



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN BIOQUIMICA

Estudio del rol de IL-17A en la respuesta
inmune frente a la colonización por
S. pneumoniae.

Bach. María Paula Céspedes

Supervisor

Dr. Juan Martín Marqués
Profesor Adjunto

Co-Supervisora

Dra. Analía Rial
Asistente

Departamento de Desarrollo Biotecnológico

Instituto de Higiene, Facultad de Medicina

Montevideo, Uruguay

Diciembre 2013

“Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad.”

I. Louis Pasteur

Gracias a todos los que me ayudaron a construir el presente que hoy estoy viviendo...

A los incondicionales... mis amigos del alma. Gracias por sostenerme, por darme para adelante cuando todo parecía ir marcha atrás y por acelerar mi marcha cuando el camino se despejaba.

A los que no están... Papá... Me parece ver tu sonrisa y siento tu abrazo desde donde estés. Abu, Lili y mi amada Yuli, Gracias!

A mis primos, Gonza y Lu, por haberme acompañado en cada paso que di, gracias por ayudarme en la ardua tarea de no perder el foco. Los amo con toda mi alma.

Gracias a mi tutor, quien confió en mí, gracias por invitarme a formar parte de tu grupo de investigación... Gracias por inducirme a razonar como científica, ayudándome a elaborar mis propias hipótesis. Gracias por tu paciencia al enseñarme a manipular animales de laboratorio, contemplando mi respeto por los mismos... fue un gran logro en lo que a mí respecta.

A mi co- tutora... qué decir... como docente, me has transmitido tu sabiduría y el manejo dentro del laboratorio de una manera clara, absolutamente natural, dejando grabado cada concepto en mí. Fuiste una gran receptora frente a todas las dudas que me surgieron, enseñándome a resolver cada una de ellas. Y como ser humano... gracias por tu calidez, por contenerme en momentos difíciles que nada tenían que ver con la ciencia. Gracias por ponerle esa pizca de ternura a las mañanas al contar anécdotas de tus niños... Gracias por el día a día.

A mis compañeros de LVR!!! Por la buena onda, por las risas, las salidas... por el apoyo! Esto incluye a los grado 2, 3 y a Alejandro quienes solo han tenido palabras de aliento para conmigo y me han ayudado a crecer profesionalmente compartiendo sus críticas constructivas con respecto a mi desempeño en el laboratorio así como también sobre éste trabajo de tesis.

A mis tres soles... Fiona, Milli y Chispa... por hacer mi vida más feliz.

Y por último... a mi tesoro más preciado, mi gran compañera de vida, mi ejemplo, mi máquina impulsora... gracias Ma!

Sos símbolo de lucha, de tenacidad, de que nada es imposible... de que los límites solo los pone nuestra mente... El hecho de tenerte como mamá, ya me hace una persona con suerte! Te adoro con toda mi alma... Gracias!

CONTENIDO

1. <i>Louis Pasteur</i>	2
1. Resumen	5
2. Abreviaturas.....	6
3. Introducción.....	7
3.1. Incidencia epidemiológica de <i>S. pneumoniae</i> a nivel regional y mundial.....	7
3.2. Vacunas antineumocóccicas.....	8
3.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i> : agente etiológico	11
3.3.1. Taxonomía.....	11
3.3.2. Descripción microbiológica.....	11
3.4. Factores de virulencia y mecanismos de acción.....	12
3.4.1. Cápsula polisacáridica.....	15
3.4.2. Pared celular.....	15
3.4.3. Proteínas involucradas en la patogénesis de <i>S. pneumoniae</i>	16
3.4.4. Pili.....	20
3.5. Colonización Nasofaríngea	21
3.6. Respuesta del hospedador contra la colonización por neumococo.....	22
3.6.1. Respuesta innata del hospedador durante la colonización.....	22
3.6.2. Respuesta adaptativa del hospedador durante la colonización.....	25
3.7. Células Th17 productoras de IL-17A.....	26
3.8. Th17 e IL-17 en la respuesta inmune contra <i>Streptococcus pneumoniae</i>	30
4. Objetivos.....	33
4.1. Objetivo General.....	33
4.2. Objetivos específicos.....	33
5. Materiales y Métodos	34
5.1. Cepas Bacterianas.....	34

5.1.1. Crecimiento y mantenimiento de las cepas.....	34
5.2. Ratones.....	35
5.3. Infección subletal.....	36
5.3.1. Preparación del inóculo para la infección.....	36
5.3.2. Infección intranasal y obtención de muestras.....	36
5.4. Realización de lavado nasofaríngeo (NAL).....	37
5.5. Carga bacteriana en NAL.....	37
5.6. Detección de anticuerpos séricos anti polisacárido 1.....	38
5.7. Producción de anticuerpos anti-CD4.....	38
5.8. Depleción de células CD4 ⁺	39
5.9. Complementación de animales Il17a ^{-/-} con rIL-17A.....	40
5.10. Análisis Estadístico.....	40
6. Resultados.....	41
6.1. Determinación de carga bacteriana en NAL.....	41
6.1.1. <i>S. pneumoniae</i> serotipo 1.....	41
6.1.2. <i>S. pneumoniae</i> serotipos 3, 14 y 23F.....	42
6.2. Anticuerpos específicos contra polisacárido 1 en animales salvajes e Il17a ^{-/-} colonizados.....	45
6.3. Anticuerpos específicos contra polisacárido 1 en ausencia de TCD4.....	47
6.4. Restablecimiento del fenotipo salvaje en animales deficientes en IL17a.....	50
7. Discusión y conclusiones.....	52
8. Referencias bibliográficas.....	58

1. Resumen

Streptococcus pneumoniae es uno de los principales patógenos respiratorios humanos con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. Para estudiar el rol que cumple IL-17A en el modelo de colonización, realizamos estudios comparativos en ratones salvajes y ratones deficientes en *Il17a*. Se administraron vía intranasal dosis colonizantes de neumococo serotipo 1, 3, 14 y 23F, para luego sacrificar, a distintos tiempos, los animales colonizados con el fin de estudiar la cinética de colonización. Los ratones salvajes colonizados con serotipo 1 eliminaron la colonización tres semanas tras el desafío mientras que los ratones *Il17a*^{-/-} presentaron colonización incluso luego de los 4 meses. La cinética de colonización por el serotipo 3 mostró que también este serotipo tiene una persistencia a largo plazo en el tracto nasofaríngeo de animales *Il17a*^{-/-}. Estudios preliminares realizados con serotipos 23F y 14 mostraron resultados similares. Paralelamente a los estudios de colonización, se recolectaron muestras de suero de ambos grupos de ratones con el fin de realizar estudios de respuesta humoral contra el polisacárido capsular serotipo 1. Los resultados obtenidos a través de ensayos de ELISA no permitieron determinar una dependencia entre la IL-17A y la generación de anticuerpos primarios como sí lo había observado nuestro grupo de investigación en la respuesta secundaria de anticuerpos en un modelo de protección contra neumonía aguda. A su vez, se evaluó el rol de las células CD4⁺ en la producción de los anticuerpos específicos contra el polisacárido capsular 1. Por otro lado, se realizaron ensayos preliminares con el objetivo de restablecer el fenotipo salvaje en los animales deficientes para la *Il17a*, mediante el agregado exógeno de la citoquina recombinante. Finalmente, nuestros resultados indican que la IL-17A es fundamental para una correcta eliminación de la colonización.

2. Abreviaturas

AcMo	Anticuerpos monoclonales
CEV	Certificado Esquema de Vacunación
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
ENI	Enfermedad Neumocócica Invasiva
LTA	Acido Lipoteicoico
MHC II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II
NAL	Lavado Nasofaríngeo
PCV	Vacuna antineumocócica conjugada
Pn1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> serotipo 1
PnPS1	Polisacárido capsular de neumococo serotipo 1
PS-C	Polisacárido C de la pared celular de neumococo
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SIREVA	Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Bacterianos Responsables de Neumonía y Meningitis
TA	Acido Teicoico
TLR	Receptor tipo Toll
ZPS	Plisacárido Zwitteriónico

3. Introducción

3.1. Incidencia epidemiológica de *S. pneumoniae* a nivel regional y mundial.

Streptococcus pneumoniae (neumococo) es una bacteria gram-positiva que tiene un rol preponderante en la causalidad de las infecciones respiratorias prevalentes de la comunidad: es el patógeno aislado con mayor frecuencia en infecciones focales, como otitis media aguda y sinusitis y el más frecuentemente relacionado con las infecciones invasivas en niños menores de 5 años. (Washington, Sanitaria, & Internacionales, 2011.)

Las infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*, constituyen un serio problema de salud pública en países en desarrollo debido a las elevadas tasas de morbi-mortalidad que presentan. Se estima que, anualmente y sólo en Latinoamérica, neumococo es responsable de 1.3 millones de infecciones agudas del oído que pueden derivar en sordera, 327.000 casos de neumonía, 1.229 casos de sepsis y 4.000 casos de meningitis. (Washington *et al*, 2011b)

Los grupos de riesgo para las enfermedades neumocócicas incluyen niños menores de 5 años, personas adultas mayores de 65 años y personas inmunocomprometidas, específicamente aquellas que poseen defectos en sus linfocitos B, deficiencias en el sistema de complemento, esplenectomía o mal funcionamiento del bazo, defectos en el receptor de interleuquina-1 o pacientes con HIV (Bogaert *et al*, 2010).

Aunque la incidencia de neumococo no excluye a los adultos, en éstos los afectados por enfermedad neumocócica invasiva (ENI) solo representan el 30%, mientras que en los niños, la afección llega hasta el 60%. Para América Latina, África y el Pacífico Asiático la neumonía por neumococo es una de las preocupaciones pediátricas más comunes (Who, 2007). Considerando Uruguay y Argentina, los datos muestran que neumococo es la causa bacteriana más frecuente de neumonía y meningitis en pediatría y es la principal causa de sepsis después del periodo neonatal ([Http://www.msal.gov.ar/](http://www.msal.gov.ar/)).

En suma, se estima que por año mueren 1 millón doscientos mil niños menores de 5 años a causa de ENI, considerando tan sólo los países en vías de desarrollo y la cifra sigue en aumento (Who, 2007).

Por otro lado, otro problema que ha complicado el manejo de las infecciones neumocóccicas es el incremento de la resistencia de *S. pneumoniae* a la penicilina y otros antibióticos. En 1967 se informó del primer aislamiento de *S. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a penicilina. Si bien la resistencia antibiótica de neumococo varía geográficamente, hoy por hoy representa un reto para la comunidad médica y la salud pública a nivel mundial. Es por este motivo que existen muchos grupos de investigación dedicados a determinar la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *S. pneumoniae* y por ende generar fármacos eficaces contra este patógeno.

3.2. Vacunas antineumocóccicas.

El principal factor de virulencia de *S. pneumoniae* es la cápsula externa de naturaleza polisacáridica. La misma está conformada por unidades repetitivas de oligosacáridos cuya composición y estructura son determinantes esenciales para su antigenicidad. Su diversidad permite la diferenciación de esta única especie en 94 serotipos.

Sin embargo, un número relativamente limitado de serotipos (15 a 20) son los causantes de la mayoría de las infecciones neumocóccicas. Diferentes estudios sobre la vigilancia de serotipos capsulares, muestran una distribución heterogénea según la región geográfica analizada, lo que crea un problema en la formulación de vacunas que puedan proteger potencialmente a toda la población. (Microbiología, 2012). A su vez, datos epidemiológicos muestran diferencias entre los serotipos de *S. pneumoniae* encontrados en países desarrollados y en vías de desarrollo observándose, además, diferencias entre los que predominan en Latinoamérica. De acuerdo a datos aportados por la red de laboratorios de Latinoamérica (SIREVA) en el período 2000-2005, el serotipo 14 fue el más prevalente dentro de los aislamientos obtenidos en Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México y Uruguay, seguidos por los serotipos 6B, 5 y 1 (Washington *et al*, 2011a). Sin embargo, actualmente en nuestro país, los serotipos más frecuentes son el 1 seguido por el 12 F y el 3 en igual medida

y con menor porcentaje el 24A y 11A para menores de 5 años. En la población mayor a 5 años se suman los serotipos 5 y 7F (Washington *et al*, 2011a).

En la actualidad existen tres vacunas comercialmente disponibles contra neumococo. La vacuna polisacáridica 23-valente y las vacunas conjugadas 7- (PCV-7) y 13-valente (PCV-13).

La vacuna 23-valente incluye polisacáridos purificados de 23 serotipos distintos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10, 11, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 19F, 20, 22F, 23F y 33F). Esta vacuna protege contra la enfermedad neumocócica invasiva en adultos pero no previene la colonización del tracto nasofaríngeo ni genera inmunidad protectora duradera en niños menores de 2 años o en pacientes inmunocomprometidos (Käyhty *et al*, 2006; van der Poll & Opal, 2009; Bjarnarson *et al*, 2005). La necesidad de superar las limitaciones de la vacuna 23-valente condujo al desarrollo de las vacunas neumocócicas conjugadas, en las que los polisacáridos capsulares son conjugados covalentemente a una proteína carrier o transportadora. La unión covalente del antígeno polisacáridico (T-independiente) al carrier induce una mayor inmunogenicidad y le confiere carácter T-dependiente. En el caso de la vacuna conjugada heptavalente, la misma contiene los antígenos capsulares de neumococo de 7 serotipos (4, 6B,9V,14,18C,19C y 23F), mientras que la 13-valente conjugada agrega los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A (Quian, 2010). Al presentar los antígenos capsulares al sistema inmune de una manera más inmunogénica, se ha visto que la PCV-7 genera protección contra la infección sistémica y previene la colonización nasofaríngea reduciendo la transmisión en la comunidad (Käyhty *et al*, 2006; van der Poll & Opal, 2009). Nuestro país incorporó, en 2008, la PCV-7 al Certificado Esquema de Vacunación (CEV). Al analizar los datos de SIREVA II a partir del 2006, se observa una marcada disminución de la prevalencia del serotipo 14, incluido en la vacuna heptavalente (Figura 1). Por lo tanto, es posible medir el impacto de los esquemas de vacunación siempre y cuando las autoridades del ministerio de salud pública (MSP) de cada país generen conciencia sobre la importancia de la vacunación y sus controles pertinentes (Washington *et al*, 2011a; Hortal *et al*, 2012). La vacuna PCV-13 fue licenciada en 2010 por la FDA (EE.UU) y en ese mismo año las autoridades sanitarias de Uruguay decidieron sustituir la anterior por esta presentación. Esta nueva vacuna, Prevenar® 13, al incorporar seis antígenos capsulares adicionales alcanza una cobertura del 90% de los serotipos circulantes en Uruguay (Quian, 2010). Aún no hay datos publicados que muestren

el impacto de esta nueva vacuna en la prevalencia de los serotipos circulantes en nuestra población.

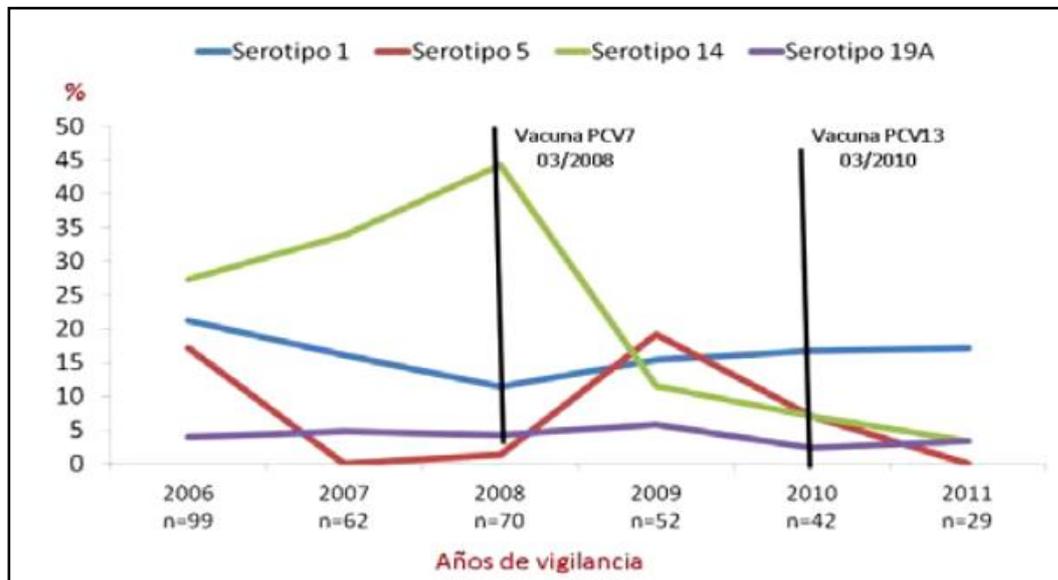


Figura 1. Evolución de los serotipos 1, 5, 14 y 19A de *S. pneumoniae* de 2006 a 2011, Uruguay. En el eje y se observan los porcentajes de ENIs causados por los serotipos 1,5,14 y 19A en niños menores de 5 años en Uruguay. Luego de la implementación del esquema de vacunación se observa una marcada disminución en el % de aislamiento del serotipo 14. Gráfico extraído del informe SIREVA 2011 (Washington *et al*, 2011a)

La protección generada por cualquiera de estas vacunas (conjugadas o polisacáridicas) es serotipo-específica, por lo que su eficacia depende de los serotipos prevalentes en una población dada.

Si bien las vacunas conjugadas a proteínas han demostrado ser muy eficaces a la hora de proteger a la población de los serotipos por los cuales están compuestas, presentan algunas desventajas. Por un lado, son difíciles de producir, requieren refrigeración, múltiples inyecciones y no incluyen muchos de los serotipos observados en los países en desarrollo (Malley, 2010).

Debe considerarse además que se ha observado el reemplazo de los serotipos representados en las vacunas conjugadas por otros ausentes en éstas a nivel de colonización nasofaríngea en las personas vacunadas, situación que podría llevar al fracaso de las mismas (Mehtälä *et al*, 2013; Käyhty *et al*, 2006). Además, el neumococo es capaz de recombinarse genéticamente de forma rápida y por tanto puede cambiar genes de biosíntesis de

polisacárido capsular de un serotipo por otro, lo que hace que estas vacunas puedan tener una eficacia transitoria (Croucher *et al*, 2011). Por otra parte, el alto costo de la PCV-7 y ahora de la PCV-13 significa un obstáculo importante para su incorporación en programas de inmunización masiva en países en vías desarrollo (Cockeran *et al*, 2005). A pesar del avance que representan estas vacunas en la profilaxis contra neumococo, en la actualidad ninguna de ellas representa una solución definitiva para la prevención de la enfermedad neumocócica. Por tanto, la búsqueda de nuevas vacunas contra *S. pneumoniae* es todavía una prioridad a nivel mundial. A esto se suma la constante aparición de cepas resistentes a antibióticos que limitan la eficacia de los tratamientos (Croucher *et al*. 2011).

3.3. *Streptococcus pneumoniae*: agente etiológico

3.3.1. Taxonomía

Streptococcus pneumoniae pertenece al género *Streptococcus* de la familia *Streptococcaceae*. El género *Streptococcus* está conformado por cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativa y citocromo-oxidasa negativa. Los estreptococos clínicamente relevantes son homofermentadores y el producto final de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico. (MPS, 2011)

3.3.2. Descripción microbiológica.

Los neumococos son bacterias Gram positivas, encapsuladas, con morfología de diplococos lanceolados, con 0,5 a 1,25 μm de diámetro, arregladas en pares o en cadenas cortas (división en un plano), inmóvil, no formadora de esporas; típicamente crecen de modo difuso en caldo con suero y requieren medios complejos para su desarrollo (Lindberg B, Lindqvist B, Lönngren J, 1980). El cultivo en agar sangre de carnero presenta colonias lisas, pequeñas, brillantes, circundadas por un halo verde de α hemólisis. Son anaerobios facultativos y algunos aislamientos clínicos son exigentes en CO_2 . Neumococo pierde su viabilidad a 60°C por 30 minutos, se lisa fácilmente, es soluble en bilis, sensible a la optoquina (Prado, 2001).

3.4. Factores de virulencia y mecanismos de acción.

Para lograr una colonización exitosa, neumococo tiene la necesidad de adherirse, persistir, multiplicarse e invadir el tejido respiratorio. Este es un colonizador muy eficaz y ha desarrollado mecanismos para "silenciosamente" co-existir con el hospedador en la nasofaringe.

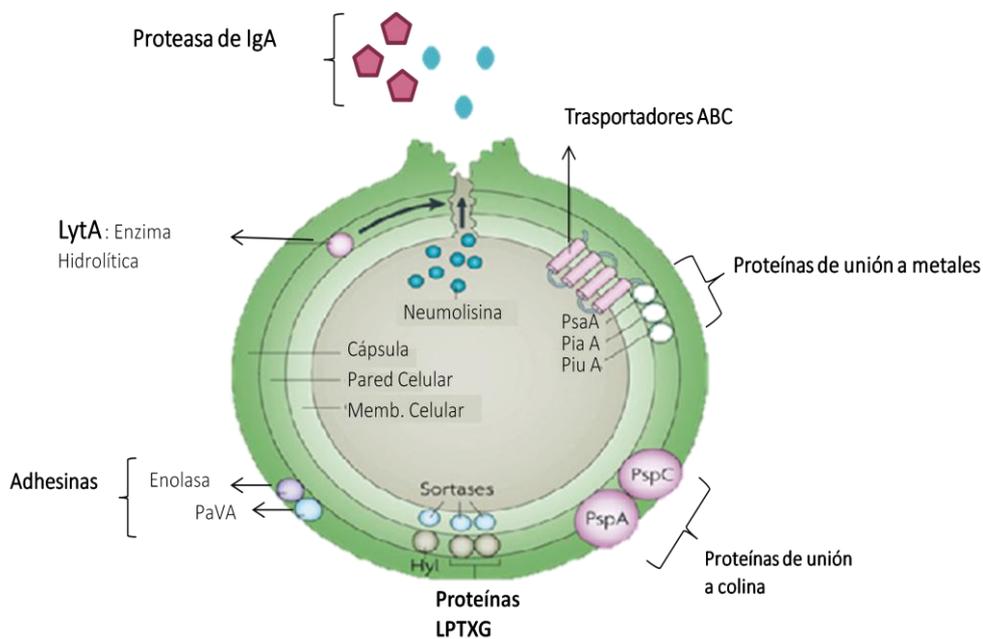


Figura 2. Esquema de distribución de factores de virulencia en *S. pneumoniae*: cápsula, pared celular; proteínas de unión a colina; proteínas de superficie A y C (PspA y PspC); proteínas LPXTG ancladas a la pared celular; hialuronatoliasa (Hyl); Proteína de adhesión y virulencia A (PvaA); enolasa (Eno); neumolisina; autolisina A (LytA); proteína de unión de metales A (PsaA); proteína de adquisición de hierro A (PiaA); proteína captadora de hierro A (PiuA). Adaptado de (Kadioglu *et al*, 2008b).

Se ha planteado que una mejor comprensión del papel que desempeñan los factores de virulencia permitirá dilucidar la patogénesis de la infección producida por *S. pneumoniae* lo cual es esencial para el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento y prevención (vacunas) de la enfermedad neumocócica. A su vez, la forma en que los factores de virulencia se distribuyen en las distintas cepas podría ayudar a identificar las asociaciones entre estos factores y los distintos tipos de enfermedad que produce neumococo (Mitchell

AM, 2011). En la figura 2 se muestra la disposición de estos factores en la célula bacteriana y en la Tabla 1 se describen sus principales funciones.

Sin lugar a dudas, el principal factor de virulencia es su cápsula polisacáridica ya que cumple un rol central en la colonización, invasión y diseminación a partir del tracto respiratorio. Sin embargo, ciertas proteínas neumocócicas juegan un importante papel en la patogénesis de la enfermedad, bien como mediadores de la inflamación o bien por ataque directo a los tejidos del huésped (Martner *et al*, 2009).

Mecanismo de acción	
Cápsula	Impide eliminación de la mucosa, actividad antifagocítica, impedimento estérico del complemento y de la unión de inmunoglobulinas a receptores del hospedero
Pili	En la superficie celular impide fagocitosis y promueve la invasión
Acido teicoico	Se une al receptor del factor activador de plaquetas (PAFr), ligando de TLR-2 y actividad proinflamatoria
Fosforilcolina	La fosforilcolina presente en la pared celular interactúa con el factor activador de plaquetas y permite la translocación del neumococo a través del epitelio
Transportadores ABC	Han estado implicados en la virulencia del neumococo Ami y PIP(Ali) son transportadores de oligopéptidos(involucrados en competencia)
Proteínas CBPs	
LytA	NAM-amidasa. Principal autolisina
LytB	N-acetilglucosaminidasa.
LytC	Lisozima. Autolisina a 30°C
Pce	Fosforilcolin esterasa. Hidrolasa de pared celular. Se une a plasminógeno
PspC	Se une al receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIg) en las células epiteliales
PspA	Recientemente se demostró que se une a la cadherina E en las células epiteliales
Proteínas LPTXG	
NanA	Neuramonidasa
Proteasa IgA1	Inactiva la IgA humana y media el incremento de adhesión del neumococo al epitelio
Lipoproteínas	
Psa A	Lipoproteína transportadora de manganeso. Se une a cadherina E
PiuA/PiA	Componentes lipoproteicos de transportadores ABC, adquieren hierro para crecimiento bacteriano y virulencia
Otras proteínas	
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Se une a plasminógeno
PavA	Se une a la fibronectina y esto favorece la unión a las células del huésped
Eno	Se une al plasminógeno y esto favorece la unión a las células del huésped
Neumolisina	Citólisis, ligando de TLR-4, induce ciliostasis, impide estallido respiratorio, activación de complemento y producción de citoquinas y quimioquinas.

Tabla 1. Principales factores de virulencia involucrados en la patogenicidad de *S. pneumoniae*. ABC: cassette de unión a ATP; LytA/B/C: lisozima A/B/C; Pce: se denomina también LytD y CbpE; PspC: proteína de unión a superficie C, se denomina también CbpA, SpsA y PbcA; PspA: proteína de unión a superficie A; proteasa de IgA1: proteasa de la Inmunoglobulina A1 humana; NAM-amidasa: N-acetilmuramil-L-alanina amidasa. (Kadioglu *et al*, 2008a; van der Poll & Opal, 2009; Bogaert *et al*, 2004b)

3.4.1 Cápsula polisacáridica.

La virulencia e invasividad de neumococo varían de acuerdo con los serotipos y depende de la composición química y de la cantidad de polisacárido capsular producido. Estas diferencias determinan la supervivencia de la bacteria en la circulación y las posibilidades de ocasionar enfermedad invasora. Esto es, la capacidad de la bacteria para activar el sistema de complemento y evitar su depósito en la cápsula, y por otra parte la resistencia a la fagocitosis y capacidad para inducir anticuerpos (Bentley *et al*, 2006; Li *et al*, 2013).

A pesar de ser el principal factor de virulencia, aún no es completamente conocido el mecanismo patogénico de la cápsula en el hospedero más allá de que tradicionalmente se dice que la misma es antifagocítica. Por un lado, dado que el polisacárido capsular está, en gran medida, cargado negativamente, inhibe estéricamente la interacción entre los receptores fagocíticos CR3 y Fc gamma con los componentes iC3b y el componente Fc de la IgG, respectivamente. De esta manera, permite que las bacterias permanezcan en el espacio extracelular sin ser fagocitadas. Por otro lado, la cápsula es esencial para la colonización, debido a que impide la remoción de las bacterias mediante el mucus, restringe la autólisis y reduce la exposición a los antibióticos.(Kadioglu *et al*, 2008a; Paterson & Mitchell, 2006; van der Poll & Opal, 2009)

Sin embargo, pese a las estrategias de evasión de neumococo frente al sistema inmune innato, los anticuerpos contra el polisacárido capsular protegen al huésped contra el serotipo homólogo mediante la opsonofagocitosis. A pesar de que la antigenicidad de la cápsula es tipo-específica al compartir polisacáridos con otros serotipos, se puede dar la reactividad cruzada. (Bogaert *et al*, 2004a)

3.4.2. Pared celular.

La capa por debajo de la cápsula polisacáridica es la pared celular y consiste en una estructura rígida que rodea la membrana citoplasmática y que está constituida por peptidoglicanos a los que se unen proteínas, hidratos de carbono y lipoproteínas (Bogaert *et al*, 2004a). El peptidoglicano tiene acción antigénica. Asociados a éste se encuentran los ácidos lipoteicoicos que afloran a la superficie y actúan como mediadores de la adherencia a las células epiteliales de la mucosa. La pared celular induce una intensa reacción inflamatoria

que acompaña la infección por neumococo, lo que provoca el reclutamiento de células inflamatorias, la activación del complemento y la producción de citoquinas (Bruyn & van Furth, 1991). En la pared celular también se encuentran los determinantes antigénicos de grupo, como por ejemplo el polisacárido C (Ps-C). Este carbohidrato es el mayor componente estructural de la pared celular de todos los neumococos. Es un polímero de ácido teicoico que contiene fosforilcolina como determinante antigénico mayoritario, siendo ésta la responsable de la interacción de neumococo con la proteína C reactiva. La unión de la proteína C reactiva al polisacárido C, activa el complemento y media la fagocitosis (Kaplan & Volanakis, 1974).

3.4.3. Proteínas involucradas en la patogénesis de *S. pneumoniae*.

3.4.3.1. Neumolisina

La proteína neumolisina (codificada por el gen *ply*) es un factor de virulencia que pertenece a la familia de toxinas formadoras de poros, producidas por más de 20 especies de bacterias grampositivas (Charalambous & Leung, 2012). Es una proteína intracelular por lo que originalmente se creía que sólo se liberaba durante la autólisis, aunque en la actualidad es sabido que es independiente de este proceso (Balachandran *et al*, 2001). Esta toxina se une al colesterol de la membrana celular del huésped y forma poros grandes, de 30 nm de diámetro, mediante la oligomerización de alrededor de 50 monómeros de la toxina (Mitchell AM, 2011). En bajas concentraciones, induce una respuesta pro-inflamatoria en conjunto con la producción de especies reactivas de oxígeno y otros mediadores inflamatorios (Pérez-Dorado *et al*, 2012).

Su papel en la patogénesis de la infección se estudió en modelos animales, en los que se utilizaron cepas mutadas de *S. pneumoniae* donde se interrumpió o eliminó el gen que codifica la toxina. En estos modelos se observó que la ausencia de neumolisina redujo la virulencia del microorganismo en la vías de infección intranasal y sistémica. Asimismo, cuando se inocularon estas cepas mutantes en el pulmón de ratón se detectó no sólo un retraso sino también una disminución en la intensidad de la respuesta inflamatoria y en el reclutamiento celular en respuesta a la infección (en comparación con la provocada por la bacteria salvaje), principalmente a nivel de neutrófilos. También se observó retraso y

disminución en la redistribución de los linfocitos T y B dentro de los bronquiolos inflamados y alrededor de éstos. (Mitchell & Mitchell, 2010)

Recientemente, una variante en el alelo *ply* (*ply4496*) de un linaje hipervirulento del serotipo 1 mostró reducida actividad hemolítica. Utilizando un modelo murino, se observó un mayor recuento bacteriano en sangre en el caso de los animales infectados con la cepa mutante en comparación con los que recibieron la cepa salvaje (D39), lo que sugiere que la reducción en la actividad hemolítica confiere una ventaja de crecimiento en sangre (Harvey *et al*, 2011; Charalambous & Leung, 2012).

En resumen, los principales efectos de la neumolisina incluyen su actividad lítica y de activación del complemento. Estas acciones contribuyen de manera variable según el tipo de infección.

3.4.3.2. PROTEÍNAS DE SUPERFICIE.

Las proteínas de superficie son en parte las responsables de las características hidrofóbicas y electrostáticas de neumococo y pueden facilitar la adherencia a las células del huésped mediante interacciones no específicas e interacciones fisicoquímicas (Bogaert *et al*, 2004b). Se han identificado tres grupos principales de proteínas de superficie en *S. pneumoniae* que son lipoproteínas, proteínas con motivos LPXTG unidas covalentemente al peptidoglicano de la pared celular y proteínas de unión a colina.

3.4.3.2.1. Lipoproteínas

Se han descrito cerca de 50 lipoproteínas diferentes (Pérez-Dorado *et al*, 2012), dentro de las que se encuentra **PsaA**. Esta proteína juega un rol muy importante durante las primeras etapas de colonización de neumococo al actuar como adhesina y favorecer la unión de neumococo a la superficie del epitelio no inflamado. PsaA pertenece al sistema de transporte ABC (ATP-binding cassette) involucrado en la captación de manganeso y zinc. En especial el manganeso es de vital importancia para el normal crecimiento de neumococo dado que es imprescindible en la resistencia contra el estrés oxidativo (Kadioglu *et al*, 2008a; Pérez-Dorado *et al*, 2012).

Otras lipoproteínas que contribuyen con la virulencia son **SlrA**, **PpmA**, **Pia** y **Piu**, ya que mutantes deficientes en estas lipoproteínas mostraron reducida virulencia en modelos de neumonía y bacteriemia (Pérez-Dorado *et al*, 2012). **PiaA** y **PiuA** son relevantes en la captación de hierro el cual también es importante para el correcto crecimiento de neumococo.

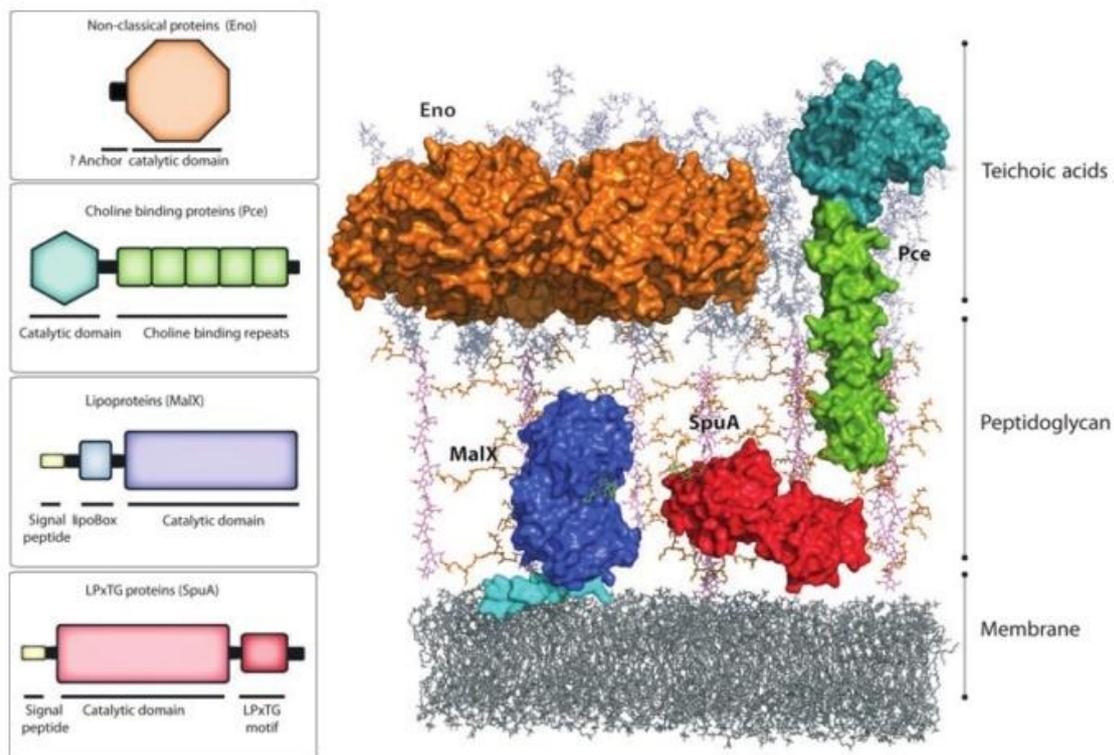


Figura 3. Modelo esquemático de las diferentes clases de proteínas expuestas en la superficie y su ubicación en la pared celular neumocócica. Izquierda, representación esquemática de la disposición modular en proteínas de superficie de neumococo. Derecha, sobre la membrana citoplasmática se encuentra la multicapa mureínica (peptidoglicano) donde los ácidos teicoicos (TA), y los ácidos lipoteicoicos (LTA), se unen covalentemente a la membrana. Las unidades de repetición de TA y LTA de *Streptococcus pneumoniae* tienen una estructura química idéntica. Mientras que las lipoproteínas (por ejemplo malX) se mantienen ancladas a la membrana, las proteínas LPxTG (por ejemplo SpuA) están unidas covalentemente al peptidoglicano. La pared celular neumocócica consiste en una membrana de fosfolípidos (LM), peptidoglicano (PG), TA y LTA-. Proteínas de unión a colina (por ejemplo, Pce) ancladas a la pared celular mediante interacciones no covalentes con los residuos de colina de los TA. Proteínas de superficie no clásicas (por ejemplo, Eno) carecen del péptido líder clásico y los motivos de anclaje de membrana (Pérez-Dorado *et al*, 2012).

3.4.3.2.2. Proteínas de unión a motivos LPXTG.

Las proteínas de unión con motivos LPXTG tienen principalmente funciones enzimáticas o de adhesión (Ton-That *et al*, 2000; Dramsi *et al*, 2008). Distintos tipos de estas proteínas de superficie contribuyen con la virulencia entre las que se encuentran la hialuronidasa, la neuraminidasa, la serina proteasa PrtA y la proteasa de IgA1 humana.

Tanto la hialuronidasa como la neuraminidasa son importantes, ya que provocan daños directos sobre el huésped y favorecen la colonización por neumococo. (Pérez-Dorado *et al*, 2012).

La proteasa de la inmunoglobulina A1 humana es un factor que limita la efectividad de la respuesta inmune humoral de las mucosas ya que específicamente cliva la IgA1 humana. Se ha mostrado que la IgA unida a la bacteria, al ser clivada por esta proteasa, facilita la adherencia de neumococo a las células del tracto respiratorio alto promoviendo la colonización inicial. Weiser y sus colegas han propuesto que el clivaje de la IgA opsonizante por la proteasa de IgA1 resulta en un cambio en la carga de la superficie celular de la bacteria y de ésta manera se incrementaría la proximidad física entre la colina perteneciente a la pared celular de neumococo y el receptor del factor activador de plaquetas (rPAF) del hospedador (Weiser *et al*, 2003).

Debido a la actividad de la proteasa de IgA1, la reducción de carga bacteriana mediada por anticuerpos puede ocurrir sólo después de que otras clases y subclases de anticuerpos específicos hayan sido generados en cantidades suficientes. Es interesante considerar que estas proteasas de IgA son producidas también por otras bacterias capaces de producir infecciones invasoras severas como *H. influenzae* tipo b y *N. meningitidis* (Kadioglu *et al*, 2008a).

3.4.3.2.3. Proteínas de unión a colina.

Una característica única de *S. pneumoniae* es su requerimiento nutricional por la colina, la cual es adquirida del medio de crecimiento e incorporada en las unidades repetidas de ácido teicoico y ácido lipoteicoico (Pérez-Dorado *et al*, 2012).

Algunas de estas proteínas de unión a colina como PspA, PspC y cuatro enzimas hidrolíticas de la pared celular (LytA, LytB, LytC, CbpE) se asocian con virulencia.

El rol de **PspA** en la virulencia de neumococo ha quedado evidenciado en modelos experimentales en los que se ha visto que las cepas mutantes incapaces de producir PspA son eliminadas más rápidamente en comparación con las cepas salvajes. Los datos recogidos por el grupo de investigación de Tu Ha y colaboradores indican que la capacidad de PspA para inhibir la activación del complemento durante la etapa temprana de la infección permite a neumococo evadir los mecanismos de defensa del huésped encargados de su eliminación (Tu *et al*, 1999).

PspC promueve la adherencia de neumococo ya que es capaz de interactuar con el componente secretorio del receptor polimérico de las inmunoglobulinas (pIgR). Éste es el responsable de la translocación de los anticuerpos de tipo IgM e IgA secretorios en el pulmón y podría servir como primer paso en la translocación a través del epitelio respiratorio. En cuanto a su otra función, PspC puede unirse al Factor H, que es un regulador negativo de la vía alterna del complemento que actúa impidiendo la activación de C3b y por tanto de la opsonofagocitosis mediada por complemento.

Por otra parte **LytA**, también conocida como autolisina, hidroliza el peptidoglicano a péptidos y residuos de glicano. De esta forma lleva a la lisis de neumococo y a la liberación de peptidoglicano y ácidos teicoicos, así como también de neumolisina, si bien la liberación de ésta última no es totalmente dependiente de la autolisina (Berry & Paton, 2000).

Asimismo, LytB, LytC y CbpE intervienen en la colonización de la nasofaringe.

3.4.4 Pili

En el año 2006 se identificó la presencia de *pili* en la superficie de *S. pneumoniae*. El *pili* interviene en la virulencia, es el mediador del anclaje de la bacteria en las células y también estimula la síntesis de citoquinas proinflamatorias. Además, se identificó otra clase de *pili* que interviene en la adherencia de neumococo a las células epiteliales. Aunque no todas las cepas de *S. pneumoniae* poseen *pili*, algunas expresan los dos tipos (Bagnoli *et al*, 2008).

3.5. Colonización Nasofaríngea

Como vimos anteriormente *S. pneumoniae* puede formar parte de la microbiota del tracto respiratorio superior, y puede ser fácilmente cultivado a partir de la naso-orofaringe. La nasofaringe es una cavidad permeable, es decir, está continuamente abierta al aire y una de sus funciones radica en la ventilación del oído medio. En los casos en que neumococo supera las barreras de defensa del hospedador y alcanza regiones estériles como el oído medio o los senos paranasales, puede provocar patologías como otitis media aguda o sinusitis, respectivamente.

Neumococo se transmite a través de la formación de aerosoles. Esta diseminación horizontal permite el contagio entre los individuos del entorno directo, dando lugar a la propagación en la comunidad.

En los niños, neumococo tiene una prevalencia de 30 a 60%, mientras que en adultos es de 1- 10%. En algunos estudios se ha mostrado que más del 95 % de los niños pueden haber sido colonizados por 6 serotipos distintos a la edad de dos años pero a medida que crecen, la prevalencia de la portación disminuye y la distribución de los serotipos colonizantes varía, pudiéndose encontrar incluso algunos de los serotipos prevalentes en adultos. Antes de los 9 años, la colonización se mantiene por encima del 30 al 40 %, pero luego disminuye progresivamente (Song *et al*, 2013).

Generalmente, la colonización es asintomática pero en algunos casos deriva en distintos tipos de enfermedad. Este espectro clínico desde la colonización hacia la enfermedad neumocócica invasiva dependería del serotipo capsular de neumococo en lugar de los antecedentes genéticos. De acuerdo con la revisión de la literatura, los serotipos 1, 4, 5, 7F, 8, 12F, 14, 18C y 19A son más propensos a causar ENI (Song *et al*, 2013).

La colonización nasofaríngea es un proceso dinámico en cuanto a la rotación de serotipos y especies colonizantes. A su vez existe competencia interespecies y entre las diferentes cepas de *S. pneumoniae* lo cual interfiere con la composición de la flora nasofaríngea (Bogaert *et al*, 2004b; Ghaffar *et al*, 1999, 2002; Pericone *et al*, 2000; Lipsitch *et al*, 2000). Por otro lado, la interferencia que se da a raíz de la vacunación sobre este tipo de relación de competencia, cooperatividad e inhibición entre las distintas cepas de una misma especie e interespecies,

puede generar consecuencias graves e impredecibles en la composición de la flora nasofaríngea (Bogaert *et al*, 2004b; Charalambous & Leung, 2012).

3.6. Respuesta del hospedador contra la colonización por neumococo.

La respuesta inmune del hospedador juega un rol muy importante en el control de la carga bacteriana. Una fuerte respuesta inmune que involucre a los fagocitos (neutrófilos y macrófagos), células B (anticuerpos contra la cápsula polisacáridica del neumococo y contra sus proteínas de superficie) y células T, remueve rápidamente la colonización por neumococo. Por el contrario, una respuesta inmune débil determina una colonización más prolongada (Jambo *et al*, 2010).

3.6.1. Respuesta innata del hospedador durante la colonización.

La activación de los mecanismos de defensa del sistema inmune innato no solo es importante en contener la infección sino también en mantener la homeostasis. Los mismos colaboran con el desarrollo de respuestas inmunes celulares destinadas a proteger el epitelio respiratorio de la invasión por patógenos específicos.

Está ampliamente demostrado que el complemento juega un rol muy importante en la protección contra la infección por neumococo debido a su capacidad de opsonizar la bacteria para que pueda ser eliminada por opsonofagocitosis (Brown *et al*, 2002). Sin embargo, su rol en la protección contra la colonización es discutido debido a resultados un tanto contradictorios.

Por un lado, datos obtenidos en modelos murinos de co- colonización con *S. pneumoniae* y *H. influenzae* sugieren que la eliminación exitosa de neumococo de la nasofaringe es resultado de su opsonización por complemento, seguida por la activación de neutrófilos que son reclutados hacia la superficie de la mucosa (Lysenko *et al*, 2005). A su vez, en un modelo distinto, C3 (proteína que juega un rol central en la activación del complemento) fue esencial dentro de los pulmones para generar una óptima respuesta contra el neumococo y subsecuentemente desempeñó un rol preponderante a nivel sistémico (Kerr *et al*, 2005). Por el contrario, otro grupo de trabajo que utilizó un modelo de colonización en ratones deficientes en C3, mostró que la colonización por neumococo se eliminó a la misma

velocidad que en los ratones salvajes (Rossum et al. 2010). Es importante tener en cuenta que los modelos en los cuales se utilizan ratones pueden variar según el fondo genético del animal y de los serotipos de neumococo que se utilicen y por ende los resultados obtenidos pueden variar de un modelo a otro.

Otro de los componentes principales de la respuesta inmune innata es la proteína C reactiva (CRP, del inglés “*C- reactive protein*”), la cual juega un rol crucial en la defensa del hospedador contra *S. pneumoniae*. CRP es una proteína de fase aguda, producida por las células epiteliales, que habitualmente se encuentra en el suero pero cuya concentración se ve incrementada durante la inflamación (Du Clos & Mold, 2004). Esta proteína tiene varias funciones debido a su capacidad de unirse a la fosforilcolina que expresa neumococo en su superficie. Por un lado, esta unión induce la activación de la vía clásica del complemento potenciando de esta manera su opsonización. Por otro lado, dicha unión inhibe la adhesión de la bacteria al receptor del factor activador de plaquetas (PAFr) en la superficie de las células del huésped. De ésta manera ayuda a eliminar la colonización del tracto respiratorio alto, evitando que neumococo migre a través de las capas endoteliales y epiteliales en un proceso denominado invasión de tejido pericelular (Gould & Weiser, 2001, 2002).

Por otra parte, la señalización a través de los receptores tipo Toll activa la respuesta innata de las mucosas que finaliza en el reclutamiento de fagocitos como neutrófilos y macrófagos (Craig et al, 2009). El adaptador mejor caracterizado por su participación en la señalización de la mayoría de los TLR es MyD88. A partir del mismo se activan las cuatro vías principales de señalización: la vía del factor nuclear de transcripción κ B (NF κ B) y tres vías de protein-quinasa activadas por mitógeno (MAP quinasa) (Díaz et al. 2009). Los ratones que carecen de MyD88 son incapaces de controlar el crecimiento de patógenos respiratorios como *S. pneumoniae* (Albiger et al, 2005).

Los TLR-2, TLR-4 Y TLR-9, así como también la proteína adaptadora MyD88, participan en la detección temprana y posterior eliminación de neumococo en los pulmones (Muñoz et al, 2010). Los receptores citosólicos NOD (del inglés “*nucleotide-binding oligomerization domain*”) tipo 1 y 2 reconocen diferentes porciones del peptidoglicano de neumococo.

Utilizando ratones deficientes en los distintos receptores tipo Toll se determinó que TLR9 es el receptor que juega el rol más importante en la infección por neumococo ya que sólo los

animales TLR9^{-/-} fueron altamente susceptibles a la infección letal. TLR-9 detecta ADN bacteriano (motivos CpG no metilados) y parece ser esencial para la fagocitosis y destrucción eficaz de los neumococos por los macrófagos pulmonares (Albiger *et al*, 2007).

TLR-4, por otra parte, se activa en presencia de la neumolisina. Estudios *in vivo* con ratones deficientes en TLR-4 (TLR-4 ^{-/-}) han demostrado una mayor sensibilidad, mayor carga bacteriana y un aumento en la apoptosis de las células del tracto respiratorio alto a tiempos tempranos durante la colonización y luego de la infección pulmonar por neumococo, en dosis bajas (Malley *et al.*, 2003; Branger *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2005).

Los componentes de la pared celular de neumococo como el ácido lipoteicoico (LTA) y las lipoproteínas (LBP) son reconocidas por TLR-2.

El rol de TLR2 ha sido estudiado en diferentes modelos *in vivo* de infección neumocócica. Por un lado, hay estudios que mostraron que TLR2 es importante en etapas tempranas de la colonización por neumococo (Rossum *et al.* 2005). Sin embargo, otros estudios mostraron resultados contradictorios que sugieren que TLR-2 podría desempeñar un papel perjudicial durante fases tempranas de la colonización por alterar la integridad de la barrera epitelial y la promoción de la translocación neumocócica (Clarke *et al*, 2011). Por otra parte, algunos autores han sugerido que en el caso de la neumonía neumocócica, TLR2 no tendría un rol muy importante (Knapp *et al*, 2004). Por el contrario, en un estudio llevado a cabo por Lee y colaboradores se plantea la existencia de un efecto sinérgico entre TLR-2 y TLR-4, así como también entre TLR-2 y TLR-9, respecto a la liberación de quimioquinas y citoquinas en respuesta a la infección por un serotipo determinado de *S. pneumoniae* (Lee *et al*, 2007).

En resumen, estos datos indican que las células de la inmunidad innata expuestas ante *S. pneumoniae* pueden integrar las señales de hasta tres receptores tipo Toll distintos (tanto intracelulares como extracelulares) e inducir una respuesta rápida y sinérgica de citoquinas y quimioquinas que juegan un rol crítico en la defensa temprana del hospedador frente a neumococo (Lee *et al*, 2007).

También hay que mencionar otros PRRs como los receptores MARCO y CD14 que también juegan un rol importante en el reconocimiento de este patógeno. Se ha mostrado, *in vitro*, que el receptor MARCO presente en los macrófagos alveolares es capaz de unir y mediar la internalización de neumococo; asimismo ratones *Marco* ^{-/-} tienen una mayor susceptibilidad

a la infección por neumococo (Arredouani & Kobzik, 2004). Mientras que CD14 es otro receptor que ha mostrado ser importante en la invasión de *S. pneumoniae* desde las vías aéreas hacia la sangre (van der Poll & Opal, 2009).

Por último, es importante nombrar el rol que cumplen tanto los macrófagos como los neutrófilos en conjunto con determinadas citoquinas durante esta primera etapa de defensa contra neumococo.

Entre el primer y tercer día luego de la colonización, se observa un notorio flujo de neutrófilos hacia el lumen de las cavidades nasales que se asocia a una reducción de la carga bacteriana. El flujo continuo de neutrófilos se atribuye al efecto quimiotáctico de IL-8, la cual es sintetizada por las células epiteliales, glandulares y los leucocitos. También, la función de IL-3 es importante, pues se sintetiza por las células T activadas y permite la estimulación, diferenciación y activación de macrófagos, neutrófilos, mastocitos y eosinófilos. Sin embargo, a pesar del infiltrado de neutrófilos, la colonización por *S. pneumoniae* persiste (Kadioglu *et al*, 2008a). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es de particular importancia dado que al inhibirlo o eliminarlo el neumococo es capaz de aumentar su población y logra una mayor diseminación. Este efecto está principalmente mediado por el receptor de tipo I del TNF. La interleuquina 1 (IL-1) parece tener el mismo rol protector aunque de menor importancia. La inhibición de ambos, TNF- α e IL-1, hace a los animales más susceptibles a contraer neumonía y otros tipos de infecciones (van der Poll & Opal, 2009).

Esta respuesta inflamatoria aguda es incapaz de controlar la colonización inicial pero actúa promoviendo la respuesta inmune adaptativa y la eliminación posterior de la bacteriana (Jambo *et al*, 2010).

3.6.2. Respuesta adaptativa del hospedador durante la colonización.

El rol de los anticuerpos contra la infección por neumococo es indiscutido. Sin embargo, su importancia durante la colonización no está tan clara.

La colonización nasofaríngea estimula la producción de IgA, (predominante en las secreciones externas), así como también de IgG sérica. El aumento en las concentraciones de anticuerpos contra la cápsula polisacáridica o contra las proteínas de neumococo (neumolisina, PsaA), ya sea en suero o en saliva, está relacionado con la protección contra la colonización (McCool &

Weiser, 2004). Estos anticuerpos opsonizan al neumococo, transformándolo en blanco para los fagocitos, los cuales lo reconocen, lo ingieren y de ésta manera lo eliminan de la nasofaringe (Jambo *et al*, 2010).

Aún es discutido si los anticuerpos son relevantes en la protección contra la colonización (Richards *et al*, 2010). Por un lado, en los últimos años ha surgido evidencia considerable sobre el rol esencial que juega la respuesta celular, llegando a postularse que la protección contra la colonización es dependiente de células T CD4⁺ e independiente de anticuerpos (Malley *et al*, 2005a). En modelos experimentales, se comprobó que animales deficientes en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y que por tanto no tienen células T CD4⁺ funcionales, presentan una colonización más prolongada (Malley *et al*, 2005a). Esto sugiere un rol de estas células en la protección frente a la colonización. Por otro lado, la transferencia adoptiva de células T CD4⁺ específicas confirió protección a animales RAG-deficientes (que no tienen células T ni B) (Lu *et al*, 2008). En particular, se ha visto que son las células T CD4⁺ productoras de IL-17A (Th17) el subtipo responsable de la protección frente a la colonización por neumococo (Malley *et al*, 2005b; Roche *et al*, 2007). En este sentido, Weiser y colaboradores mostraron que la protección contra la colonización es independiente de los anticuerpos. Para ello, utilizaron ratones μ MT (deficientes en células B y por ende, incapaces de generar anticuerpos), en donde se vio que pese a la ausencia de anticuerpos la colonización no se veía afectada, ni en duración ni en carga bacteriana (McCool & Weiser, 2004).

Por otro lado, algunos autores sugieren que la respuesta de anticuerpos contra *S. pneumoniae* no sólo es necesaria sino que también es suficiente para proteger contra la colonización; y que si bien la colonización induce células Th17, éstas no son necesarias para eliminar la colonización (Cohen *et al*, 2011).

3.7. Células Th17 productoras de IL17A.

Las distintas poblaciones de células T CD4⁺ efectoras se definen en función de los perfiles de citoquinas que producen. En este sentido, las células Th1 secretan IFN- γ y activan mecanismos de la inmunidad celular esenciales en el control de patógenos intracelulares. Las células Th2 se caracterizan por la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 y son importantes en el

control de infecciones por parásitos helmintos y en dirigir la respuesta inflamatoria en enfermedades como el asma (Zhao *et al*, 2011).

La caracterización de un nuevo linaje de células TCD4⁺ productoras de IL-17, las células Th17, ha revolucionado nuestro concepto de inmunidad mediada por células T. Durante los últimos 5 años, se han propuesto muchas vías de diferenciación para las células Th17 (Peck & Mellins, 2010).

Actualmente, se entiende que las células Th17 requieren de la presencia de TGF- β (del inglés “*transforming growth factor*”) e IL-6 para su diferenciación y que están bajo la regulación de los factores de transcripción ROR- γ -t y Stat 3 (Ivanov *et al*, 2006; McGeachy & Cua, 2008). IL-23 también es requerida para el desarrollo de Th17, pero aparentemente no participa en las etapas tempranas de diferenciación sino que es necesaria para el establecimiento del fenotipo (Langrish *et al*, 2005). Cabe destacar que, aunque TGF- β es crucial para el desarrollo del linaje Th17 en ratón, en humanos la diferenciación requiere IL-1, IL-6 y posiblemente IL-23, pero no TGF- β (Napolitani *et al*, 2009; Khader *et al*, 2009).

Las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17A e, IL-17F así como también de IL-21 e IL-22 (Khader *et al*, 2009).

IL-17A es la citoquina prototipo de las citoquinas Th17 y es por tanto la más estudiada. Pertenece a la familia de citoquinas IL-17 que incluye otros 5 miembros: IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. Los genes que codifica para IL-17A e IL17F, en humanos, se encuentran en el cromosoma (cr) 6p12. Estas dos citoquinas son las que presentan mayor homología dentro de la familia, siendo probablemente esta la razón por la cual usan mecanismos de señalización similares para ejercer sus funciones pro-inflamatorias (Chang & Dong, 2009; Hymowitz *et al*, 2001).

IL-17A induce también la expresión de diversas citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, como IL-6, TNF- α , IL-1, CXCL-6, CXCL-7, CXCL-8, MCP-1 y metaloproteinasas contribuyendo a la expansión de la respuesta inflamatoria, mediante el reclutamiento y activación de neutrófilos y macrófagos (Ye *et al*, 2001; Dong, 2008; Ivanov & Manel, 2010), y la producción de péptidos antimicrobianos como lipocalina-2, Reg3 γ , β -defensinas y calprotectina (Ishigame *et al*, 2009; Raffatellu *et al*, 2008). Además, favorecen la secreción local de mucus y

la proliferación y regeneración de enterocitos, proceso inducido en gran medida por IL-22 (Zheng *et al*, 2008).

Además, inducen la expresión de claudinas, componentes de las uniones epiteliales capaces de regular la conformación de la barrera intestinal mediante la señalización de ERK y MAPK (Kinugasa *et al*, 2000), convirtiendo estas células en actores de la homeostasis intestinal. Los receptores para IL-17 (IL-17RA y IL-17RC) son expresados en órganos como pulmón, riñón, hígado y bazo (Gu *et al*, 2013), y en leucocitos, queratinocitos, fibroblastos, y células epiteliales, mesoteliales y del endotelio (Matsuzaki & Umemura, 2007).

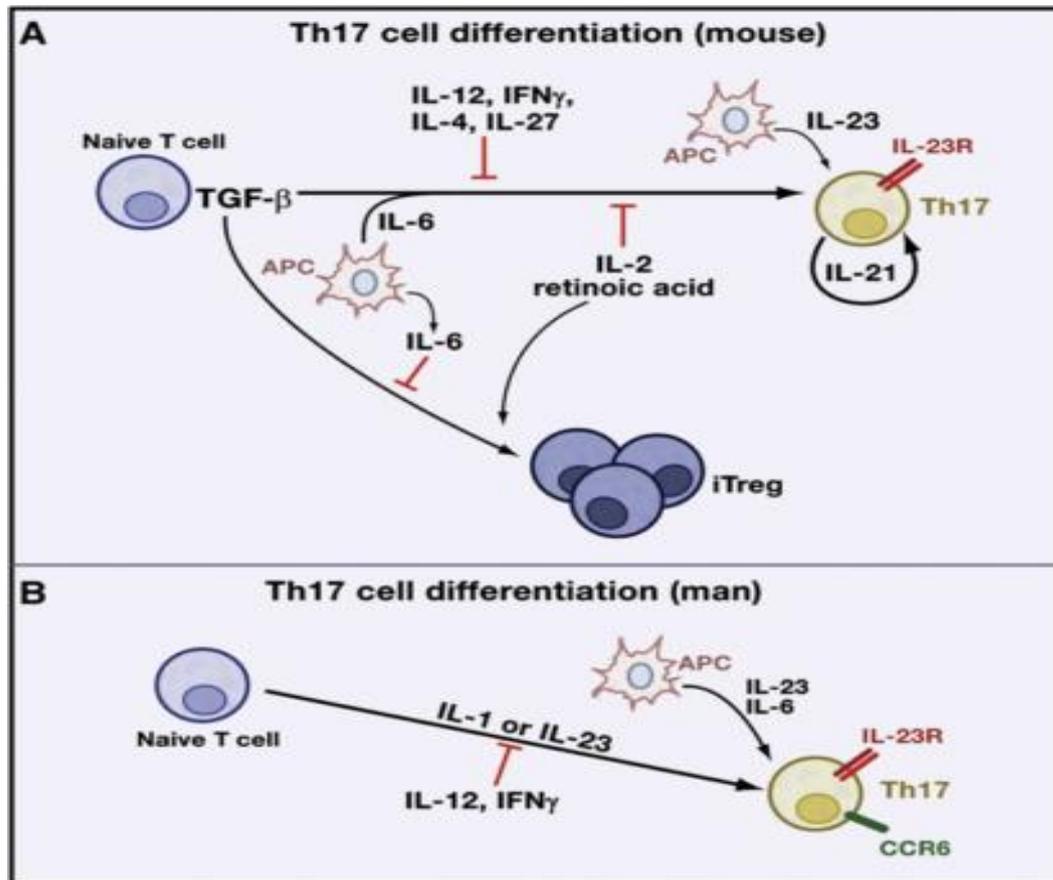


Figura 4. Esquema de la diferenciación de células Th17 en ratón y en humanos. (A) En el ratón, las células T naive activadas en presencia de TGF-β (posiblemente proporcionados por células Treg) e IL-6, comienzan la diferenciación hacia el subconjunto de células Th17; IL-6 regula positivamente a IL-21 e IL-23R para promover el desarrollo de Th17. En la ausencia de IL-6, TGF-β induce a las células T reguladoras. El desarrollo de células Th17 es inhibida por el ácido retinoico e IL-2 y por las citoquinas que favorecen la diferenciación a Th1 y Th2. (B) En el hombre, IL-23 o IL-1 dirigen la diferenciación de las células Th17 que expresan IL23R y CCR6. Los efectos de IL-1 puede ser potenciado por IL-23 y / o IL-6. Las citoquinas que favorecen la diferenciación de las células T naive a células con perfil Th1 inhiben el desarrollo de células Th17 (McGeachy & Cua, 2008).

3.8. Th17 e IL17A en la respuesta inmune contra *Streptococcus pneumoniae*.

Las primeras evidencias que vincularon la producción de IL-17A a la infección por distintos microorganismos patógenos, surgieron en el año 2000, previo al establecimiento del concepto del nuevo linaje Th17.

Luzza y colaboradores reportaron la existencia de células productoras de IL-17 en la lámina propia de pacientes infectados con *Helicobacter pylori* (Luzza *et al*, 2000). En el mismo año Infante-Duarte y colaboradores mostraron que la respuesta T antígeno-específica podía ser desviada hacia un fenotipo IL-17⁺/IFN γ ⁻/IL4⁻ por una lipoproteína de *Borrelia burgdorferi* (Infante-Duarte *et al*, 2000), fenotipo correspondiente con el actual linaje Th17. Desde entonces ha surgido un gran número de reportes vinculando a IL-17 en la respuesta contra bacterias extracelulares (Ye *et al*, 2001), intracelulares (Lockhart *et al*, 2006; Xu *et al*, 2008), hongos (Kawaguchi *et al*, 2004) e incluso infecciones virales (Matsuzaki & Umemura, 2007). En conjunto estos trabajos permiten sugerir un rol de IL-17 en la respuesta inmune protectora, en particular en patógenos de mucosas (Chabalgoity *et al*. 2007). La importancia de IL-17 en la inmunidad protectora contra patógenos extracelulares fue probada inicialmente en el modelo de infección respiratoria por *K. pneumoniae* en ratones deficientes en el receptor de IL-17A (IL-17RA^{-/-}), donde se observó aumento de la mortalidad y mayor recuento bacteriano en pulmones de los ratones deficientes en relación a los salvajes. Se observó también un menor reclutamiento de neutrófilos a los pulmones en los ratones IL-17RA^{-/-}. Llamativamente, la expresión de IL-17A tuvo lugar únicamente en etapas tempranas de la infección (Ye *et al*, 2001).

Fue en el año 2006 que Malley y colaboradores vincularon por primera vez la infección por *S. pneumoniae* con IL-17, afirmando que esta última cumplía un rol central a nivel de protección contra colonización (Malley *et al*, 2006). Este equipo de investigadores comenzó empleando una cepa no capsulada de *S. pneumoniae* genéticamente modificada, la cual fue inactivada y suministrada vía intranasal con toxina colérica como adyuvante, para generar una respuesta inmune tanto a nivel local como humoral. Como resultado de este experimento obtuvieron una excelente protección contra la colonización así como también contra la sepsis. El mismo

resultado fue obtenido tras inocular vía intranasal a los ratones con la misma cepa capsulada o cepas capsuladas heterólogas. Como se mencionó en los trabajos anteriormente citados de este mismo grupo de investigación, estos resultados permitieron a los autores proponer que la protección era independiente de la generación de anticuerpos capsulares. Esto los llevó a sugerir que la protección conferida contra *S. pneumoniae* era generada por una vía independiente a la humoral y que era dependiente de células TCD4⁺. Utilizando animales RAG deficientes, mostraron que la vacunación indujo una respuesta de IL-17, y que esta era clave en la protección contra la colonización como quimioatrayente y activadora de neutrófilos (Lu et al, 2008; Zhang et al, 2009). Resultados compatibles con lo dicho anteriormente se obtuvieron en experimentos de inmunización con el polisacárido capsular purificado (Malley et al, 2006) o con la mezcla de proteínas de superficie (Basset et al, 2007a; Lu et al, 2009) utilizando toxina colérica como adyuvante en ambos casos.

Por otro lado, la protección contra la neumonía neumocócica aguda mostró ser independiente de células T CD4⁺ y dependiente de anticuerpos (Lu et al. 2010; Malley & Anderson 2012). Recientemente, el grupo de Kadioglu sugiere que tanto la respuesta humoral sistémica y de mucosas como la respuesta celular son importantes en la protección a largo plazo contra la colonización y la neumonía aguda (Richards et al., 2010). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha estado trabajando en la caracterización de la respuesta inmune protectora contra la neumonía aguda por *S. pneumoniae*, para lo cual se han establecido modelos experimentales de neumonía aguda en ratones C57BL/6 y Balb/C con cepas de *S. pneumoniae* de relevancia clínica. Resultados obtenidos con este modelo demuestran que la infección intranasal de ratones C57BL/6 con una dosis subletal de neumococo genera una sólida protección frente a un desafío subsecuente con la misma cepa, que se evidencia tanto cuando el desafío se realiza a la semana de la infección subletal como a los dos meses. Análisis de la respuesta transcripcional, por microarreglos de ARN y PCR en tiempo real, mostró que una diferencia fundamental entre los animales protegidos y control es la regulación positiva de IL-17A, IL-17F e IL-22, en los animales que sobreviven al desafío. Esto sugiere un rol para estas respuestas en la protección contra neumococo (Marqués et al, 2012). Recientemente nuestro grupo ha realizado estudios en ratones *Il17a*^{-/-} que muestran que a pesar de la asociación mostrada entre IL-17A y la protección contra la neumonía aguda causada por *S. pneumoniae*, esta citoquina no es esencial para la protección, dado que los

animales *Il17a*^{-/-} sobreviven al desafío letal. Sin embargo, se encuentran en estudio funciones que puede estar cumpliendo esta citoquina en este modelo.

Por otra parte, en lo que refiere a la colonización por neumococo, como se mencionó más arriba, los datos de la bibliografía sugieren un rol relevante de IL-17A en la protección. Por tanto, en este trabajo de tesis se decidió evaluar el rol de IL-17A en la colonización por *S. pneumoniae* comparando animales salvajes y deficientes para *Il17a*. Cabe mencionar que esta cepa de animales *Il17a*^{-/-} no ha sido utilizada hasta el momento en estudios de colonización.

Una diferencia central entre este trabajo y lo que está publicado es la utilización de un modelo de colonización primaria, en el cual no hay una inmunización o vacunación. Es decir, que nos interesó estudiar el comportamiento de animales WT e *Il17a*^{-/-} frente a una infección primaria. En este sentido, se presentarán los resultados obtenidos de los ensayos de cinética de colonización realizados comparativamente en ambas cepas de ratones, utilizando aislados clínicos de los serotipos 1, 3, 14 y 23F, los cuales tienen una relevancia clínica importante en nuestra región.

Además, decidimos focalizarnos en el serotipo 1 de *S. pneumoniae* y evaluar la respuesta de anticuerpos específicos contra la cápsula polisacáridica tanto en los ratones deficientes para *Il17a* como en la cepa salvaje. A su vez, se evaluó el rol de las células CD4 en la producción de estos anticuerpos específicos. Por último, se realizaron ensayos preliminares con el objetivo de restablecer el fenotipo WT en los animales deficientes para *Il17a*, mediante el agregado exógeno de la citoquina recombinante.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Evaluar el rol de IL-17A en la respuesta inmune frente a la colonización por *S. pneumoniae*

4.2. Objetivos específicos.

1. Realizar estudios comparativos de cinética de colonización para los serotipos 1, 3, 14 y 23F de *S. pneumoniae* en ratones salvajes y ratones deficientes para *Il17a*.
2. Comparar la respuesta de anticuerpos específicos contra polisacárido capsular de tipo 1 en ratones salvajes y ratones *Il17a*^{-/-}.
3. Evaluar el rol de las células CD4 en la producción de anticuerpos contra polisacárido capsular d tipo 1.
4. Evaluar si es posible restablecer el fenotipo salvaje en animales deficientes en IL-17A.

5. Materiales y Métodos

5.1. Cepas Bacterianas

Las cepas de *Streptococcus pneumoniae* utilizadas en este trabajo fueron provistas por la Dra. Teresa Camou del Departamento de Laboratorios del Ministerio de Salud Pública, Uruguay. Consisten en aislados clínicos de neumococo de los serotipos 1, 3, 14 y 23F, previamente caracterizados en dicho laboratorio.

5.1.1. Crecimiento y mantenimiento de las cepas

Las bacterias fueron recibidas en placas de agar sangre (Agar Tripticasa Soja (Difco) complementado con 5% de sangre ovina estéril) e inmediatamente se procedió a la preparación de las alícuotas madre de cada una de las cepas. Para esto, se inocularon 10 tubos conteniendo 10 ml de caldo Todd Hewitt (SIGMA), complementado con 0.5% de extracto de levadura (THYB), con 10 colonias aisladas de cada una de las cepas de *S. pneumoniae* recibidas y se incubó a 37°C hasta alcanzar una OD a 600 nm de 0.2- 0.4 UA. Luego se realizó un pool colocando 2 ml de cada uno de los tubos crecidos, al cual se agregó un volumen igual de caldo THYB y glicerol hasta una concentración final de 13%. Dicho pool se dispensó en alícuotas de 1.5 ml que fueron guardadas a -80°C. Se controló la pureza de esta preparación en placas de agar sangre; las colonias de neumococo son colonias umbilicadas y a-hemolíticas por lo que presentan un halo verde a su alrededor.

Las alícuotas de trabajo se prepararon a partir de una alícuota madre, siguiendo un procedimiento similar pero incubando los cultivos hasta obtener una OD a 600nm de 0.7 – 0.9UA. Finalmente se preparo y alicuotó el pool de igual manera a lo descrito para las alícuotas madre. Se realizaron cuentas viables en al menos 3 alícuotas de trabajo mediante el plaqueo de diluciones seriadas en placas de agar sangre que fueron incubadas a 37°C y 5 %

de CO₂, por 18 h. Se realizó el recuento del número de unidades formadoras de colonia (ufc) y de allí se estimó el número de ufc/ml en las alícuotas de trabajo.

Los protocolos descritos para la preparación de alícuotas madre y de trabajo fueron aportados por el Dr. Moon Nahm del Laboratorio de Patógenos Respiratorios Bacterianos de la Universidad de Alabama en Birmingham, Estados Unidos (disponibles en www.vaccine.uab.edu), que constituye uno de los dos centros mundiales de referencia de la Organización Mundial de la Salud en neumococo)

5.2. Ratones.

Se utilizaron ratones de las cepas C57BL/6, hembras, de 6-8 semanas de edad, provistos por la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DI.LA.VE) del Ministerio de Ganadería, Uruguay. Los ratones fueron mantenidos en la Unidad de Experimentación Animal (UEA) del Departamento de Desarrollo Biotecnológico ubicada en el Instituto de Higiene, dentro de un aislador con cajas individualmente ventiladas, con filtros de aire de entrada y salida (Labsystems), y con agua y ración ad libitum. El cuarto cuenta con temperatura y humedad controlada y ciclos de 12 horas luz – 12 horas oscuridad.

Los ratones *Il7a*^{-/-}, deficientes en IL-17A, con fondo genético C57BL/6 fueron obtenidos a través de una colaboración con el Dr. Yochiro Iwakura de la Universidad de Tokyo, Japón. Estos ratones fueron generados reemplazando el exón 1 y 2 del gen *Il17a* por un gen con resistencia a neomicina (Nakae *et al*, 2002). Los ratones deficientes en IL-17A fueron criados en el bioterio del Instituto Pasteur de Montevideo (IPMONT), Uruguay e ingresados a la UEA y mantenidos dentro del aislador ventilado, en igual condición que las cepas salvajes por al menos una semana previo a su uso en experimentación.

Toda manipulación de los animales infectados, tanto salvajes como deficientes, fue realizada dentro de una cámara de flujo laminar (clase II A2, ESCO, Pennsylvania-USA) ubicada dentro del laboratorio de experimentación animal del Instituto de Higiene, incluido el cambio de camas.

Los protocolos utilizados en esta tesis fueron presentados y aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República (código de aprobación: 08-05-10).

5.3. Infección subletal.

5.3.1. Preparación del inóculo para la infección.

Para la preparación del inóculo de infección, se descongeló una de las alícuotas de trabajo (2.1.1) y luego de centrifugar a 2500g por 5 minutos, a temperatura ambiente (TA), se descartó el sobrenadante y las bacterias fueron lavadas con solución salina apirogena (calidad inyectable). Finalmente las bacterias fueron resuspendidas en el volumen de salina correspondiente para obtener la dosis requerida en 10 μ l, que es el volumen a ser administrado a cada ratón. En todos los casos, la concentración de bacterias viables fue verificada en cada ensayo de infección, realizando diluciones seriadas y plaqueó en agar sangre.

5.3.2. Infección intranasal y obtención de muestras

Los animales fueron anestesiados con 200 μ l de una mezcla que contiene ketamina y xilacina en una proporción 8:1 respectivamente, la cual es finalmente diluida 1/4 con suero fisiológico. La administración fue por vía intraperitoneal (i.p.). Luego de 10 minutos, los animales recibieron 10 μ l de inóculo conteniendo la dosis subletal de neumococo (4×10^4 ufc/10 μ l), administrado con pipeta y de a gotas, en ambas narinas.

Al día cero (previo a la inoculación) y luego de la inoculación, en los tiempos establecidos del experimento, se tomaron muestras de sangre de 7 ratones por grupo. Las mismas fueron obtenidas por punción del seno sub-maxilar con el fin de determinar los niveles de anticuerpos específicos en suero contra polisacárido capsular de neumococo serotipo 1 (PhPS1).

Para los ensayos de determinación de carga bacteriana en lavados nasofaríngeos con los serotipos 1 y 3, se utilizaron 25 ratones por cepa (WT o *Il17a*^{-/-}) y por serotipo (Pn1 o Pn3), dado que por punto se sacrifican 4 ratones.

En el caso de los serotipos 14 y 23F se utilizaron 15 ratones por cepa y por serotipo, ya que se planificó para estudiar 3 puntos de la cinética de carga bacteriana.

5.4. Realización de lavado nasofaríngeo (NAL).

Para llevar a cabo los lavados nasofaríngeos los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y luego disecados de modo de exponer la cavidad nasofaríngea. Se introdujo una pipeta pasteur de punta fina (Fine Tip Pastette, Alpha Laboratories Ltda., UK) conteniendo 1ml de suero fisiológico, en la cavidad nasofaríngea, haciendo pasar el suero por toda la cavidad nasofaríngea y recogiendo las gotas que salen por las narinas. Dicho lavado, conteniendo la carga bacteriana contenida en nasofaringe, fue conservado inmediatamente en hielo hasta su procesamiento.

5.5. Carga bacteriana en NAL.

Para poder realizar el recuento bacteriano se hicieron diluciones seriadas de los NAL originales y las mismas fueron plaqueadas por triplicado en placas de agar sangre conteniendo gentamicina para eliminar la contaminación con otras bacterias α -hemolíticas presentes como flora normal a nivel de nasofaringe. El plaqueo se realizó en cámara de flujo para evitar contaminaciones del ambiente. Luego las placas fueron incubadas toda la noche en estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. A la mañana siguiente se procedió al recuento para poder determinar la carga bacteriana y de esta manera poder comparar entre ambos grupos.

5.6. Detección de anticuerpos séricos anti polisacárido 1.

La respuesta de anticuerpos IgG e IgM, específicos contra el polisacárido capsular 1, se evaluó mediante una adaptación del ELISA de 3a generación usado en humanos (Wernette *et al*, 2003). Se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Medium Binding, Greiner) con 100 μ l de una solución 4 μ g/ml de polisacárido capsular tipo 1 (American Type Culture Collection, ATCC) en PBS, durante 5h a 37°C, en cámara húmeda. Las muestras fueron pre-adsorbidas con 5 μ g/ml de polisacárido C (PS-C, Staten Serum Institute, Copenhagen, Denmark) y 5 μ g/ml de polisacárido capsular tipo 22F (ATCC), en PBS-0.05% Tween20 en una dilución final 1/50 e incubadas por 30 min a temperatura ambiente (TA). Luego de lavar las placas con buffer Tris salino (TBS) conteniendo 0.01% de Brij-35 (buffer de lavado), se agregaron 50 μ l de cada una de las muestras por duplicado y se incubó toda la noche a TA. Luego de lavar 5 veces con buffer de lavado se agregaron 100 μ l por pocillo de una dilución 1/1000 de anticuerpo secundario biotinilado específico contra IgG de ratón o dilución 1/500 de un anticuerpo secundario biotinilado específico contra IgM de ratón (ambos de SIGMA) y se incubó toda la noche a 4°C. Finalmente, luego de lavar, se agregaron 100 μ l/pocillo de sustrato TMB (3,3',5,5' Tetrametil benzidina, BD) y se incubó por 15- 30 min hasta detener la reacción por agregado de 50 μ l/pocillo de 2M H₂SO₄. Se leyó la absorbancia a 450nm (con referencia a 630 nm) en un lector de microplacas (MRX II, Dynex Technologies). En cada placa se sembró, en paralelo, una curva estándar preparada con diluciones seriadas de un suero positivo considerado como referencia. Esta referencia fue preparada a partir de sueros de varios ratones que habían mostrado ser positivos mediante esta técnica ELISA. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias interpoladas en dicha curva estándar.

5.7. Producción de anticuerpos anti-CD4.

Para la producción de anticuerpos monoclonales anti-CD4 se utilizaron células de un hibridoma GK1.5 (anti-CD4) que produce anticuerpos de rata de tipo IgG2b, específicos contra CD4 murino. Dichas células se conservaron congeladas en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso. El medio de congelación usado contiene 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10% de DMSO y se congelaron con una densidad de 5×10^6 cél/ml. Para comenzar la

producción de los anticuerpos monoclonales (AcMo) fue necesario lavar las células con medio de expansión (DMEM con alto contenido en glucosa, 5% de SFB, glutamina y antibiótico –penicilina/estreptomicina). Se centrifugaron a 400G por 3 minutos. Luego se colocaron las células en medio de cultivo previamente templado a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂, en botellas de cultivo T25. Las células fueron subcultivadas a una concentración de 4x10⁵ cél/ml para seguir con la expansión. Las células utilizadas para la producción de los AcMO fueron lavadas con medio de cultivo DMEM libre de SFB y resuspendidas en medio libre de suero fetal, denominado OptiMem (Invitrogen, USA). Pasados los 4 días se recuperó el sobrenadante. A continuación, se procedió a la concentración del sobrenadante mediante la utilización de un amicon ultra-4 (Millipore). Finalmente, el AcMo fue almacenado a -20°C y cuantificado mediante el método de Bradford para determinación de proteínas.

5.8. Depleción de células CD4⁺

La depleción de células CD4⁺ se llevo a cabo utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CD4 producidos en nuestro laboratorio como se describió en la sección anterior. Se siguió el protocolo de depleción que previamente fuera puesto a punto en nuestro laboratorio y que permitió mostrar que una dosis de 100µg/200µl vía i.p. es suficiente para depletar dichas células tanto en sangre como en pulmón.

Se utilizaron dos grupos de 8 ratones de la cepa salvaje cada uno, uno para depleción y otro como control. Ambos grupos recibieron una dosis subletal (4x10⁴ ufc/10µl) de neumococo serotipo 1 vía intranasal, al día 0. Sin embargo, el grupo depletado, recibió 4 dosis de 100µg/200µl de anticuerpo anti-CD4, vía i.p, a los días -1, 1, 4 y 7, para mantener la depleción en el tiempo. A su vez, los mismos días que los animales recibieron la dosis de anti-CD4⁺ también se tomaron muestras de sangre para poder comparar posteriormente, los niveles de anticuerpos producidos por ambos grupos.

5.9 Complementación de animales $Il17a^{-/-}$ con rIL17A.

El restablecimiento del fenotipo salvaje en animales $Il17a^{-/-}$, se llevo a cabo con ratones deficientes para $Il17a^{-/-}$ inoculados 21 días antes con una dosis subletal de *S. pneumoniae* serotipo 1 (colonización) y tratados con distintas dosis de IL-17A recombinante (rIL17-A). En particular, se administraron dos dosis de rIL-17A, por vía intranasal al día 21 y al día 24 post inoculación subletal, y se probaron distintas dosis:

Grupos	n	Dosis IL-17A r	
		Día 21	Día 24
$Il17a^{-/-}$	3	0.1 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$	1.0 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$
$Il17a^{-/-}$	3	0.1 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$	0.1 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$
$Il17a^{-/-}$	3	0.01 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$	0.01 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$

Como control, se utilizaron animales $Il17a^{-/-}$ y animales salvajes, que sólo recibieron el inóculo subletal de neumococo pero no la citoquina recombinante, dado que como se muestra en la sección 6.1.1 de resultados, al día 21, la cepa salvaje eliminó la colonización mientras que los animales $Il17a^{-/-}$ aún permanecen colonizados.

Finalmente, al día 27 (72hrs después de la última dosis de rIL17A), los animales fueron sacrificados y se realizaron lavados nasofaríngeos para poder determinar la carga bacteriana.

5.10. Análisis Estadístico.

Para el análisis de la diferencia de medias entre dos grupos se utilizó el test Mann-Whitney. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$ y altamente significativos los valores de $p < 0.01$. En todos los casos, el análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego California USA).

6. Resultados

6.1. Determinación de carga bacteriana en NAL.

Con el objetivo de evaluar la cinética de colonización nasofaríngea inducida por los distintos serotipos de *S. pneumoniae* en animales salvajes e IL-17A deficientes, se evaluó la carga bacteriana en lavados nasofaríngeos obtenidos a distintos tiempos luego de la infección subletal. Las muestras de lavados fueron sembradas en placas agar-sangre conteniendo gentamicina para eliminar la contaminación con otras bacterias α -hemolíticas presentes como flora normal a nivel de nasofaringe. Luego de su incubación se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias.

6.1.1. *S. pneumoniae* serotipo 1

Como se dijo anteriormente, el serotipo 1 es de los más prevalentes en nuestra región. Por otra parte ensayos de infección nasal realizados en nuestro laboratorio con este serotipo, mostraron un 100% de letalidad 96 hrs después de la infección nasal.

Este serotipo fue el elegido en esta tesis para llevar a cabo ensayos de detección de niveles de anticuerpos así como también para los ensayos de depleción de células CD4 como se verá más adelante.

El análisis se llevo a cabo comparando en cada punto analizado la carga en los animales salvajes e *Il17a*^{-/-}. Los resultados expresados como el logaritmo en base 10 de la carga bacteriana en función del tiempo se muestran en la Figura 5.

Al día 7 se observa que ambos grupos de ratones presentan cargas bacterianas similares, no siendo esto así al día 14 en donde se aprecia que ambas curvas se separan. Los animales salvajes comienzan a controlar la infección y ya al día 14 se observan valores cercanos al límite de detección de la técnica, mientras que los animales deficientes en IL-17A no controlan de manera eficiente la infección y mantienen niveles similares incluso al día 57 que es el último punto analizado en este experimento. Por tanto, estos resultados muestran que

los animales WT controlan y eliminan la colonización nasofaríngea inducida por esta cepa de *S. pneumoniae* serotipo 1 entre los días 14 y 21 luego de la infección subletal mientras que los animales *Il17a*^{-/-} no la eliminan y permanecen colonizados hasta el final del presente experimento.

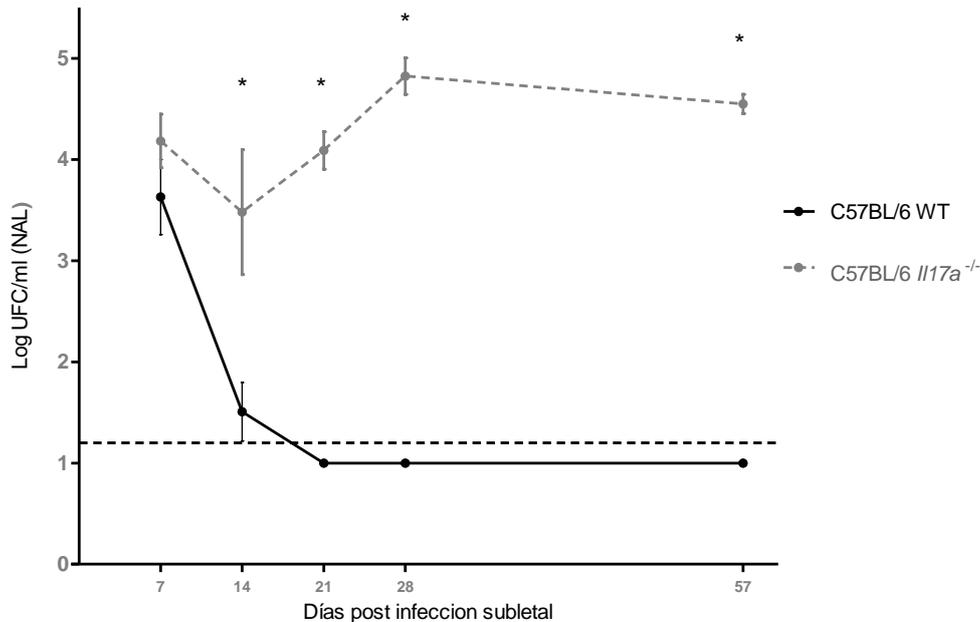


Fig 5. Cinética de carga bacteriana detectada en lavados nasofaríngeos 7, 14, 21, 28 y 57 días después de una dosis subletal (4×10^4 ufc/10 μ l) de *S. pneumoniae* serotipo 1. La línea punteada en negro corresponde al límite de detección de la metodología utilizada. Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de ratones para ese día (Test de Man Whitney). Las barras representan la Media \pm SEM de 4 animales por grupo. *

6.1.2. *S. pneumoniae* serotipos 3, 14 y 23F

A continuación, se decidió evaluar la cinética de colonización nasofaríngea para otros serotipos de neumococo, habiéndose elegido para esto el 3, 14 y 23F. Estos serotipos, al igual que el 1, fueron elegidos dada su alta prevalencia en nuestra región. Algunos datos previos obtenidos en nuestro laboratorio habían mostrado una baja virulencia de los serotipos 14 y 23F, y una muy alta letalidad del serotipo 3 (datos no mostrados).

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de estos serotipos.

Como se puede observar en el gráfico (A) de la figura 6, correspondiente al serotipo 3, al día 34 los ratones salvajes reducen considerablemente la carga bacteriana en nasofaringe

mientras que los ratones *Il17a^{-/-}* permanecen colonizados. Recién al día 57 se establecen diferencias estadísticamente significativas entre los animales salvajes e *Il17a^{-/-}*, en donde se puede apreciar que los primeros eliminan por completo la carga bacteriana pero no así los *Il17a^{-/-}*, si bien igual hay una leve reducción de carga bacteriana. A continuación, se hizo un ensayo en paralelo con los serotipos 23F y 14 (figura 6 (B) y (C), respectivamente). Luego de la colonización subletal con el serotipo 23F vemos que la cepa salvaje reduce notoriamente la carga bacteriana al día 21, eliminándola por completo al día 42. Mientras que la cepa deficiente en *Il17a*, no solo no elimina la colonización sino que al día 42 se observa un aumento en la carga bacteriana en comparación con la dosis inicial.

Esto no sucede así para el serotipo 14, ya que éste serotipo presenta una cinética similar a la observada para el serotipo 3. Vemos que si bien los ratones salvajes reducen paulatinamente la carga bacteriana, también lo hacen los ratones *Il17a^{-/-}*, aunque éstos últimos son portadores de una mayor carga bacteriana. Al día 42 la cepa salvaje tiene valores cercanos al límite de detección de la técnica pero no establece una diferencia estadísticamente significativa con los ratones *Il17a^{-/-}* quienes si bien permanecen colonizados, reducen en un orden la carga bacteriana.

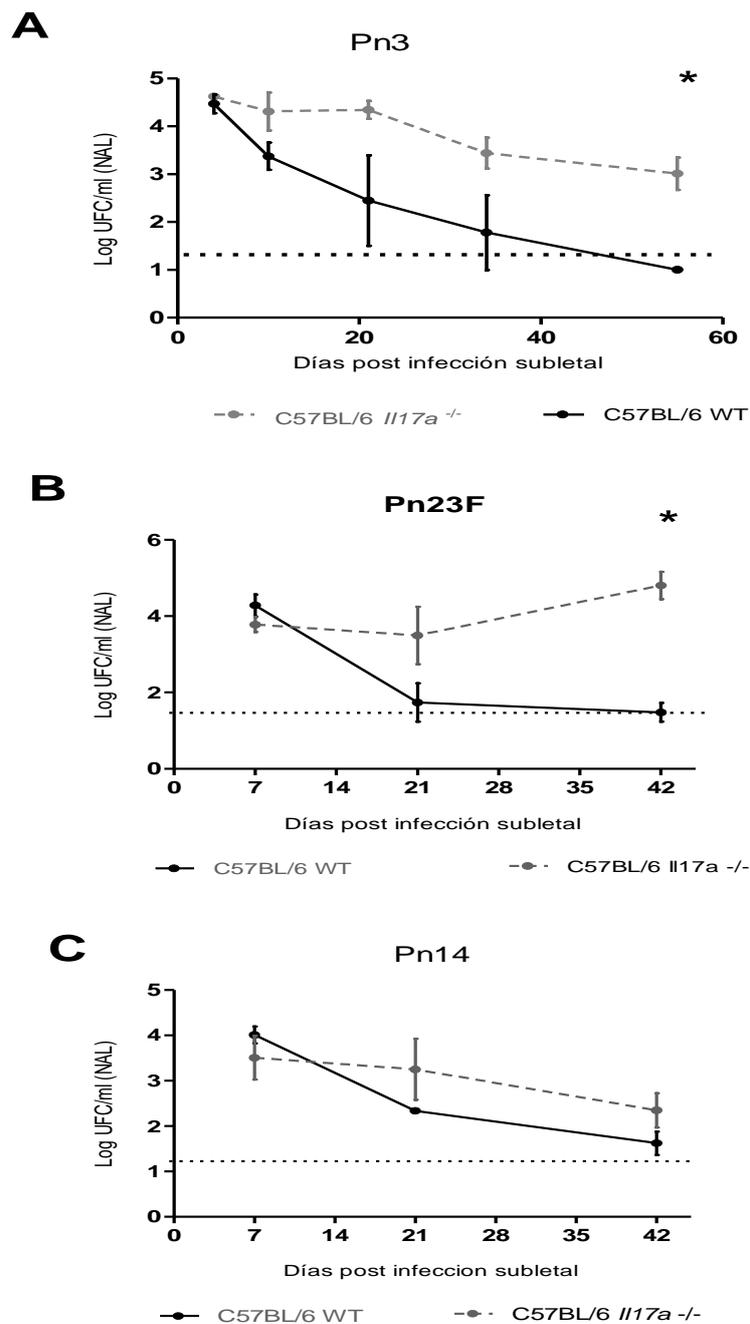


Fig 6. Cinética de carga bacteriana detectada en lavados nasofaríngeos 7,21,28 y 57 días después de una dosis subletal (4×10^4 ufc/ $10 \mu\text{l}$) de *S. pneumoniae* serotipo 3 (A), 23F (B) y 14 (C). La línea punteada en negro corresponde al límite de detección de la metodología utilizada. Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de ratones para ese día (Test de Man Whitney). Las barras representan la Media \pm SEM de 4 animales por grupo.

6.2. Anticuerpos específicos contra polisacárido 1 en animales salvajes e $Il17a^{-/-}$ colonizados.

Dentro del experimento llevado a cabo para determinar la cinética de colonización para el serotipo 1, se realizó también la toma de muestras de sangre para el análisis de la respuesta de anticuerpos específicos contra PnPs1 producidos por ambos grupos de animales.

Para esto se tomaron muestras de sangre los días 2, 4, 8, 16, 36 y 67 luego de la infección subletal y se determinó el título de anticuerpos utilizando un ELISA específico para determinación de anticuerpos anti polisacáridicos.

La figura 7 muestra que en los primeros 3 puntos del experimento, ambos grupos producen niveles similares de anticuerpos, tanto IgM como IgG. Al día 16 del experimento se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Los animales salvajes presentan mayor producción de anticuerpos, tanto IgG como IgM, en comparación con la producción de anticuerpos por parte de los animales $Il17a^{-/-}$. Curiosamente los roles se invierten en los siguientes puntos donde los ratones $Il17a^{-/-}$ producen niveles de anticuerpos estadísticamente más altos que la cepa salvaje.

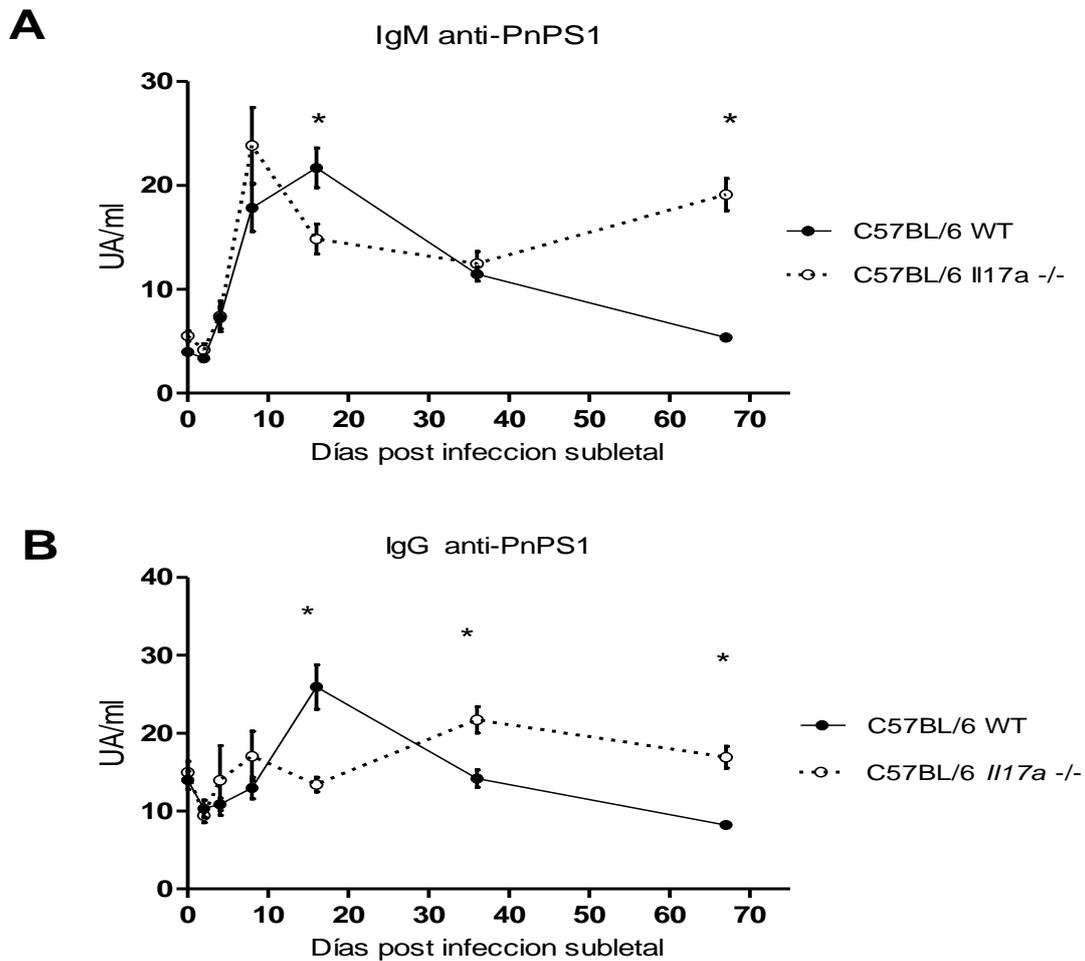


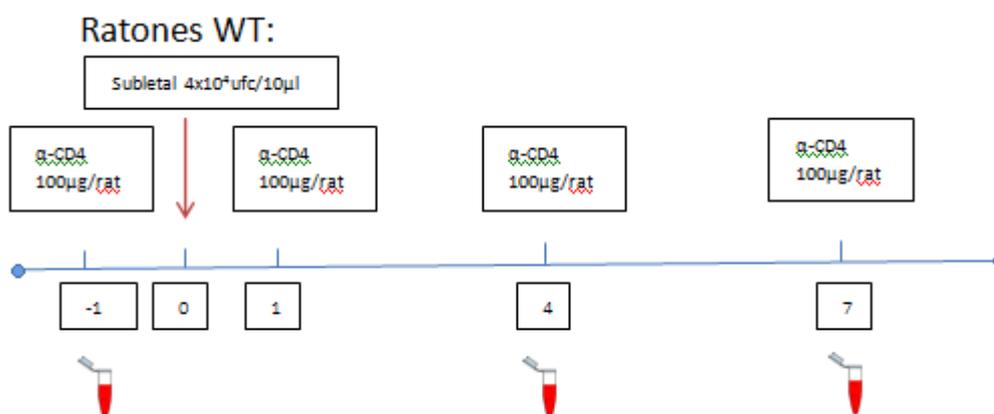
Figura 7. Anticuerpos específicos contra PnPs1 en animales colonizados WT e *Il17a*^{-/-}.

Detección de anticuerpos IgM (A) e IgG (B) específicos contra el polisacárido capsular de *S.pneumoniae* serotipo 1 (PnPs1) en suero de animales salvajes (WT: línea llena) e *Il17a*^{-/-} (línea punteada) infectados con una dosis subletal de Pn1 (4.0×10^4 ufc/10ul). Se obtuvieron muestras a los días 2, 4, 8, 16, 36, 67 luego de la infección subletal. Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de ratones para ese día (Test de Man Whitney). Las barras representan la Media \pm SEM de 7 animales por grupo.

6.3. Anticuerpos específicos contra polisacárido 1 en condiciones de depleción de células CD4+.

En esta oportunidad quisimos evaluar el rol de las células TCD4 en la producción de anticuerpos contra *S. pneumoniae* luego de una dosis subletal con el serotipo 1. Este serotipo tiene la particularidad de poseer un polisacárido zwitteriónico y por ende puede ser presentado en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y de esta forma interactuar y activar células T CD4+ (Cobb & Kasper, 2005).

Para tener una primera aproximación sobre el rol de éstas células en etapas tempranas de colonización por *S. pneumoniae*, se trabajó con 2 grupos de ratones salvajes. En uno de los grupos se realizó la depleción temporal de células CD4⁺. Para llevar a cabo ésta depleción se utilizó un anticuerpo anti-CD4 el cual fue administrado vía intraperitoneal el día previo a la infección subletal y los días posteriores, (1, 4 y 7) para mantener la depleción en el tiempo. En cada uno de estos días se tomaron muestras de sangre de ambos grupos con el fin de comparar los títulos de anticuerpos específicos contra PnPS1 producidos en respuesta a la infección. A continuación se muestra el esquema experimental.



En la figura 8 se observan los niveles de anticuerpos IgM (A) e IgG (B) específicos contra PnPs1 producidos por la cepa salvaje y por la cepa deficiente en células TCD4 en los tiempos

determinados del experimento. En la figura 8C se muestra una comparación en barras, solamente del día 7.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que hasta el día 4 ambos grupos de ratones tienen los mismos niveles de anticuerpos tanto para IgM como para IgG. Sin embargo al día 7 hay un incremento en los niveles de ambos tipos de anticuerpos producidos por la cepa salvaje cuyas células TCD4 han sido depletadas. Este resultado sugiere que de alguna manera las CD4 regulan la producción de anticuerpos.

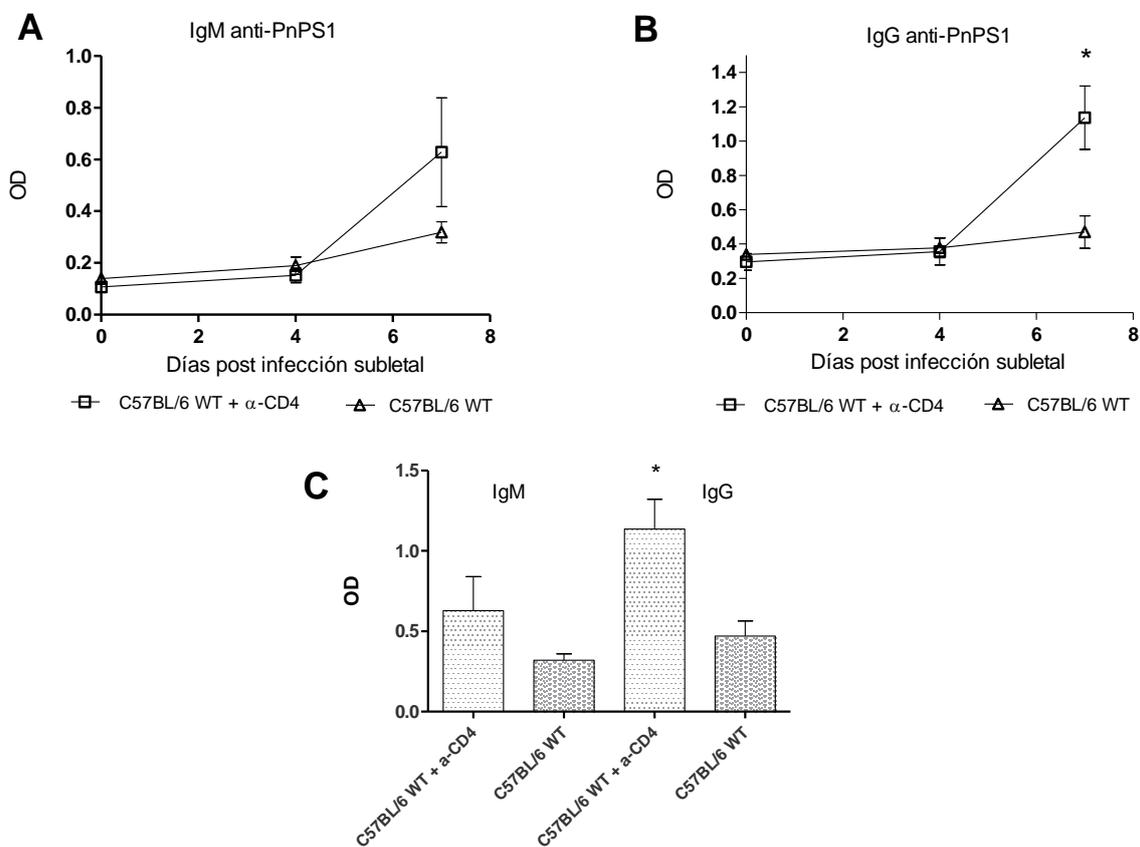


Figura 8. Anticuerpos específicos contra PnPS1 en animales salvajes y animales depletados de células TCD4+. (A) Detección de anticuerpos IgM anti-PnPS1, y (B) IgG anti-PnPS1 en suero de animales salvajes (cuadrado) y animales salvajes con anti-CD4 (triángulo) infectados con una dosis subletal de Pn1 (4.0×10^4 ufc/10ul). Se obtuvieron muestras a los días 1, 4 y 7 luego de la infección subletal. (C) Gráfico comparativo de los niveles de IgM e IgG anti PnPS1 obtenidos al día 7 post infección. Los asteriscos denotan que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de ratones para ese día (Test de Man Whitney). Las barras representan la Media \pm SEM de 8 animales por grupo.

6.4. Restablecimiento del fenotipo salvaje en animales deficientes en *IL17a*.

Para llevar a cabo éste último objetivo formamos 4 grupos de animales deficientes en *IL17a*. Estos animales *IL17a*^{-/-} formaban parte de un experimento de cinética de carga bacteriana que se encontraba en el día 21. Esto quiere decir que, como se puede observar en la figura 9, todos los animales *IL17a*^{-/-} se encuentran colonizados mientras que los ratones salvajes ya eliminaron su colonización. Todos recibieron la misma dosis subletal de neumococo serotipo 1, con la diferencia de que 3 de esos grupos recibieron distintas dosis de interleuquina 17 recombinante (IL-17r). Dado que no hay suficiente información en bibliografía sobre ensayos de restablecimiento de fenotipo salvaje con animales *IL17a*^{-/-} decidimos probar con distintas dosis de IL-17A recombinante, con una diferencia de tres días entre cada una de ellas. Las dosis que recibió cada grupo se pueden observar en la figura a continuación. Todas ellas tuvieron un volumen final de 5µl. Se utilizaron dos grupos control para poder comparar si efectivamente se restablecía el fenotipo salvaje. Para poder llevar a cabo la comparación se realizaron NAL al día siguiente de la segunda dosis (a ésta altura los ratones llevaban 25 días colonizados). En el siguiente gráfico se puede observar el logaritmo en base 10 de la carga bacteriana en NAL en los cuatro grupos de animales.

Como se observa en el gráfico, sólo el grupo de animales que recibió 0.1µg y 1.0µg de IL-17A recombinante, se asemejó al comportamiento que tiene la cepa salvaje. Dentro de ese grupo, dos ratones efectivamente eliminan la carga bacteriana mientras que el tercero permanece colonizado manteniéndose al mismo nivel de carga que el grupo control. Los otros dos grupos de ratones no solo no logran restablecer el fenotipo, sino que tampoco logran disminuir la carga bacteriana que les fue inoculada.

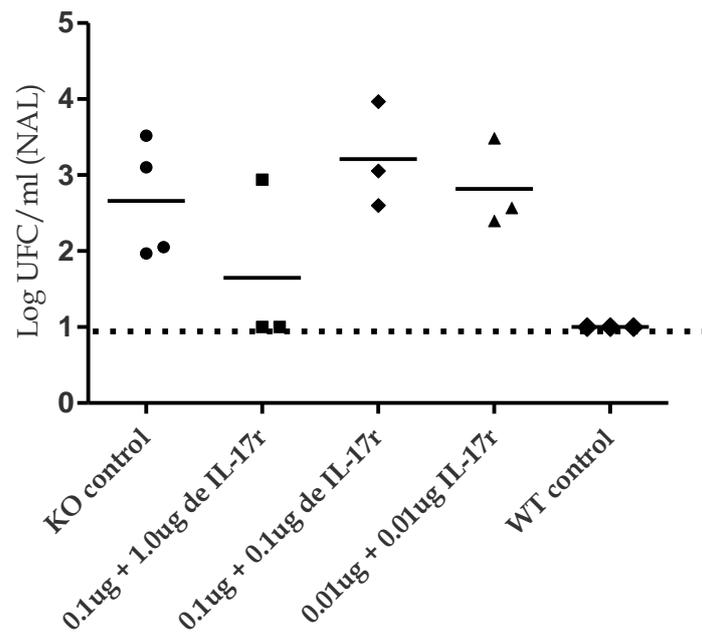


Figura 9. Restablecimiento del fenotipo salvaje en animales deficientes para *Il17a*.

Se muestra el log en base 10 de la carga bacteriana en nasofaringe luego de una dosis subletal de *S. pneumoniae* serotipo 1, en función de los cinco grupos de animales, 4 de ellos deficientes para *Il17a*. Tres de esos grupos recibieron dos dosis distintas de IL-17 recombinante. Las barras horizontales representan la Media \pm SEM de 4 animales por grupo (en el caso de grupo control) y 3 animales por grupo (para los otros 3 grupos)

7. Discusión y conclusiones

Como se vio en la sección 3.7, las primeras evidencias que vincularon la producción de IL-17 con la infección, surgieron en el año 2000, previo al establecimiento del concepto del nuevo linaje Th17. Posteriormente Malley y su equipo de trabajo fueron los primeros en comunicar que la IL-17 cumplía un rol central en la infección por *S. pneumoniae* (Malley *et al*, 2005a). Con el objetivo de mostrar más fehacientemente la relevancia de esta citoquina en la protección contra neumococo, nuestro laboratorio fue el primero en trabajar con la cepa C57BL/6 deficiente en *Il17a*. Resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en modelos murinos de neumonía aguda, mostraron una elevada expresión de *Il17a* (e *Infg*) en animales protegidos en comparación con animales no protegidos. Sugiriendo esto que la regulación positiva de *Il17a* y la regulación de la expresión de genes relacionados con IFN- γ , en conjunto con el desarrollo de una respuesta de células Th17, son características relevantes de la inmunidad protectora contra la neumonía aguda por *S. pneumoniae* (Marqués *et al*, 2012).

Para profundizar aún más en el rol que esta citoquina cumple en la infección por *S. pneumoniae*, este trabajo tuvo como objetivo general evaluar el rol de IL-17A en la respuesta inmune frente a la colonización por *S. pneumoniae*.

Considerando la existencia de más de 90 serotipos de neumococo que han mostrado comportamientos diferentes en modelos experimentales, decidimos trabajar con varios serotipos de neumococo. Para la selección de éstos se consideró el impacto de los mismos en nuestra región en los últimos tiempos. Actualmente, el serotipo de mayor frecuencia en nuestro país es el serotipo 1, seguido por el serotipo 3, entre otros. Si bien los serotipos 23F y 14 no son de los más prevalentes en la actualidad, en el pasado, fueron de los más aislados a partir de muestras clínicas de ENIs de niños pre-escolares, sobre todo el serotipo 14. Nuestros resultados muestran que ninguno de los cuatro serotipos fue eliminado con éxito por parte de la cepa de ratones deficientes en *Il17a*. Si bien en los ratones *Il17a*^{-/-} infectados

con los serotipos 3 y 14 (fig. 6.A y 6.C, respectivamente), se observa una reducción de la carga bacteriana nasofaríngea en comparación con el día cero, éstos no eliminan la colonización nasofaríngea. Esto queda bien claro en los resultados obtenidos para la infección subletal con los serotipos 23F y 1 (figura 6.B y Figura 5, respectivamente), donde se observa un leve descenso de la carga bacteriana entre la segunda y tercer semana luego de la infección y luego aumenta claramente llegando inclusive a superar la dosis inicial del inóculo subletal (4×10^4 ufc/10 μ l). Sin embargo, en los grupos de cepas salvajes, salvo por la respuesta contra el serotipo 14, los ratones controlan la infección subletal inducida con los serotipos 1, 23F y 3, eliminando por completo la carga bacteriana de nasofaringe. En el caso del serotipo 1 se observa una disminución sostenida de la carga bacteriana llegando a la erradicación de neumococo de la nasofaringe. En el caso del serotipo 14, la cinética de carga bacteriana muestra que al día 42, si bien el grupo salvaje tiene valores cercanos al límite de detección de la técnica, aún permanecen colonizados. Si hubiésemos tenido más ratones para continuar el experimento habríamos podido evaluar la carga bacteriana a tiempos posteriores al día 42. Sin embargo, suponemos que la cepa salvaje habría eliminado la colonización mientras que la deficiente en *Il17a* permanecería colonizada.

Dado el comportamiento de ambos grupos de ratones, es concluyente que IL-17A cumple un rol esencial en la eliminación de la carga nasofaríngea luego de una infección subletal con *S. pneumoniae*. Esto podría deberse a una de las funciones más importantes de la IL-17A es la de inducir reclutamiento de neutrófilos a través de la producción de GM-SCF (granulocyte colony stimulating factor) y quimioquinas como CXCL8/IL8 (Ye *et al*, 2001; Dong, 2008; Ivanov & Manel, 2010).

Resultados previos en nuestro laboratorio en modelos animales de protección frente a la infección por neumococo, mostraron que existe una relación clara entre IL-17A y la producción de anticuerpos en una respuesta secundaria en un modelo de protección contra neumococo. Basándonos en estos antecedentes, decidimos estudiar los niveles de anticuerpos específicos producidos contra la cápsula polisacáridica de *S. pneumoniae* serotipo 1 en ratones salvajes y ratones *Il17a*^{-/-} durante la colonización

Un tema que ha dado lugar a mucha controversia en los últimos años es si la protección contra la colonización está dada por la respuesta humoral sistémica o por la respuesta

celular, TDC4+ dependiente, o por ambas. Por un lado, grupos de investigación afirman que la protección contra la colonización inducida con distintos serotipos de *S. pneumoniae* es independiente la respuesta de anticuerpos anticapsulares y dependiente de células TCD4+ (Basset *et al*, 2007b; Malley *et al*, 2006, 2005b). Por otro lado, algunos autores sugieren que la respuesta de anticuerpos contra *S. pneumoniae* no sólo es necesaria sino que también es suficiente para proteger contra la colonización y que si bien la colonización induce células Th17, éstas no son necesarias para eliminar la colonización (Cohen *et al*, 2011). Sin embargo, Kadioglu propone que ambas respuestas, tanto la humoral sistémica y de mucosas como la celular, son importantes en la protección a largo plazo contra la colonización (Richards *et al*, 2010). Nuestro grupo de investigación coincide en que ambas respuestas son necesarias para una efectiva protección contra la colonización por *S. pneumoniae*.

Como se vio en la sección 6.1.1, para poder comparar los niveles de anticuerpos específicos contra PnPs1 producidos por ambos grupos de ratones, salvajes e *Il17a^{-/-}*, se tomaron muestras de sangre a distintos tiempos y el suero se analizó con la técnica de ELISA, utilizando un protocolo específico para la detección de anticuerpos dirigidos contra la cápsula polisacáridica del serotipo 1. Los ratones utilizados fueron los mismos que para el experimento de cinética de eliminación de carga bacteriana con el fin de aprovechar al máximo la utilización del ratón.

En la figura 7, se puede apreciar que a tiempos tempranos ambos grupos de ratones producen niveles similares de anticuerpos. La diferencia se establece en el día 16 en donde se observa que los niveles de IgM e IgG producidos por la cepa salvaje alcanzan su pico máximo marcando una diferencia estadísticamente significativa en comparación con la producción de anticuerpos por los ratones *Il17a^{-/-}*. A su vez, es interesante notar que el pico en la producción de anticuerpos anti PnPs1 por parte de la cepa salvaje, se da al mismo tiempo que estos animales eliminan casi por completo la colonización nasofaríngea por neumococo (fig. 5). Este resultado puntual estaría sugiriendo que los anticuerpos específicos contra PnPs1 colaboran, junto con otros factores celulares, con la eliminación de carga bacteriana en nasofaringe. Siguiendo con el análisis de la figura 7, se puede observar que los valores se invierten y que al día 67 los animales *Il17a^{-/-}* presentan mayor niveles de anticuerpos que los animales salvajes siendo ésta diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, volviendo al gráfico de cinética de carga (fig.5) vemos que pese a éste título de anticuerpos,

los animales deficientes para *Il17a* no logran eliminar la colonización. Tal vez, pese a lograr niveles altos de anticuerpos, éstos ya no son suficientes para combatir al neumococo. Finalmente, esta diferencia observada a nivel de la producción de anticuerpos anti-PnPS1 a las 2 semanas después de la inoculación no es suficiente para concluir sobre la relación de la IL-17A y la producción de anticuerpos durante una infección primaria.

La pregunta que surgió a continuación fue si las células TCD4 incidían directamente en la producción de anticuerpos en animales salvajes infectados con una dosis subletal de *S. pneumoniae* serotipo 1. Como se mencionó en la introducción, el polisacárido capsular tiene la particularidad de ser zwitteriónico (ZPS). Este tipo de polisacárido tiene una carga positiva y otra negativa en cada unidad repetida, por lo que su carga global es neutra. Su disposición tridimensional permite que estos ZPS puedan ser presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y de esta forma pueden interactuar y activar células T CD4+, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kalka-Moll *et al*, 2000; Cobb *et al*, 2004; Cobb & Kasper, 2005).

Para poder determinar si estas células CD4⁺ están involucradas directamente en la generación de la respuesta primaria de anticuerpos anti-PS1, se utilizaron dos grupos de ratones salvajes, en donde a uno de ellos se les depletó, temporalmente, de células TCD4 como se describe en la sección 6.3. En una primera instancia esperábamos que la producción de anticuerpos IgM e IgG específicos contra PnPS1 por parte de los animales depletados fuera menor que los ratones salvajes. Para nuestra sorpresa el resultado fue totalmente opuesto. Como se puede observar en la figura 8 hasta el día 4 ambos grupos de ratones se comportan de igual manera, generando niveles de anticuerpos similares. La diferencia se establece en el día 7 y fue por ese motivo que se hizo un gráfico de columnas comparando únicamente los anticuerpos específicos anti PnPS1 generados por ambos grupos de ratones al día 7. Cabe recordar que la cantidad de anticuerpo secretado por células plasmáticas, y la clonación de estas mismas células la primera vez que entra en contacto el receptor con el antígeno, encuentra su máximo aproximadamente a los 7 días de la primera infección (5-10 días). Por ende, era de esperar que a la semana de la inoculación notáramos un cambio en la producción de anticuerpos. Para nuestro asombro ese cambio fue notorio para la cepa

depletada de TCD4, quienes produjeron niveles de anticuerpos significativamente superiores a los de la cepa salvaje.

Este experimento fue realizado para tener una primera aproximación con lo que sucede a nivel de la respuesta humoral primaria en animales depletados de células TCD4+, previamente colonizados con *S. pneumoniae* serotipo 1. Es por éste motivo que no es posible emitir una conclusión, pero sí hacer suposiciones de lo que puede estar sucediendo y también pensar que controles podemos agregar a éste experimento para en un futuro ahorrarnos interrogantes. Por un lado, si bien sabemos que el anticuerpo anti-CD4 producido en el laboratorio depleta efectivamente células TCD4, es de orden confirmar la depleción mediante citometría de flujo. Por otro lado, otro control necesario para éste tipo de ensayos es el control isotópico (control negativo) para asegurar que el efecto observado no se deba simplemente al agregado exógeno de tal cantidad de anticuerpo.

Al depletar las células TCD4, se están depletando muchas poblaciones celulares, entre las que se encuentran las células dendríticas, células NK (del inglés: *natural killer*), linfocitos T colaboradores, células T reguladoras, células Th17, etc.

En base a nuestros resultados podemos suponer que las Tregs estarían actuando como un modulador negativo de la expresión de anticuerpos y es por éste motivo que al eliminarlas los niveles de anticuerpos se dispararían. Este experimento va a ser repetido a la brevedad contemplando todas las interrogantes propuestas anteriormente, diseñándolo de manera de poder obtener un resultado más concluyente. De todos modos no deja de ser un resultado muy interesante.

Finalmente, hicimos un primer ensayo para evaluar si era posible restablecer el fenotipo salvaje en animales deficientes para *Il17a*^{-/-} mediante la administración de IL-17 recombinante (IL-17r) (sección 4.9). Como se puede observar en la figura 9, la dosis de 0.1µg/5µl + 1.0µg/5µl de IL-17r fue la que hizo que los ratones *Il17a*^{-/-} tuvieran un comportamiento similar al de la cepa salvaje. Este es otro experimento a repetir en el futuro cercano, no pudimos hacerlo antes porque no disponíamos de más IL-17 recombinante. De poder lograr el restablecimiento del fenotipo salvaje estaríamos demostrando de manera elegante y fehaciente la importancia de IL-17 en la protección contra la colonización.

Finalmente, estos resultados generados en una cepa $Il17a^{-/-}$ demuestran que más allá de la importancia de las células Th17 demostrada por otros autores en modelos de protección, la IL-17A sería esencial para una adecuada limpieza de la colonización primaria por neumococo.

8. Referencias bibliográficas

- Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, Akira S, Normark S & Henriques-Normark B (2007) Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell. Microbiol.* **9**: 633–44
- Albiger B, Sandgren A, Katsuragi H, Meyer-Hoffert U, Beiter K, Wartha F, Hornef M, Normark S & Normark BH (2005) Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. *Cell. Microbiol.* **7**: 1603–15
- Arredouani MS & Kobzik L (2004) The structure and function of marco, a macrophage class a scavenger receptor. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **50 Online**: OL657–65
- Bagnoli F, Moschioni M, Donati C, Dimitrovska V, Ferlenghi I, Facciotti C, Muzzi A, Giusti F, Emolo C, Sinisi A, Hilleringmann M, Pansegrau W, Censini S, Rappuoli R, Covacci A, Massignani V & Barocchi MA (2008) A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J. Bacteriol.* **190**: 5480–92
- Balachandran P, Hollingshead SK, Paton JC & Briles DE (2001) The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J. Bacteriol.* **183**: 3108–16
- Basset A, Thompson CM, Hollingshead SK, Briles DE, Ades EW, Lipsitch M & Malley R (2007a) Antibody-independent, CD4+ T-cell-dependent protection against pneumococcal colonization elicited by intranasal immunization with purified pneumococcal proteins. *Infect. Immun.* **75**: 5460–4
- Basset A, Thompson CM, Hollingshead SK, Briles DE, Ades EW, Lipsitch M & Malley R (2007b) Antibody-independent, CD4+ T-cell-dependent protection against pneumococcal colonization elicited by intranasal immunization with purified pneumococcal proteins. *Infect. Immun.* **75**: 5460–4
- Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA, Samuel G, Skovsted IC, Kalltoft MS, Barrell B, Reeves PR, Parkhill J & Spratt BG (2006) Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet.* **2**: e31

- Berry AM & Paton JC (2000) Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect. Immun.* **68**: 133–40
- Bjarnarson SP, Jakobsen H, Del Giudice G, Trannoy E, Siegrist C-A & Jonsdottir I (2005) The advantage of mucosal immunization for polysaccharide-specific memory responses in early life. *Eur. J. Immunol.* **35**: 1037–45
- Bogaert D, Groot R De & Hermans PWM (2004a) *Streptococcus pneumoniae* colonisation
Streptococcus pneumoniae colonisation : the key to pneumococcal disease. **4**: 144–154
- Bogaert D, Groot R De & Hermans PWM (2004b) *Streptococcus pneumoniae* colonisation
Streptococcus pneumoniae colonisation : the key to pneumococcal disease. **4**: 144–155
- Bogaert D, Thompson CM, Trzcinski K, Malley R & Lipsitch M (2010) The role of complement in innate and adaptive immunity to pneumococcal colonization and sepsis in a murine model. *Vaccine* **28**: 681–5
- Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, Walport MJ & 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**: 16969–74
- Bruyn GA & van Furth R (1991) Pneumococcal polysaccharide vaccines: indications, efficacy and recommendations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**: 897–910
- Chabalgoity JA, Baz A, Rial A & Grille S The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**: 195–207
- Chang SH & Dong C (2009) IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine* **46**: 7–11
- Charalambous BM & Leung MH (2012) Pneumococcal sepsis and nasopharyngeal carriage. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **18**: 222–7
- Clarke TB, Francella N, Huegel A & Weiser JN (2011) Invasive bacterial pathogens exploit TLR-mediated downregulation of tight junction components to facilitate translocation across the epithelium. *Cell Host Microbe* **9**: 404–14
- Du Clos TW & Mold C (2004) C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity. *Immunol. Res.* **30**: 261–77
- Cobb B a & Kasper DL (2005) Zwitterionic capsular polysaccharides: the new MHCII-dependent antigens. *Cell. Microbiol.* **7**: 1398–403
- Cobb B a, Wang Q, Tzianabos AO & Kasper DL (2004) Polysaccharide processing and presentation by the MHCII pathway. *Cell* **117**: 677–87

- Cockeran R, Anderson R & Feldman C (2005) Pneumolysin as a vaccine and drug target in the prevention and treatment of invasive pneumococcal disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **53**: 189–98
- Cohen JM, Khandavilli S, Camberlein E, Hyams C, Baxendale HE & Brown JS (2011) Protective contributions against invasive *Streptococcus pneumoniae* pneumonia of antibody and Th17-cell responses to nasopharyngeal colonisation. *PLoS One* **6**: e25558
- Craig A, Mai J, Cai S & Jeyaseelan S (2009) Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* **77**: 568–75
- Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, Quail M a, Burton J, van der Linden M, McGee L, von Gottberg A, Song JH, Ko KS, Pichon B, Baker S, Parry CM, Lambertsen LM, Shahinas D, Pillai DR, Mitchell TJ, Dougan G, Tomasz A, Klugman KP, *et al* (2011) Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* **331**: 430–4
- DÍAZ* EJCJSLGMTRES D (2009) Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares. *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.* **22**: 366–378
- Dong C (2008) TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 337–48
- Dramsı S, Magnet S, Davison S & Arthur M (2008) Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 307–20
- Ghaffar F, Friedland IR & McCracken GH (1999) Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18**: 638–46
- Ghaffar F, Muniz LS, Katz K, Smith JL, Shouse T, Davis P & McCracken GH (2002) Effects of large dosages of amoxicillin/clavulanate or azithromycin on nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, nonpneumococcal alpha-hemolytic streptococci, and *Staphylococcus aureus* in children with acute otitis media. *Clin. Infect. Dis.* **34**: 1301–9
- Gould JM & Weiser JN (2001) Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. *Infect. Immun.* **69**: 1747–54
- Gould JM & Weiser JN (2002) The inhibitory effect of C-reactive protein on bacterial phosphorylcholine platelet-activating factor receptor-mediated adherence is blocked by surfactant. *J. Infect. Dis.* **186**: 361–71
- Gu C, Wu L & Li X (2013) IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* **64**: 477–85
- Harvey RM, Ogunniyi AD, Chen AY & Paton JC (2011) Pneumolysin with low hemolytic activity confers an early growth advantage to *Streptococcus pneumoniae* in the blood. *Infect. Immun.* **79**: 4122–30
- Hortal M, Estevan M, Laurani H, Iraola I & Meny M (2012) Hospitalized children with pneumonia in Uruguay: pre and post introduction of 7 and 13-valent pneumococcal conjugated vaccines into the National Immunization Program. *Vaccine* **30**: 4934–8

[Http://www.msal.gov.ar/](http://www.msal.gov.ar/) Portal del Ministerio de Salud de la Nacion.

- Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, Maruoka M, Mao W, Foster J, Kelley RF, Pan G, Gurney AL, de Vos AM & Starovasnik MA (2001) IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J.* **20**: 5332–41
- Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC & Kamradt T (2000) Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* **165**: 6107–15
- 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 mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* **30**: 108–19
- Ivanov II & Manel N (2010) [Induction of gut mucosal Th17 cells by segmented filamentous bacteria]. *Med. Sci. (Paris)*. **26**: 352–5
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ & Littman DR (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**: 1121–33
- Jambo KC, Sepako E, Heyderman RS & Gordon SB (2010) Potential role for mucosally active vaccines against pneumococcal pneumonia. *Trends Microbiol.* **18**: 81–9
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC & Andrew PW (2008a) The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 288–301
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC & Andrew PW (2008b) The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 288–301
- Kalka-Moll WM, Tzianabos AO, Wang Y, Carey VJ, Finberg RW, Onderdonk AB & Kasper DL (2000) Effect of molecular size on the ability of zwitterionic polysaccharides to stimulate cellular immunity. *J. Immunol.* **164**: 719–24
- Kaplan MH & Volanakis JE (1974) Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J. Immunol.* **112**: 2135–47
- Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F & Huang S-K (2004) IL-17 cytokine family. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**: 1265–73; quiz 1274
- Käyhty H, Auranen K, Nohynek H, Dagan R & Mäkelä H (2006) Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. *Expert Rev. Vaccines* **5**: 651–67
- Kerr AR, Paterson GK, Riboldi-Tunncliffe A & Mitchell TJ (2005) Innate immune defense against pneumococcal pneumonia requires pulmonary complement component C3. *Infect. Immun.* **73**: 4245–52

- Khader S a, Gaffen SL & Kolls JK (2009) Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.* **2**: 403–11
- Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X & Reinecker HC (2000) Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* **118**: 1001–11
- Knapp S, Wieland CW, van 't Veer C, Takeuchi O, Akira S, Florquin S & van der Poll T (2004) Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J. Immunol.* **172**: 3132–8
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA & Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **201**: 233–40
- Lee KS, Scanga C a, Bachelder EM, Chen Q & Snapper CM (2007) TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*. *Cell. Immunol.* **245**: 103–10
- Li Y, Weinberger DM, Thompson CM, Trzcinski K & Lipsitch M (2013) Surface Charge of *Streptococcus pneumoniae* Predicts Serotype Distribution. *Infect. Immun.*
- Lindberg B, Lindqvist B, Lönngrén J PD (1980) Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 1. *Carbohydr. Res.* **78**: 111–117
- Lipsitch M, Dykes JK, Johnson SE, Ades EW, King J, Briles DE & Carlone GM (2000) Competition among *Streptococcus pneumoniae* for intranasal colonization in a mouse model. *Vaccine* **18**: 2895–901
- Lockhart E, Green AM & Flynn JL (2006) IL-17 production is dominated by gamma delta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* **177**: 4662–9
- Lu Y, Leite L, Gonçalves VM, Dias WDO, Fratelli F, Alderson M, Tate A, Robertson G, Graca R, Sayeed S, Claudette M, Anderson P & Malley R No Title. **28**: 7468–7475
- Lu Y-J, 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**: 2076–83
- Lu Y-J, Gross J, Bogaert D, Finn A, Bagrade L, Zhang Q, Kolls JK, Srivastava A, Lundgren A, Forte S, Thompson CM, Harney KF, Anderson PW, Lipsitch M & Malley R (2008) Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog.* **4**: e1000159
- Luzza F, Parrello T, Monteleone G, Sebkova L, Romano M, Zarrilli R, Imeneo M & Pallone F (2000) Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *J. Immunol.* **165**: 5332–7
- Lysenko ES, Ratner AJ, Nelson AL & Weiser JN (2005) The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces. *PLoS Pathog.* **1**: e1

- Malley R (2010) Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: implications for vaccine development. *J. Mol. Med. (Berl)*. **88**: 135–42
- Malley R & Anderson PW (2012) Serotype-independent pneumococcal experimental vaccines that induce cellular as well as humoral immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 3623–7
- Malley R, Srivastava A, Lipsitch M, Thompson CM, Watkins C, Tzianabos A & Anderson PW (2006) Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide. *Infect. Immun.* **74**: 2187–95
- Malley R, Trzcinski K, Srivastava A, Thompson CM, Anderson PW & Lipsitch M (2005a) CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 4848–53
- Malley R, Trzcinski K, Srivastava A, Thompson CM, Anderson PW & Lipsitch M (2005b) CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 4848–53
- Marqués JM, Rial A, Muñoz N, Pellay F-X, Van Maele L, Léger H, Camou T, Sirard J-C, Benecke A & Chabalgoity J a (2012) Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN- γ -mediated immunity. *Immunobiology* **217**: 420–9
- Martner A, Skovbjerg S, Paton JC & Wold AE (2009) *Streptococcus pneumoniae* autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines. *Infect. Immun.* **77**: 3826–37
- Matsuzaki G & Umemura M (2007) Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol. Immunol.* **51**: 1139–47
- McCool TL & Weiser JN (2004) Limited role of antibody in clearance of *Streptococcus pneumoniae* in a murine model of colonization. *Infect. Immun.* **72**: 5807–13
- McGeachy MJ & Cua DJ (2008) Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* **28**: 445–53
- Mehtälä J, Antonio M, Kaltoft MS, O'Brien KL & Auranen K (2013) Competition Between *Streptococcus pneumoniae* Strains: Implications for Vaccine-Induced Replacement in Colonization and Disease. *Epidemiology*
- Microbiología G (2012) Instituto Nacional de Salud Colombia Procedimientos para el diagnóstico de Neumonías y Meningitis Bacterianas y la caracterización de cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* , SIREVA II.
- Mitchell AM & Mitchell TJ (2010) *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**: 411–8
- Mitchell AM MT (2011) *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation.
- MPS (2011) Lineamientos Técnicos y Operativos para la Universalización de la Vacuna Contra el Neumococo en el Esquema del Programa Ampliado de Inmunizaciones Colombia 2011. : 1–39

- Muñoz N, Van Maele L, Marqués JM, Rial A, Sirard J-C & Chabalgoity J a (2010) Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect. Immun.* **78**: 4226–33
- 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**: 375–87
- Napolitani G, Acosta-Rodriguez E V, Lanzavecchia A & Sallusto F (2009) Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **39**: 1301–12
- Paterson GK & Mitchell TJ (2006) Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology* **152**: 285–93
- Peck A & Mellins ED (2010) Precarious balance: Th17 cells in host defense. *Infect. Immun.* **78**: 32–8
- Pérez-Dorado I, Galan-Bartual S & Hermoso J a (2012) Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Mol. Oral Microbiol.* **27**: 221–45
- Pericone CD, Overweg K, Hermans PW & Weiser JN (2000) Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect. Immun.* **68**: 3990–7
- Van der Poll T & Opal SM (2009) Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**: 1543–56
- Prado V (2001) Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. **18**: 6–9
- Quián J (2010) Actualizaciones del Certificado Esquema de Vacunación . Perspectivas a futuro en vacunación en la niñez. **81**: 34–45
- Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, Godinez I, Sankaran S, Paixao T a, Gordon M a, Kolls JK, Dandekar S & Bäumlér AJ (2008) Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat. Med.* **14**: 421–8
- Richards L, Ferreira DM, Miyaji EN, Andrew PW & Kadioglu A (2010) The immunising effect of pneumococcal nasopharyngeal colonisation; protection against future colonisation and fatal invasive disease. *Immunobiology* **215**: 251–63
- Roche AM, King SJ & Weiser JN (2007) Live attenuated *Streptococcus pneumoniae* strains induce serotype-independent mucosal and systemic protection in mice. *Infect. Immun.* **75**: 2469–75
- Rossum AMC Van, Lysenko ES & Weiser JN Host and Bacterial Factors Contributing to the Clearance of Colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a Murine Model. : 7718–7726
- Song JY, Nahm MH & Moseley MA (2013) Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. *J. Korean Med. Sci.* **28**: 4–15

- Ton-That H, Mazmanian SK, Faull KF & Schneewind O (2000) Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Sortase catalyzed in vitro transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH(2)-Gly(3) substrates. *J. Biol. Chem.* **275**: 9876–81
- Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE & Szalai AJ (1999) Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **67**: 4720–4
- Washington DC, Sanitaria V & Internacionales RS (2011a) Informe Regional de SIREVA II , 2011 : Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de.
- Washington DC, Sanitaria V & Internacionales RS (2011b) Informe Regional de SIREVA II , 2010 : Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de
- Weiser JN, Bae D, Fasching C, Scamurra RW, Ratner AJ & Janoff EN (2003) Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 4215–20
- Wernette CM, Frasch CE, Madore D, Carlone G, Goldblatt D, Plikaytis B, Benjamin W, Quataert SA, Hildreth S, Sikkema DJ, Käyhty H, Jonsdottir I & Nahm MH (2003) Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**: 514–9
- Who WHO (2007) World Health Report. *World* **2008**: 96 Available at: <http://media.ft.com/cms/aa1641a8-9cdb-11e0-bf57-00144feabdc0.pdf>
- Xu F, Droemann D, Rupp J, Shen H, Wu X, Goldmann T, Hippenstiel S, Zabel P & Dalhoff K (2008) Modulation of the inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in a model of acute lung tissue infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **39**: 522–9
- Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR, Schwarzenberger P, Shellito JE & Kolls JK (2001) Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**: 335–40
- Zhao H, Kang C-I, Rouse MS, Patel R, Kita H & Juhn YJ (2011) The Role of IL-17 in the Association between Pneumococcal Pneumonia and Allergic Sensitization. *Int. J. Microbiol.* **2011**: 709509
- Zheng Y, Valdez P a, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ & Ouyang W (2008) Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* **14**: 282–9