mice were purchased from Janvier. *Ja18*^{-/-}, *CD11c-DTR*, and *Il17ra*^{-/-} mice are described elsewhere [17–19]. Eight-week-old male mice were used in this study. For *S. pneumoniae* infection, mice were maintained in a biosafety level 2 facility. All animal work conformed to the Pasteur Institute, Lille, Animal Care and Use Committee guidelines (agreement number N^oAF16/20090).

Analysis of iNKT and NK Cell Activation

Lung mononuclear cells (MNCs) were prepared as described elsewhere [20]. MNCs were incubated with appropriate combinations of Abs and/or PBS-57-loaded CD1d tetramer to identify iNKT and NK cells. For intracellular staining, cells were fixed in PBS 1% paraformaldehyde and incubated with appropriate Abs in 0.1% saponin buffer. Cells were acquired and analyzed on a LSR Fortessa (Becton Dickinson) cytometer using the *FACSDiva* software.

Measurement of Cy5- α -GalCer Incorporation by Respiratory APC

Lung cells were prepared 45 minutes after i.n. inoculation of Cy5-conjugated or unconjugated α -GalCer (2 μ g). Then, 2×10^6 cells/well were resuspended in the appropriate combination of Abs to allow DC and macrophage subset identification, and incorporation of Cy5 was analyzed on the LSR Fortessa.

Respiratory APC and iNKT Co-cultures

Cell-sorted respiratory DC and macrophages were pulsed with graded doses of α -GalCer for 2 hours, washed, and co-cultured for 48 hours with hepatic CD5⁺ NK1.1⁺ cells, which were purified as described elsewhere [21] or with the iNKT cell hybridoma DN32.D3 [22]. Cytokine production was measured in the culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay.

Inoculation of α -GalCer, Infection With *S. pneumoniae*, and Assessment of Bacterial Counts

Mice were inoculated by the i.n. route with α -GalCer (2 μ g). *S. pneumoniae* serotype 1 clinical isolate E1586 sequence type ST304 is described elsewhere [4, 23, 24]. Mice were anesthetized and administered i.n. with 5×10^6 bacteria. Mice were monitored daily for illness and mortality for 14 days. A morphology-based differential cell count was conducted on cyto-spin preparations from the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid samples and stained with Diff-Quik solution (Sigma). Bacterial burden in the lungs and BAL samples was measured by plating lung homogenates or BAL samples onto blood agar plates. Colony-forming units were enumerated 24 hours later.

Micro-array Analysis

Total RNA (2 μ g) from whole lungs was processed on the Mouse Whole Genome Arrays, version 2.0 (Applied

Biosystems), and transcriptomic analysis was performed as described elsewhere [25], using the NeONORM normalization method with $k = 0.20$. The longitudinal analysis of statistically significantly regulated genes was performed as described elsewhere [26]. Gene Ontology (GO) and KEGG annotations were analyzed using the Panther Protein Classification System (<http://www.pantherdb.org>). As multiple testing corrections, we used the method of Bonferroni as described elsewhere [27]. The microarray data for the experiments described here were deposited in the MACE database (<http://mace.ihes.fr>) under accession number 3149240694.

Depletion of DCs, Neutrophils, and Alveolar Macrophages

For depletion of DCs, mice heterozygous for the CD11c-DTR transgene were injected by the intra-peritoneal route (i.p.) with 100 ng diphtheria toxin (DT; Sigma) as described elsewhere [18]. Neutrophil depletion was achieved with a single i.p. injection of 250 μg of anti-Ly6G (clone NIMPR14) or isotype control (LTF-2) mAb 1 day before *S. pneumoniae* challenge. To deplete alveolar macrophages, mice were administered by the i.n. route with 20 μg of clodronate-containing liposomes.

Neutralization of IFN- γ

Recipient mice were injected (i.p.) with 100 μg anti-IFN- γ (AN18) or with the isotype control mAb (HRPN) 1 hour before α -GalCer treatment.

Statistical Analyses

Results are expressed as the mean \pm standard deviation or standard error of the mean. The statistical significance of differences between experimental groups was calculated using analysis of variance with a Bonferroni post-test or an unpaired Student *t* test (GraphPad Prism 4 Software). Survival of mice was compared using Kaplan–Meier analysis and log-rank test.

RESULTS

Respiratory DCs are Essential to Activate Pulmonary iNKT Cells In Vivo

We first analyzed the kinetics of the pulmonary iNKT cell response after i.n. inoculation of α -GalCer. As shown in Figure 1A, α -GalCer decreased the frequency of lung iNKT cells 12 hours and 24 hours, but not 6 hours, after treatment, a phenomenon probably attributable to TCR internalization [28, 29] and/or to activation-induced cell death [30, 31]. This effect was associated with an enhanced expression of intracellular IFN- γ and IL-17A in iNKT cells (Figure 1B and 1C). Of note, although the NK1.1⁺ iNKT cell subset only produced IFN- γ , NK1.1⁻ iNKT cells produced both IFN- γ and IL-17A (Figure 1C).

The role of respiratory APC in the activation of pulmonary iNKT cells is ill-defined. To investigate the potential role of

DCs in lipid Ag presentation in vivo, transgenic CD11c.DTR mice were used [18]. As shown in Figure 2A, DT treatment depleted by approximately 80% lung DCs (CD11c^{hi} F4/80^{neg}). However, the number of alveolar (CD11c^{pos} F4/80^{hi}) and interstitial (CD11c^{neg} F4/80^{int}) macrophages remained unchanged. Because 2 predominant populations of respiratory DCs have been described [32, 33], respiratory DCs were discriminated on the basis of CD11b and CD103 expression (Figure 2B). Of interest, DT treatment resulted in an almost complete disappearance of CD11b⁻CD103⁺ (here, referred to as CD103⁺) DCs, whereas it reduced by approximately 58% the number of CD11b^{hi}CD103^{neg} (referred to as CD11b^{high}) DCs. This can be explained by the lower level of CD11c expression by the remaining CD11b^{high} DCs (not shown). Of note, administration of DT completely blunted IFN- γ and IL-17 production by pulmonary iNKT cells (Figure 2C). Depletion of DCs also resulted in a complete ablation of IFN- γ production by NK cells (Figure 2D). Thus, respiratory DCs (most likely, the CD103⁺ subset), but not macrophages, are the major players of pulmonary iNKT cell activation in response to α -GalCer administered intranasally.

Respiratory DCs Display a High Capacity to Activate Primary iNKT Cells In Vitro

We then investigated whether these data could be explained by differential CD1d expression, in vivo incorporation rate of α -GalCer, or intrinsic ability to directly promote cytokine release by iNKT cells. As shown in Figure 3A, CD103⁺ and CD11b⁺ DCs expressed equal levels of CD1d, and this expression was higher in alveolar macrophages and lower in interstitial macrophages. As indicated in Figure 3B, 45 minutes after Cy5- α -GalCer i.n. administration, both CD103⁺ and CD11b⁺ DCs labeled positively and to a similar extent. Of note, Cy5-conjugated α -GalCer was strongly incorporated by alveolar macrophages, whereas interstitial only poorly took-up α -GalCer (Figure 3B). The ex vivo iNKT cell-activating properties of respiratory APCs were then compared. DC and macrophage subsets were sorted from the lung tissue, loaded with α -GalCer, and then exposed to primary iNKT cells. CD103⁺ DC and CD11b^{high} DC activated the release of IFN- γ by iNKT cells to a similar extent, whereas alveolar macrophages, particularly interstitial macrophages, had a much reduced capacity to do so (Figure 3C). In contrast, DC and macrophage subsets activated the iNKT cell hybridoma DN32.D3 to the same extent (Figure 3D).

α -GalCer Protects Mice Against Lethal *S. pneumoniae* Infection

We next evaluated the impact of α -GalCer treatment on *S. pneumoniae* serotype 1 lethal infection. As shown in Figure 4A, at the dose used (5 LD₅₀), all vehicle-treated mice died 5 days after infection. In marked contrast, mice

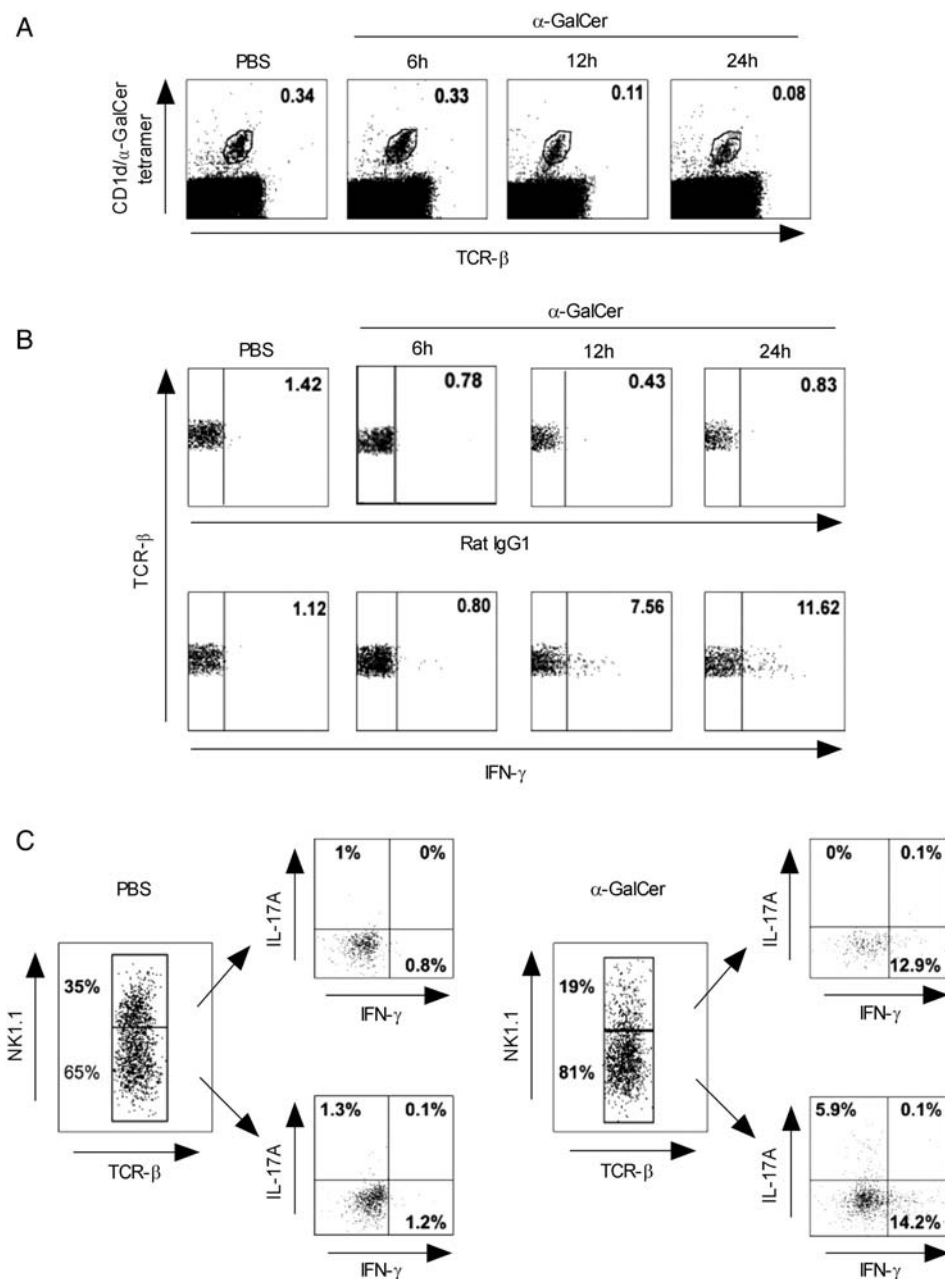


Figure 1. Activation of pulmonary iNKT cells after α -GalCer intranasal inoculation. The lungs were harvested from phosphate-buffered saline (PBS)– or α -GalCer–treated mice 6, 12, or 24 hours after treatment, and iNKT cells were analyzed by FACS staining. iNKT cells were gated on lymphocytes expressing TCR- β and positive for the PBS57-loaded CD1d tetramer. (A) Representative dot plots are represented for each time point. No significant changes in total cell counts were observed in the lungs at these time points. (B) Gated iNKT cells were analyzed for intracellular IFN- γ production. (C) iNKT cells, expressing or not the NK1.1 molecule, were analyzed for intracellular IFN- γ and IL-17A production 24 hours after α -GalCer treatment. Of note, α -GalCer administration enhanced by approximately 30% ($n=7$) the frequency of detectable NK1.1⁺ iNKT cells. (B and C) Representative dot plots are shown. Numbers indicate mean percent cells in quadrants obtained with at least 5 mice.

previously treated (24 hours) with α -GalCer did not present any visible signs of clinical disease and were fully protected from mortality. Of note, α -GalCer did not confer protection in mice deficient in iNKT cells (*Ja18*^{-/-} mice). The protective effect of α -GalCer was long-lasting, because 60%–75% of mice treated 3 and 7 days, but not 14 days, earlier were protected

against *S. pneumoniae* challenge (Figure 4B). The numbers of live bacteria in the whole lungs 36 hours after infection correlated inversely with protection against lethal pneumonia (Figure 4C). Furthermore, there was significantly less bacterial dissemination to the spleen in mice treated with α -GalCer. We next investigated whether elimination of bacteria occurs

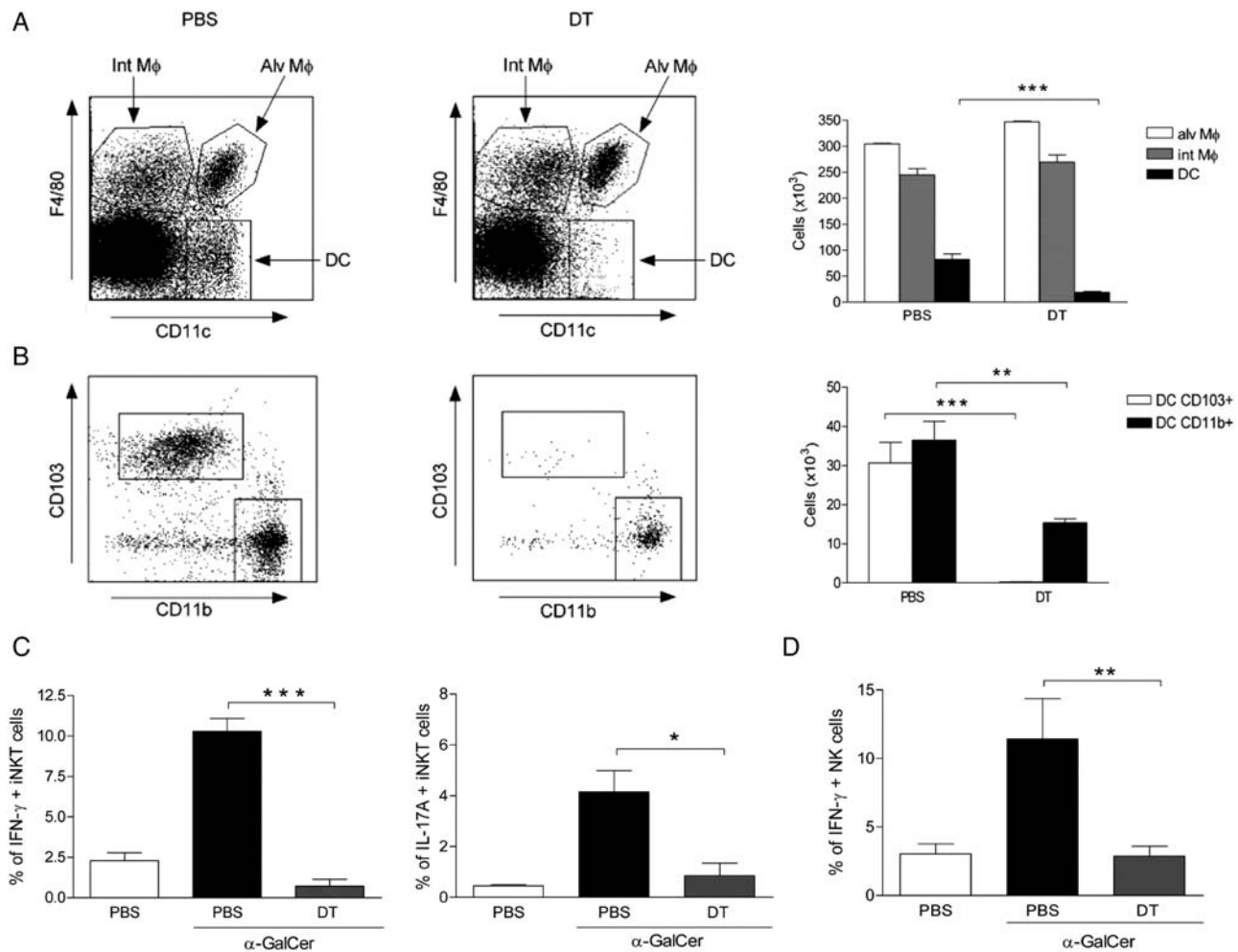


Figure 2. Role of respiratory DCs in the production of IFN- γ and IL-17A by pulmonary iNKT cells after α -GalCer administration. Transgenic CD11c^{DTR} mice were injected with phosphate-buffered saline (PBS) or DT 24 hours before α -GalCer inoculation. (A) Gated live CD45^{pos} cells were analyzed. The proportions of CD11c^{hi} F4/80^{neg} (DCs), CD11c^{pos} MHC F4/80^{hi} (alveolar macrophages, Alv M ϕ) and CD11c^{neg} F4/80^{int} (interstitial macrophages, Int M ϕ) in PBS- and DT-treated mice are shown (left panel). The absolute numbers of lung DCs and macrophages from PBS- and DT-treated mice are shown (right panel). Of note, DT treatment did not affect the number of plasmacytoid DCs (CD11c^{low}) (not shown). (B) DCs were discriminated on the basis of CD11b and CD103 expression on the 2 animal groups. (C and D) The lungs were harvested 24 hours after α -GalCer treatment. The mean percentages \pm standard error of the mean (SEM) of pulmonary iNKT cells positive for IFN- γ (panel C, left panel) or IL-17 (panel C, right panel) and the mean percentages \pm SEM of pulmonary NK (CD5⁻ NK1.1⁺) cells positive for IFN- γ (panel D) are represented on the bar histograms. (A–D) Significant differences are designated by using the analysis of variance test, followed by a multiple-comparisons posttest ($n=6$). *** $P < .001$, ** $P < .01$, * $P < .05$.

rapidly after challenge in the alveolar space or at later time points in the lung tissue after the bacteria have crossed the lung epithelium. As shown in Figure 4D, α -GalCer induced a microbicidal or bacteriostatic environment in the alveolar spaces that rapidly, within the first 4 hours of inoculation, led to the control of bacterial replication in the airways. This effect was associated with an enhanced recruitment of neutrophils, but not macrophages, in the BAL samples (Figure 4E).

α -GalCer–Mediated Protection is Fully Mediated by Neutrophils

Because macrophages and neutrophils represent the most predominant cell populations in the alveolar spaces, we

investigated their respective role in α -GalCer–mediated protection against *S. pneumoniae*. As shown in Figure 5A, administration of anti-Ly6G mAb (NIMPR14) strongly depleted neutrophils in BAL samples and in the lung. In agreement with another study [34], depletion of neutrophils accelerated mortality in PBS–treated mice. Remarkably, in α -GalCer–injected animals, neutrophil depletion resulted in a fatal outcome and higher bacterial loads in BAL (Figure 5A).

To study the involvement of alveolar macrophages, known in some contexts to participate in neutrophil recruitment and activation [35, 36], mice were administered intranasally with clodronate-loaded liposomes just before α -GalCer treatment. This induced a strong depletion of alveolar macrophages

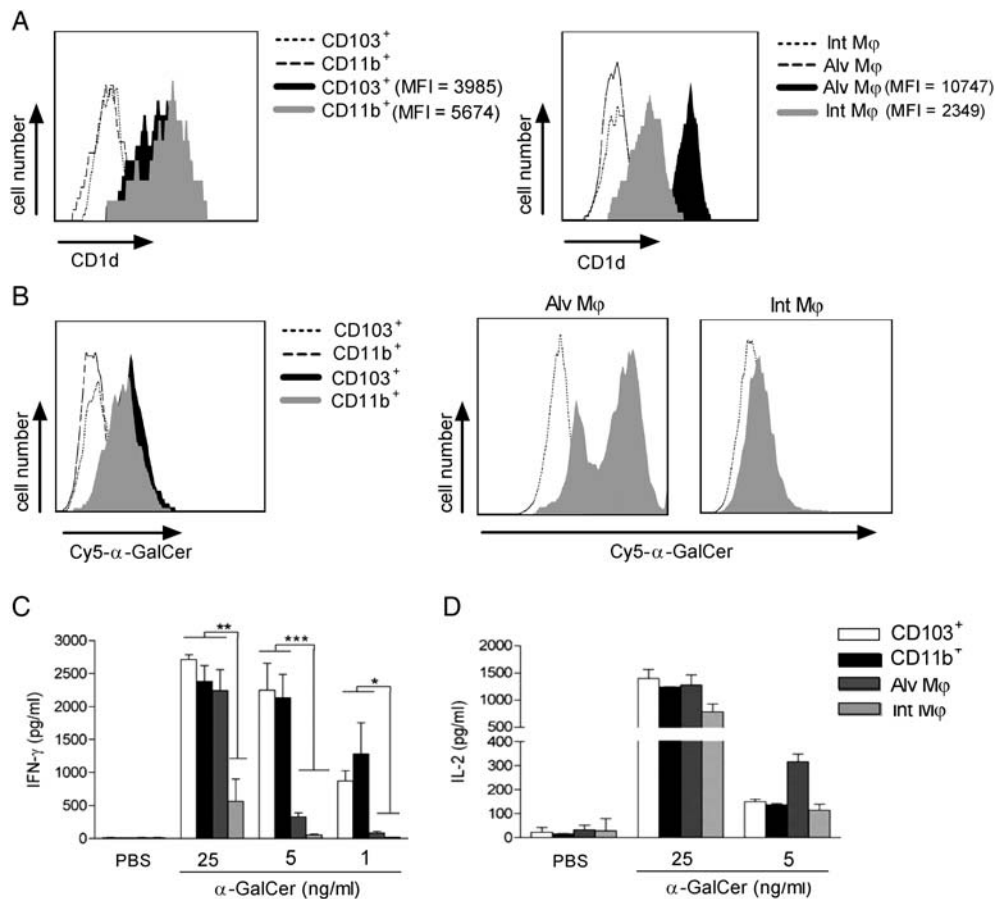


Figure 3. Role of pulmonary APCs in the activation of iNKT cells in response to α -GalCer. (A) Lung MNCs were labelled with CD1d Ab (filled histograms) or isotype control (open histograms) and CD1d expression by pulmonary DCs (*left panel*) and macrophages (*right panel*) was analysed by flow cytometry. Shown is a representative experiment out of three. (B) Recipient mice were i.n. inoculated with Cy5-conjugated (2 μ g) (filled histograms) or unconjugated α -GalCer as a control (open histograms) and Cy5 incorporation by CD103⁺ and CD11b⁺ DCs (*left panel*) or by alveolar macrophages (Alv M ϕ) and interstitial macrophages (Int M ϕ) (*right panel*) was analysed by flow cytometry 45 minutes later. Of note, pulmonary T and B cells showed no labelling in this setting (not shown). Shown are representative histograms of two independent experiments. (C and D) Sorted CD103⁺ and CD11b⁺ DCs and alveolar macrophages and interstitial macrophages (1×10^4 cells/well) were exposed to graded doses of α -GalCer for 2 hours and then cocultured for 48 hours with sorted hepatic NKT cells (panel C) or the iNKT cell hybridoma DN23.D3 (panel D) (1×10^5 cells/well). IFN- γ or IL-2 production was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay. Results represent the mean \pm standard error of the mean of a representative experiment of 2 ($n=3$). *** $P < .001$, ** $P < .01$, * $P < .05$.

(Figure 5B), but not neutrophils (not shown). Alveolar macrophage depletion had no effect on the survival rate or on the bacterial load of α -GalCer-treated animals (Figure 5B). Thus, after α -GalCer stimulation, neutrophils play a key role in bacterial killing, independently from macrophages.

Protection Is Associated With Increased Expression of IFN- and IL-17-related Defence Genes

To gain insight into the mechanism of protection conferred by α -GalCer, we analyzed the gene expression signature that characterizes the lung after α -GalCer administration. At 4 hours after treatment, a transient regulation of gene expression (477 induced, 211 repressed; $P < .01$) was detected (Figure 6A). This initial gene expression program then evolved toward a

more balanced profile at 18 hours, characterized by an enhanced number of regulated genes (1023 induced, 1078 repressed). Direct comparisons of the transcriptomic profiles at 4 hours and 18 hours with the baseline (0 hour) measurement identified genes with significant changes in expression (Figure 6B and 6C). These 2 gene sets (4 hours and 18 hours) showed significant enrichment of different gene ontology sets, such as immunity and defence and cytokine and chemokine (Figure 6D and 6E). Of interest, the neutrophil-recruiting chemokines *Cxcl1* and *Cxcl2* were strongly up-regulated at 4 hours (Log Q >3) (Figure 6F). Numerous IFN-dependent genes, such as chemokines (*Cxcl5/9/10/11*) and members of the so-called IFN-stimulated gene (ISG) family (eg, *Irg1* and *Igtp*) were found to be strongly (Log Q >3) up-regulated

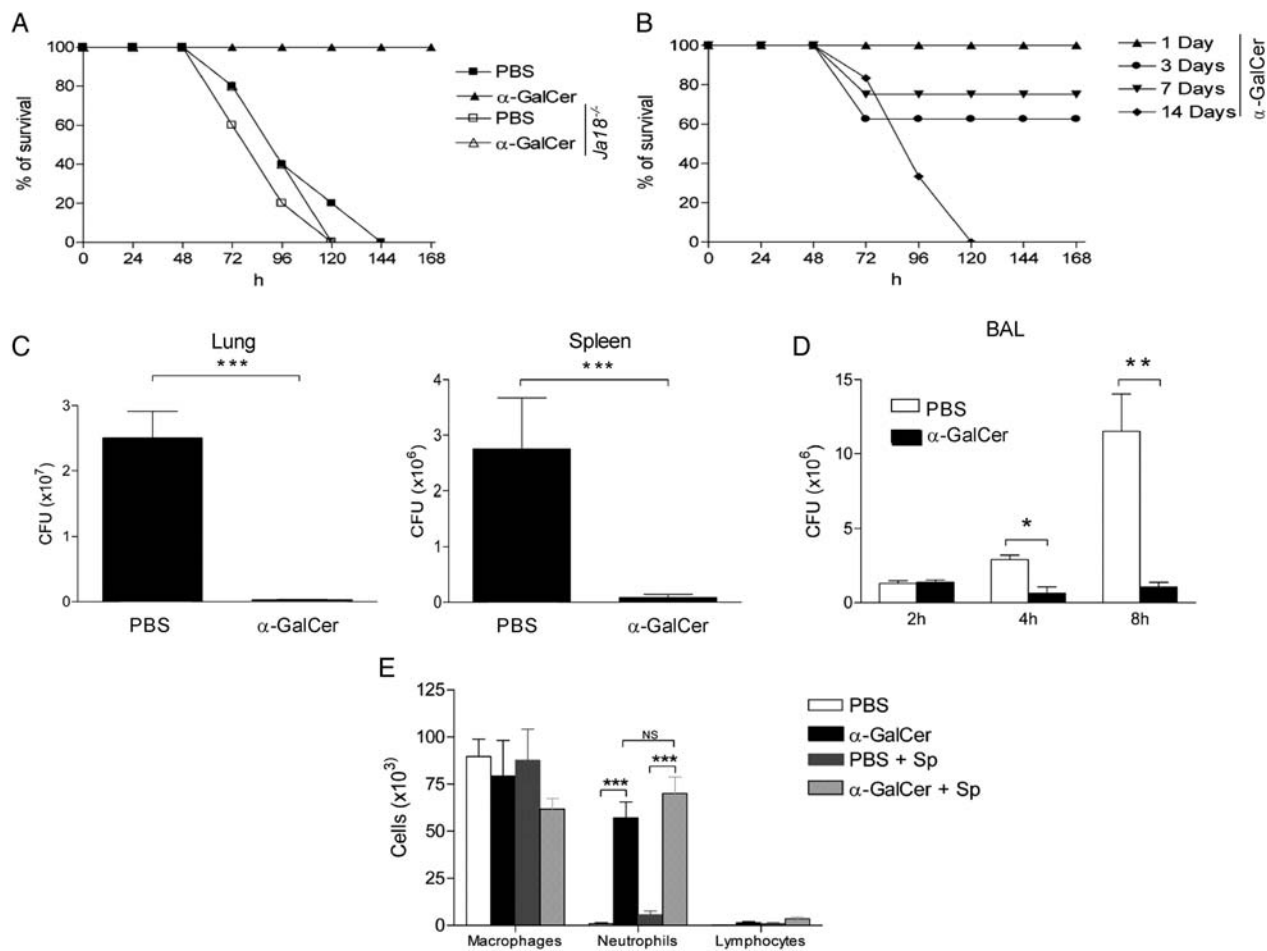


Figure 4. α -GalCer-mediated protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge. (A) Age-matched WT or *Ja18*^{-/-} mice previously treated or not with α -GalCer (24 hours before) were infected intranasally with *S. pneumoniae* (5×10^6 CFU) and monitored daily. The log-rank test for comparisons of Kaplan–Meier survival curves indicated a significant increase in the survival of α -GalCer-treated WT mice compared, with phosphate-buffered saline (PBS)-treated mice. $P < .001$ ($n =$ at least 15 mice/group). (B) Mice were treated with α -GalCer 3, 7 or 14 days before *S. pneumoniae* challenge. $P < .001$ (1 day vs 14 days), $P < .05$ (3 and 7 days vs 14 days) ($n = 6$ –10 mice/group). (C) Mice, either treated or not with α -GalCer, were sacrificed 36 hours after *S. pneumoniae* challenge and the number of CFU was determined in the lungs and in the spleen. (D) Mice were sacrificed at different time points after challenge and the number of CFU was determined in BAL samples. (E) The total number of cells in BAL was determined at 4 hours after challenge. (C–E) Error bars represent the mean \pm standard error of the mean ($n = 9$). *** $P < .001$, ** $P < .01$, * $P < .05$.

18 hours after treatment. In parallel, genes associated with IL-17 (*Cxcl1/2/9/10/11*, *Il6*, *Csf3*, *Ccl2/7*, *Saa3*) were induced in response to α -GalCer. Thus, α -GalCer induced IFN- and IL-17-mediated gene expression in the lungs, a signature that may account for its protective effect against *S. pneumoniae* lethal challenge.

IFN- γ , IL-17, and Respiratory DCs are Required for α -GalCer-mediated Protection Against *S. pneumoniae*

Inoculation of α -GalCer resulted in IFN- γ and IL-17 production by iNKT cells, a phenomenon that depended on respiratory DCs. We next addressed the role of these cytokines in the α -GalCer-mediated protection against *S. pneumoniae* lethal challenge. Compared with the isotype control, the neutralizing

anti-IFN- γ Ab (AN18) partially reduced the protective effect conferred by α -GalCer, because approximately 50% of mice died 5 days after infection (Figure 7A). Similarly, the lack of IL-17Ra reduced the protective effect of α -GalCer by half. When these 2 deficiencies were combined, α -GalCer failed to confer its protective effects; the totality of *Il17ra*^{-/-} mice treated with the anti-IFN- γ Ab died. Thus, IFN- γ and IL-17 function cooperatively to clear *S. pneumoniae* in our setting. To our knowledge, this is the first time that IL-17 has been shown to exert a protective anti-infectious effect after α -GalCer treatment.

We finally assessed the role of respiratory DCs in α -GalCer-mediated protection. DT treatment completely abrogated the protective effect of α -GalCer in transgenic CD11c.DTR mice (Figure 7B).

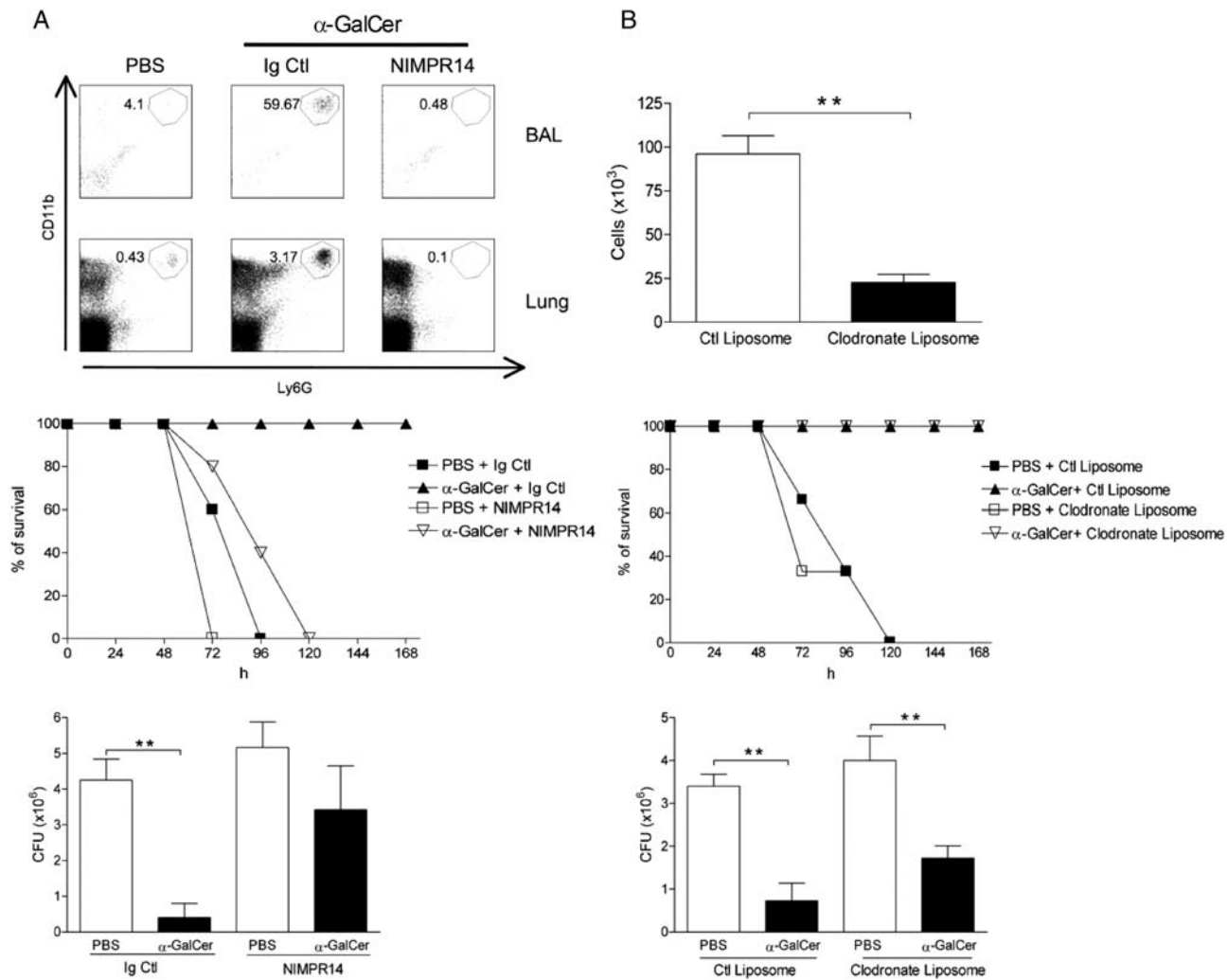


Figure 5. Role of neutrophils and macrophages in the α -GalCer-mediated protection against *Streptococcus pneumoniae* lethal challenge. Recipient mice were injected with 250 μ g anti-Ly6G or isotype control mAb (panel A) or received (i.n.) liposome clodronate (panel B) 24 hours before vehicle or α -GalCer treatment. Animals were infected with *S. pneumoniae* 24 hours later. Upper panel, Representative dot plots showing neutrophil depletion in BALs and lungs (panel A) and macrophage depletion in BALs (panel B). Middle panel, Percentages of survival of infected mice, either depleted or not in neutrophils (panel A) or macrophages (panel B). Lower panel, the number of CFU was determined in the BALs 4 hours post challenge. For the upper right panel, the significant difference is designated by a Student *t* test. For the other panels, significant differences are designated by using the analysis of variance test, followed by a multiple-comparisons posttest. ***P* < .05 (*n* = 6, two independent experiments). Although not significant, α -GalCer reduced the number of CFU in neutrophil-depleted animals and delayed the animal death by two days compared to the control group (PBS + NIMPR14).

DISCUSSION

In this study, we assessed the role of α -GalCer, a non-TLR agonist that specifically activates iNKT cells, in the control of acute respiratory pneumococcal infection. Alpha-GalCer has been reported to enhance host resistance to extracellular capsulated bacteria, such as pneumococcus, but the underlining mechanisms are still elusive. Kawakami et al reported that i.p. delivery of α -GalCer at the time of *S. pneumoniae* serotype 3 infection led to a partial, but significant, reduction in the number of live bacteria in the lungs 3 days after infection [37]. It was next suggested that iNKT cells, through IFN- γ

production, may act by enhancing neutrophil-mediated host defence, although the mechanism of the protection was not fully described [38]. In the present study, we re-evaluated this question, using the lung as the delivery site of α -GalCer administration and *S. pneumoniae* serotype 1, a major serotype in humans. Before assessing the potential role of α -GalCer in protective immunity in this system, we first studied the features of the pulmonary iNKT cell response and the role that respiratory APCs play in this system.

Whereas activation of splenic/hepatic iNKT cells in response to systemic delivery of α -GalCer is rapid (1–2 hours), its i.n. administration led to a delayed response in the lungs.

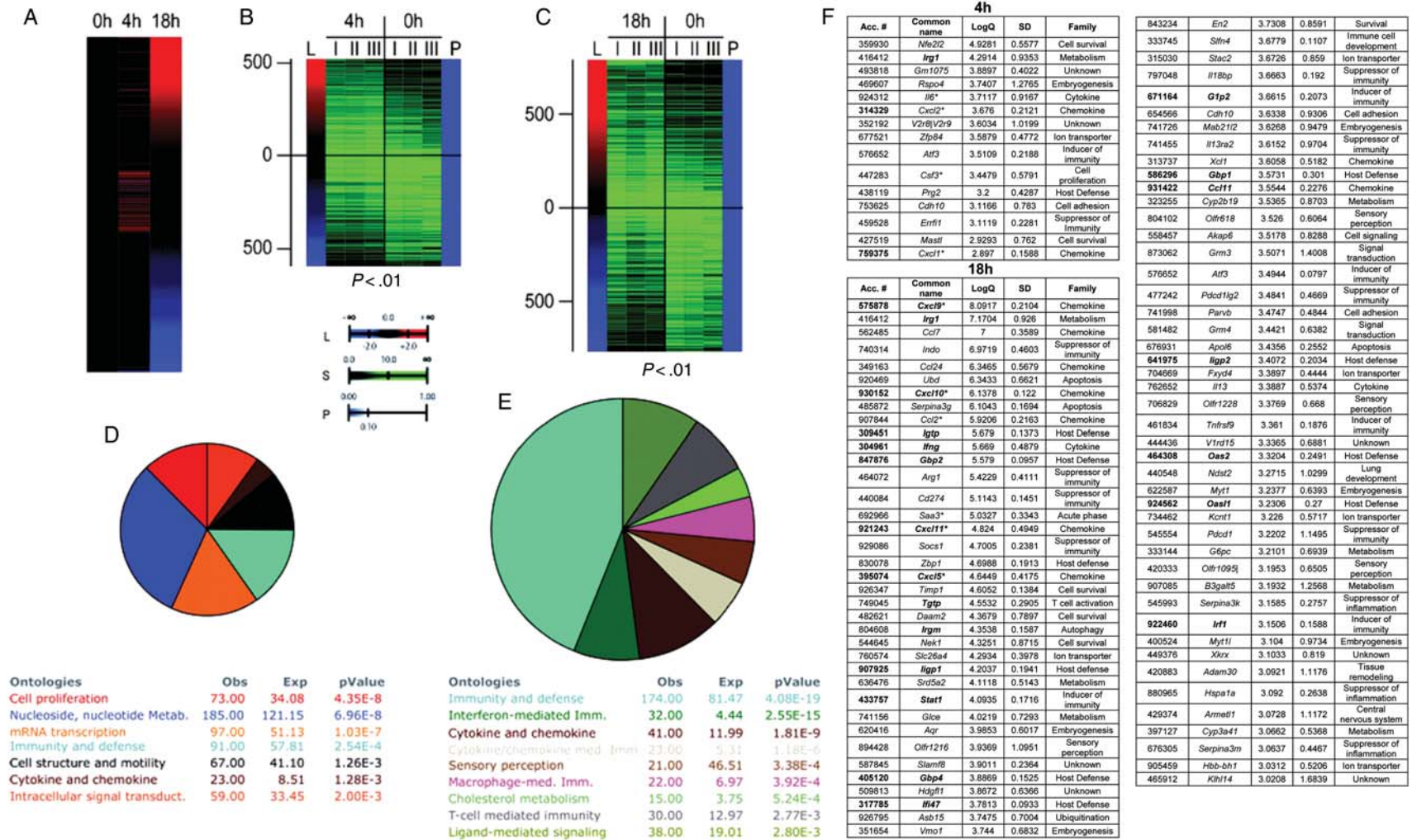


Figure 6. Analysis of gene expression in the lungs of mock and α -GalCer-treated mice. Mice were either treated or not with α -GalCer for 4 hours or 18 hours after total RNA from the lungs was extracted and analyzed. Transcripts isolated from the lungs were analyzed by whole-genome microarray. (A) Kinetic analysis of transcriptomic profiles recorded at 0 hour, 4 hours, and 18 hours. A heatmap of logarithmic base 2 fold-changes (log Q) at the indicated time-points is shown for all genes that are significantly (fold-change z-test with positive False Discovery Rate correction (pFDR) corrected post hoc $P < .01$) differentially expressed from base-line at least at one time point. Differences in relative levels of gene expression are indicated in colours, where red indicates up-regulation and blue indicates down-regulation. (B and C) Heatmap of the subtraction profile 4 hours vs 0 (B) and 18 hours vs 0 hour (C) of the biological triplicate recordings showing the statistically significantly regulated genes ($P < .01$). (L = log Q, P = post hoc P value, S = relative signal). (D and E) Gene ontology enrichment analysis 4 hours or 18 hours vs 0 hour (Binominal distribution, Bonferroni corrected). Diagrams are drawn to size of the number of statistically significantly regulated genes. One representative experiment of 2 performed ($n = 6$) is shown. (F) Genes are ordered based on fold induction relative to mice inoculated with vehicle alone at 4 hours and 18 hours ($P < .001$). Genes whose expression are up-regulated at least 8 times are indicated (Log Q > 3). IFN-dependent genes are in bold and IL-17-related genes are indicated with an asterisk.

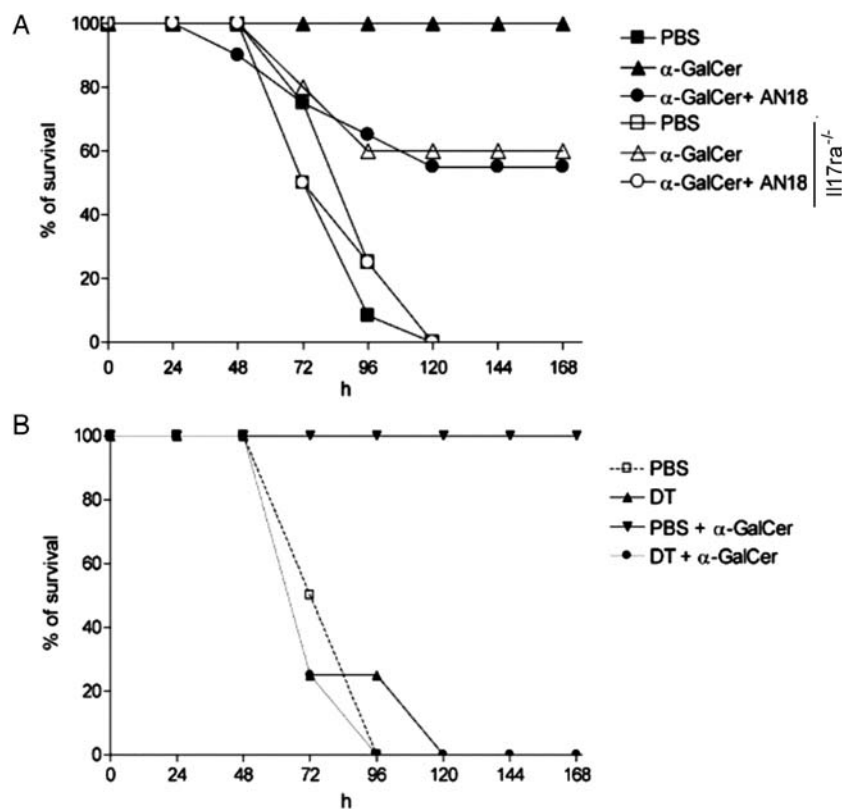


Figure 7. Role of IFN- γ , IL-17 and respiratory DCs in the α -GalCer-mediated protection against *Streptococcus pneumoniae* lethal challenge. (A) One hour before vehicle or α -GalCer treatment, recipient WT or *IL-17Ra*^{-/-} mice were injected with the anti-IFN- γ or the isotype control mAb (100 μ g). Animals were infected with *S. pneumoniae* 24 hours later. Survival curves are shown ($n=7-12$, at least 2 independent experiments). Log-rank test for comparisons of Kaplan-Meier survival curves indicated a significant decrease ($P<.05$) in the survival of (1) α -GalCer treated WT mice injected with the anti-IFN- γ Ab compared to α -GalCer treated isotype-injected mice, (2) α -GalCer treated *IL-17Ra*^{-/-} mice compared to α -GalCer treated WT mice (3) α -GalCer treated *IL-17Ra*^{-/-} mice treated with the anti-IFN- γ Ab, compared with α -GalCer-treated *IL-17Ra*^{-/-} mice treated with the isotype control. (B) Transgenic CD11c.DTR mice were injected with PBS or DT 24 hours before α -GalCer or PBS inoculation. Survival curves are shown ($n=6$, 2 independent experiments). Log-rank test for comparisons of Kaplan-Meier survival curves indicated a significant increase ($P<.001$) in the mortality of DT vs PBS treated α -GalCer inoculated mice. DT treatment had no effect in WT animals (not shown).

This cannot be explained by a delayed uptake of α -GalCer by APCs, because as is the case for splenic DCs after intravenous delivery [15], α -GalCer is rapidly picked up by respiratory APC subsets. It is more likely that the preferential location of iNKT cells in the lung microvasculature, but not in the interstitial spaces where APCs preferentially reside [39, 40], is responsible for this delayed response. In the lung, it is not clear how iNKT cells become activated in response to mucosal delivery of α -GalCer. Two recent reports showed that respiratory DCs have the potential to activate iNKT cells in vitro, although CD103⁺ DC and CD11b^{high} DC were not discriminated in these studies [39, 41]. Using CD11c-DTR mice, we showed that DCs, but not macrophages, mediated the activation of pulmonary iNKT cells in vivo. Lung macrophages, particularly alveolar macrophages, express CD1d and take-up α -GalCer in vivo. However, they display a weak capacity to activate primary iNKT cells, but not the iNKT cell hybridoma DN32.D3. Activation of primary iNKT cells, unlike iNKT

hybridomas, depends on not only CD1d/Ag-mediated TCR triggering, but also cofactors produced by APC. Thus, the reduced role of macrophages in iNKT cell activation in vivo can be explained, at least in part, by their inability to deliver appropriate signals to iNKT cells. Despite a remaining population of CD11b^{high} DCs in DT-treated CD11c-DTR mice, α -GalCer failed to activate lung iNKT cells, suggesting that CD103⁺ DCs are the major players in iNKT cell stimulation. Functional differences between these DC subsets have clearly been described [33, 42, 43]. However, our data indicated no difference between the two DC subsets to express CD1d, to incorporate α -GalCer in vivo, or to activate iNKT cells in vitro. It is possible that the anatomical location of CD103⁺ DCs, close to the airway epithelium and in the luminal and parenchymal sides of the vascular wall [33], and their potent migratory properties [42, 43] play an important role in iNKT cell activation in vivo.

Inoculation of α -GalCer induced protection against a lethal *S. pneumoniae* challenge. Protection against mortality was

attributable to control of bacterial growth in the alveolar spaces, and this was associated with a strong influx of neutrophils into the BALs. Depletion experiments indicated that neutrophils are crucial in bacterial clearance. iNKT cells are known to drive macrophage activation [44, 45], and macrophages are known to cooperate with neutrophils to promote protective responses in some circumstances. However, after α -GalCer administration, macrophages were dispensable in neutrophil-mediated clearance of *S. pneumoniae*. The mechanism by which iNKT cells promote anti-streptococcal effects through neutrophils is unknown. To address this issue, we asked how α -GalCer influenced overall transcriptional responses in the lungs. We showed for the first time the mucosal gene signature of α -GalCer. A significant enrichment of ISGs and, to a lesser extent, genes regulated by IL-17 was revealed. Among ISGs, numerous chemokine (*Cxcl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*) and IFN- γ -inducible guanosine triphosphatase (GTPase) transcripts were up-regulated. Although the majority of ISGs do not yet have any assigned function, some clearly play a critical role in host defence against bacteria through a variety of complementary mechanisms, including cell recruitment, bactericidal activity, oxidative burst, and autophagy [46, 47]. Among the GTPases induced by α -GalCer, it is possible that members of the guanylate-binding protein (*Gbp1*, *Gbp2*, *Gbp4*) or immunity-related GTPase family (*Tgtp*, *Irgm*) play a role in *S. pneumoniae* clearance. Nakamatsu et al. have reported that α -GalCer triggers innate, IFN- γ -dependent mechanisms leading to accelerated clearance of *S. pneumoniae* serotype 3 [38]. Our data, using *S. pneumoniae* serotype 1, confirm this finding, because the neutralizing anti-IFN- γ Ab reduced the efficacy of α -GalCer by half. Moreover, the lack of IL-17 signalling decreased the beneficial effect of α -GalCer treatment to a similar extent. Of note, when both signalling pathways were abrogated, α -GalCer failed to protect against mortality. This indicates that IFN- γ and IL-17 function cooperatively but in an independent manner to control *S. pneumoniae* infection in response to α -GalCer. IL-17 has recently been shown to play a part in protection against *S. pneumoniae* [48]. Our current study shows for the first time that the dual activation of the IFN- γ and IL-17 pathways confers protection against *S. pneumoniae*. Although it is likely that the protective effect of IFN- γ is attributable to ISGs, the mechanisms by which IL-17 participates in protection are still unknown. After α -GalCer stimulation, IL-17 strongly participates in neutrophil recruitment in the lungs through its receptor IL-17Ra (not shown). This is in line with previous studies showing that IL-17 production by iNKT cells mediates the neutrophil influx into the lungs [11, 49]. Because no IL-17 targeted effector genes (ie, antimicrobial peptides) were detected in our transcriptomic analysis, with the exception of *defensin 8* ($3 > \log Q > 2$), it is likely that the main action of IL-17 in protection is through neutrophil mobilization and activation,

such as enhancement of phagocytic activity, a process leading to *S. pneumoniae* killing.

To conclude, our results show for the first time, that after α -GalCer delivery, respiratory DCs, probably CD103⁺, are critical in the primary activation of pulmonary iNKT cells. The understanding of the mechanisms leading to α -GalCer-mediated neutrophil effector functions and the role played by ISGs in the control of *S. pneumoniae* should be of interest in the design of new immuno-activators able to control a lethal *S. pneumoniae* infection.

Notes

Acknowledgments. We thank the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Facility, for supplying CD1d tetramers; Dr. T. Camou, for the gift of the *S. pneumoniae* serotype 1 clinical isolate E1586; Drs. T. Nakayama and M. Taniguchi, for the gift of *Ja18^{-/-}* C57BL/6 mice; Dr. A. Bendelac and Dr. F. Sebane, for the gift of the NKT cell hybridoma DN32.D3 and the CD11c-DTR mice, respectively; J. Peschon, for the gift of the *IL-17Ra^{-/-}* mice; and Dr. R. Pierce, for the proofreading of the manuscript.

Financial support. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the CNRS, the University of Lille Nord de France, the Institut Pasteur de Lille, the évaluation-orientation de la coopération scientifique (ECOS)-Sud [U08S02], and the Institut National du Cancer (INCa, projets libres 2008) under reference R08046EE/RPT08003EEA and l'Agence Nationale de la recherche (ANR) under reference ANR-08-MIEN-021-01 [R08066ES RPV08036ESA]. SI, CP and EMF were recipients of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et Technique (SI and EMF) and the Conseil Régional Nord Pas de Calais/Inserm (CP). CF and JCS are supported by Inserm and BR, AB, and FT by the CNRS.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Klugman KP, Feldman C. *Streptococcus pneumoniae* respiratory tract infections. *Curr Opin Infect Dis* **2001**; 14:173–9.
- van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **2009**; 374:1543–56.
- Rial A, Lens D, Betancor L, Benkiel H, Silva JS, Chabalgoity JA. Intranasal immunization with a colloid-formulated bacterial extract induces an acute inflammatory response in the lungs and elicits specific immune responses. *Infect Immun* **2004**; 72:2679–88.
- Munoz N, Van Maele L, Marques JM, Rial A, Sirard JC, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun* **2010**; 78:4226–33.
- Clement CG, Evans SE, Evans CM, et al. Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med* **2008**; 177:1322–30.
- Barral DC, Brenner MB. CD1d antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol* **2007**; 7:929–41.
- Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* **2007**; 25:297–336.
- Cerundolo V, Silk JD, Masri SH, Salio M. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol* **2009**; 9:28–38.
- Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* **2004**; 114:1379–88.
- Van Kaer L, Joyce S. Innate immunity: NKT cells in the spotlight. *Curr Biol* **2005**; 15:R429–31.

11. Michel ML, Keller AC, Paget C, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* **2007**; 204:995–1001.
12. Coquet JM, Chakravarti S, Kyriarissoudis K, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**; 105:11287–92.
13. Cohen NR, Garg S, Brenner MB. Antigen presentation by CD1 lipids, T cells, and NKT cells in microbial immunity. *Adv Immunol* **2009**; 102:1–94.
14. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part II. *Clin Infect Dis* **2000**; 30:122–40.
15. Bialecki E, Paget C, Fontaine J, Capron M, Trottein F, Faveeuw C. Role of marginal zone B lymphocytes in invariant NKT cell activation. *J Immunol* **2009**; 182:6105–13.
16. van Rooijen N, van Nieuwmegen R. Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res* **1984**; 238:355–8.
17. Cui J, Shin T, Kawano T, et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* **1997**; 278:1623–6.
18. Jung S, Unutmaz D, Wong P, et al. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **2002**; 17:211–20.
19. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* **2001**; 194:519–27.
20. Paget C, Ivanov S, Fontaine J, et al. Potential role of invariant NKT cells in the control of pulmonary inflammation and CD8+ T cell response during acute influenza A virus H3N2 pneumonia. *J Immunol* **2011**; 186:5590–602.
21. Paget C, Mallevaey T, Speak AO, et al. Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids. *Immunity* **2007**; 27:597–609.
22. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Bratkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* **1995**; 268:863–5.
23. Zemlickova H, Crisostomo MI, Brandileone MC, et al. Serotypes and clonal types of penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in five Latin American countries. *Microb Drug Resist* **2005**; 11:195–204.
24. Marques JM, Rial A, Munoz N, et al. Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN-gamma-mediated immunity. *Immunobiology* **2012**; 78:420–29.
25. Van Maele L, Carnoy C, Cayet D, et al. TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *J Immunol* **2010**; 185:1177–85.
26. Jacquelin B, Mayau V, Targat B, et al. Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J Clin Invest* **2009**; 119:3544–55.
27. Wilhelm E, Kornete M, Targat B, et al. TAF6delta orchestrates an apoptotic transcriptome profile and interacts functionally with p53. *BMC Mol Biol* **2010**; 11:10.
28. Chiba A, Dascher CC, Besra GS, Brenner MB. Rapid NKT cell responses are self-terminating during the course of microbial infection. *J Immunol* **2008**; 181:2292–302.
29. Kim HY, Kim S, Chung DH. FcgammaRIII engagement provides activating signals to NKT cells in antibody-induced joint inflammation. *J Clin Invest* **2006**; 116:2484–92.
30. Hobbs JA, Cho S, Roberts TJ, et al. Selective loss of natural killer T cells by apoptosis following infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **2001**; 75:10746–54.
31. Lin Y, Roberts TJ, Wang CR, Cho S, Bratkiewicz RR. Long-term loss of canonical NKT cells following an acute virus infection. *Eur J Immunol* **2005**; 35:879–89.
32. del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Kremmer E, Forster R. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **2007**; 178:6861–6.
33. Sung SS, Fu SM, Rose CE Jr, Gaskin F, Ju ST, Beaty SR. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol* **2006**; 176:2161–72.
34. Garvy BA, Harmsen AG. The importance of neutrophils in resistance to pneumococcal pneumonia in adult and neonatal mice. *Inflammation* **1996**; 20:499–512.
35. Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* **1990**; 141:471–501.
36. Standiford TJ, Kunkel SL, Greenberger MJ, Laichalk LL, Strieter RM. Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia. *J Leukoc Biol* **1996**; 59:24–8.
37. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, et al. Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol* **2003**; 33:3322–30.
38. Nakamatsu M, Yamamoto N, Hatta M, et al. Role of interferon-gamma in Valpha14+ natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes Infect* **2007**; 9:364–74.
39. Scanlon ST, Thomas SY, Ferreira CM, et al. Airborne lipid antigens mobilize resident intravascular NKT cells to induce allergic airway inflammation. *J Exp Med* **2011**; 208:2113–24.
40. Barletta KE, Cagnina RE, Wallace KL, Ramos SI, Mehrad B, Linden J. Leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury. *J Immunol Methods* **2012**; 375:100–110.
41. Courtney AN, Thapa P, Singh S, Wishahy AM, Zhou D, Sastry J. Intranasal but not intravenous delivery of the adjuvant alpha-galactosylceramide permits repeated stimulation of natural killer T cells in the lung. *Eur J Immunol* **2011**; 41:3312–22.
42. Lambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* **2009**; 31:412–24.
43. Condon TV, Sawyer RT, Fenton MJ, Riches DW. Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface. *J Leukoc Biol* **2011**; 90:883–95.
44. Kim EY, Battaile JT, Patel AC, et al. Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat Med* **2008**; 14:633–40.
45. Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, Exley M, et al. CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat Med* **2002**; 8:588–93.
46. Kim BH, Shenoy AR, Kumar P, Das R, Tiwari S, MacMicking JD. A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science* **2011**; 332:717–21.
47. Martens S, Howard J. The interferon-inducible GTPases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2006**; 22:559–89.
48. Lu YJ, Gross J, Bogaert D, et al. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog* **2008**; 4:e1000159.
49. Lee KA, Kang MH, Lee YS, et al. A distinct subset of natural killer T cells produces IL-17, contributing to airway infiltration of neutrophils but not to airway hyperreactivity. *Cell Immunol* **2008**; 251:50–5.