

Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



**Evaluación de la respuesta inmune protectora contra  
Metapneumovirus humano inducida por el prototipo de vacuna  
compuesto por la nucleoproteína N más el adyuvante AbISCO-100**

Memoria presentada a la Universidad de Chile para optar al título  
profesional de Bioquímico

**Francisco Javier Ibáñez Iribarra**

Profesor Patrocinante:  
Daniela Seelenfreund Hirsch  
Profesor Asociado  
Depto. de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

Director de memoria:  
Dr. Abel Vasquez Veloso  
Sección Biotecnología.  
Instituto de Salud Pública de Chile

Codirector de memoria:  
Dr. Alexis Kalergis Parra  
Profesor Titular  
Facultad de Ciencias Biológicas.  
Facultad de Medicina  
Pontificia Universidad Católica de Chile

2016

**A Rafael y Máximo**

**Lo mejor de mi vida**

### **Agradecimientos**

Esta memoria representa el término de largos años de estudio y esfuerzo, durante los cuales he recibido el apoyo y confianza de familiares y amigos quienes me han acompañado en todo momento.

Ha sido un proceso de mucho aprendizaje, no solamente teórico sino también práctico. De aprender a concentrarme en circunstancias difíciles y no rendirme jamás. De encontrar refugio y placer en el estudio de las células inmunes, con la confianza de que mi quehacer dará origen a algo útil a la sociedad. Nada de lo que soy ahora sería posible sin el eterno apoyo de mis padres María Eugenia y Renán quienes sin a veces comprender mis elecciones en la vida me han apoyado hasta el final y me han ayudado a hacer de mi camino la aventura intelectual que siempre busqué.

Quiero agradecer al profesor Abel Vásquez mi tutor de tesis, quien me recibió sin conocerme en su laboratorio de inmunobiológicos en el Instituto de Salud Pública de Chile y se transformó en un enorme apoyo a nivel académico y personal durante todo el tiempo que estuve trabajando ahí y después de salir también. Quiero agradecer a Daniel Soto quien me enseñó a trabajar con animales y a vivir el día laboral con sentido del humor.

Quiero agradecer también al Dr. Alexis Kalergis quien me ha dado la oportunidad de crecer profesionalmente, dándome su apoyo de diversas maneras y permitiéndome participar del Instituto Milenio de Inmunología. Un baluarte fundamental de la Inmunología en Chile.

Quiero agradecer también a Jorge Soto por su amistad y apoyo.

Finalmente quiero agradecer a Vanessa por todo su apoyo y por haber catalizado con su energía la mayor síntesis biológica y espiritual de mi vida, mis amados gemelos Máximo y Rafael.

## Abreviaturas

ACK	Búffer de Lisis de Eritrocitos
APC	Célula Presentadora de Antígenos ( <i>Antigen Presenting Cell</i> )
ARTI	Infección aguda al tracto respiratorio ( <i>Acute respiratory tract infection</i> )
BCIP/NBT	Sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato/ cloruro de tetrazolio nitro-azul
BSA	Albúmina Sérica de Bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
cDNA	DNA complementario
CTL	Linfocito T citotóxico ( <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i> )
DC	Célula Dendrítica ( <i>Dendritic Cell</i> )
ELISA	Ensayo de Inmuno Absorción Ligado a Enzimas ( <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
FACS	Citometría de Flujo ( <i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i> )
FITC	Fluoresceína Isotiocianato
hMPV	Metapneumovirus Humano ( <i>Human Metapneumovirus</i> )
IP	Intraperitoneal
IFN- $\gamma$	Interferón Gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IL-10	Interleuquina-10
IL-17	Interleuquina-17
IL-4	Interleuquina-4
IMAC	Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados ( <i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i> )
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
ISCOM	Complejo inmunoestimulante ( <i>immuno stimulant complex</i> )
kDa	Kilo Dálton
LB	Luria-Bertani

LRTI	Infecciones respiratorias al tracto inferior (Lower respiratory tract infection)
mA	Miliamperes
NaOH	Hidróxido de Sodio
OD <sub>600</sub>	Densidad óptica medida a los 600nm de longitud de onda
ORF	Marco de lectura abierto ( <i>Open Reading Frame</i> )
pb	Pares de bases
PBS	Búfer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PE	Ficoeritrina
p.i.	Post-infección
PFU	Unidad formadora de placas ( <i>Plaque forming units</i> )
PMN	Células polimorfonucleares
RPM	Revoluciones por minuto
MOI	Multiplicidad de infección ( <i>Multiplicity of infection</i> )
N-hMPV	Proteína N de hMPV recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real ( <i>Real-Time quantitative PCR</i> )
SDS-PAGE	Electroforesis con gel de acrilamida con sodio dodecilsulfato ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> )
Th1	Linfocitos T "helper" tipo 1
Th2	Linfocitos T "helper" tipo 2
Th17	Linfocitos T "Helper" tipo 17
URTI	Infección respiratoria al tracto respiratorio superior (Upper Respiratory tract infection)
UV-hMPV	Metapneumovirus humano inactivado mediante luz ultravioleta

## Tabla de contenido

Abreviaturas .....	4
I. Introducción general .....	10
1.1 Las infecciones al tracto respiratorio .....	11
1.2 Patógenos respiratorios emergentes .....	13
1.3 Descubrimiento del hMPV .....	13
1.4 Epidemiología .....	14
1.5 Virología del hMPV .....	15
1.6 Organización genómica .....	15
1.7 Ciclo viral.....	17
1.8 Vías de transmisión del Metapneumovirus Humano .....	18
1.9 Respuesta inmune del modelo animal y Patogénesis .....	18
1.10 Células dendríticas en el tracto respiratorio.....	20
1.11 Fenotipos de célula dendrítica en el pulmón.....	20
1.13 Funciones efectoras de las células dendríticas CD11b <sup>+</sup> /CD11c <sup>+</sup> y CD11b <sup>-</sup> /CD11c <sup>+</sup> .....	21
1.14 Efecto de la infección por hMPV sobre el fenotipo y la migración de las células dendríticas pulmonares.....	21
1.15 Necesidad de una vacuna y estado del arte en el desarrollo de profilaxis contra hMPV .	22
1.16 Elección de la proteína N de hMPV como antígeno.....	23
1.17 El adyuvante ISCOMATRIX .....	23
II. Hipótesis .....	25
Objetivo general .....	25
Objetivos específicos.....	25
III. Materiales y Métodos.....	26
3.1 Reactivos.....	26
3.2 Medios de cultivo bacteriano .....	27
3.3 Suplementación para medio de cultivo eucarionte .....	27
3.4 Sistemas comerciales .....	27
3.5 Soluciones y tampones.....	28
3.6 Antibióticos para medios de cultivo bacterianos.....	28
3.7 Anticuerpo para Western Blot .....	28
3.8 Plasmidio de expression .....	28
3.9 Línea celular para replicación viral de hMPV .....	29

3.10 Cepas bacterianas .....	29
3.11 Expresión y purificación de la proteína recombinante N de hMPV .....	29
3.12 Preparación de virus hMPV .....	32
3.13 Inmunización de animales y desafío.....	32
3.14 Determinación de carga viral en muestras de pulmón .....	35
3.15 Análisis por FACS de infiltración de Neutrófilos y DCs .....	37
3.16 Procesamiento de muestras de bazo y cultivo de esplenocitos .....	37
3.17 Cuantificación de citoquinas por sándwich de ELISA .....	38
3.18 Extracción y preparación de sueros de ratones inmunizados .....	39
3.19 Determinación de cantidades relativas de inmunoglobulina y caracterización de subclases IgG1 e IgG2A en suero .....	40
3.20 Determinación de capacidad seroneutralizante de sueros inmunes sin desafiar e inmunes y desafiados con el virus hMPV .....	41
3.21 Análisis estadísticos.....	41
IV. Resultados.....	42
4.1 La inmunización con la proteína recombinante N de hMPV mas AbISCO-100 protege contra la pérdida de peso en una infección posterior con hMPV .....	42
4.2 La inmunización con la proteína recombinante N de hMPV mas AbISCO-100 disminuye la carga viral frente a una infección posterior con hMPV.....	44
4.3 La vacunación con la proteína N de hMPV más AbISCO-100 induce al quinto día post-infección una disminución en la infiltración de neutrófilos en el pulmón después del desafío con el virus.....	46
4.4 En tejido pulmonar el prototipo de vacuna disminuye la infiltración de la subpoblación de células dendríticas CD11b <sup>+</sup> /CD11c <sup>+</sup> e incrementa la infiltración de células dendríticas CD11b <sup>-</sup> /CD11c <sup>+</sup> .....	48
4.5 La vacuna induce un incremento de los niveles de IgG en suero con una tendencia hacia el isotipo IgG2A. ....	50
4.6 La vacuna induce un aumento de secreción de INF- $\gamma$ , IL-10 e IL-17 desde esplenocitos en cultivo provenientes de ratones vacunados y desafiados mostrando un perfil de respuesta T ayudadora híbrida tipo Th1/Th17 ante la estimulación con la proteína N de hMPV. ....	52
4.7 La vacuna no induce la producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus que permitan evitar la infección. La infección por sí misma induce la producción de anticuerpos neutralizantes contra hMPV en todos los grupos.....	54
V. Discusión.....	56
VI. Conclusiones .....	59
VII. Referencias .....	60

## Resumen

El Metapneumovirus humano (hMPV) es el segundo agente viral causante de bronquiolitis en niños de todo el mundo. Es el origen etiológico de variados cuadros clínicos del tracto respiratorio y afecta principalmente a niños y ancianos. La infección induce una respuesta Th2 por parte del sistema inmune del hospedero produciéndose una inflamación patológica de las vías respiratorias. Luego de la resolución de la enfermedad no hay inducción de memoria inmunológica, por lo que la enfermedad causada por la infección con hMPV puede recurrir en el mismo paciente. Por esta razón una vacuna contra hMPV que induzca una respuesta inmune protectora que perdure en el tiempo es un objetivo importante para la salud pública mundial. Hasta la fecha no hay una vacuna efectiva disponible contra este virus. Este estudio evalúa la inducción de respuesta inmune protectora contra hMPV mediante vacunación con la nucleoproteína N del virus más el adyuvante ABISCO-100. Los datos muestran que los ratones vacunados desarrollan una respuesta inmune protectora frente a una infección posterior con el virus. En estos ratones vacunados y luego desafiados con el virus se midió una disminución del transcrito del gen de la nucleoproteína N de hMPV en pulmones y una reversión en la pérdida de peso comparado con los ratones infectados que no fueron vacunados. Además en pulmón se observó una reducción en la infiltración de granulocitos y células dendríticas inflamatorias (CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>) en el grupo vacunado y desafiado con el virus. Por otro lado, al estimular con proteína N del virus a esplenocitos provenientes del grupo vacunado se midió un aumento en la secreción de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17A. También se observó un aumento en la concentración de anticuerpos isotipo IgG tipo IgG2A en sangre en el grupo vacunado y desafiado. Por último se determinó que la vacuna no tiene por sí misma efecto en la producción de anticuerpos neutralizantes. Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que los ratones vacunados desarrollaron una respuesta inmunitaria protectora mediada por células T con un perfil combinado Th1/Th17 que los protegió contra la infección con hMPV y su patología asociada y que la proteína N podría ser un buen antígeno para el desarrollo de una vacuna.



## Summary

### **Evaluation of the protective immune response against human Metapneumovirus induced by viral nucleoprotein plus ABISCO-100 vaccine prototype**

Worldwide, human Metapneumovirus (hMPV) is the second cause of acute respiratory tract infection in children such as bronchiolitis and pneumonia. It is the etiological origin of several clinical manifestations of the respiratory tract and mainly affects children and the elderly. The hMPV infection has been associated with an unbalanced Th2 pathological response causing inflammation and obstruction in the respiratory tract. Because a poor immunological memory induction is developed, the airway infections with hMPV and disease associated are recurrent. In consequence, an hMPV vaccine that generates protective immune response is necessary. To date there is no effective vaccine available against this virus.

This study shows that vaccinated mice with N-hMPV-ABISCO developed a protective immune response against hMPV infection. Compared to non-vaccinated mice, we measured a reduction in the transcripts of the N gene of hMPV in lungs and a reduction in weight loss in vaccinated mice. Besides, in these mice there is a decrease of granulocyte infiltration and of dendritic cell infiltration of conventional migratory DCs (CD11b/CD11c<sup>+</sup>) in lungs. Moreover, we isolated splenocytes from vaccinated and non-vaccinated mice and stimulated these cells with recombinant N protein of hMPV. The induced cytokines was measured in the supernatant tissue culture medium. We observed an increase of IFN- $\gamma$ , IL-10 and IL-17A in splenocytes obtained from vaccinated mice. Total and IgG subclasses was measured in serum and higher levels of IgG and IgG2a were detected in the serum of vaccinated and challenged mice compared to naïve mice.

The results obtained in this investigation suggest that the vaccinated mice developed a protective T cell-mediated immune response with a combined Th1 / Th17 profile that protected them against infection with hMPV and its associated pathology and that N protein could be a good candidate for a vaccine.

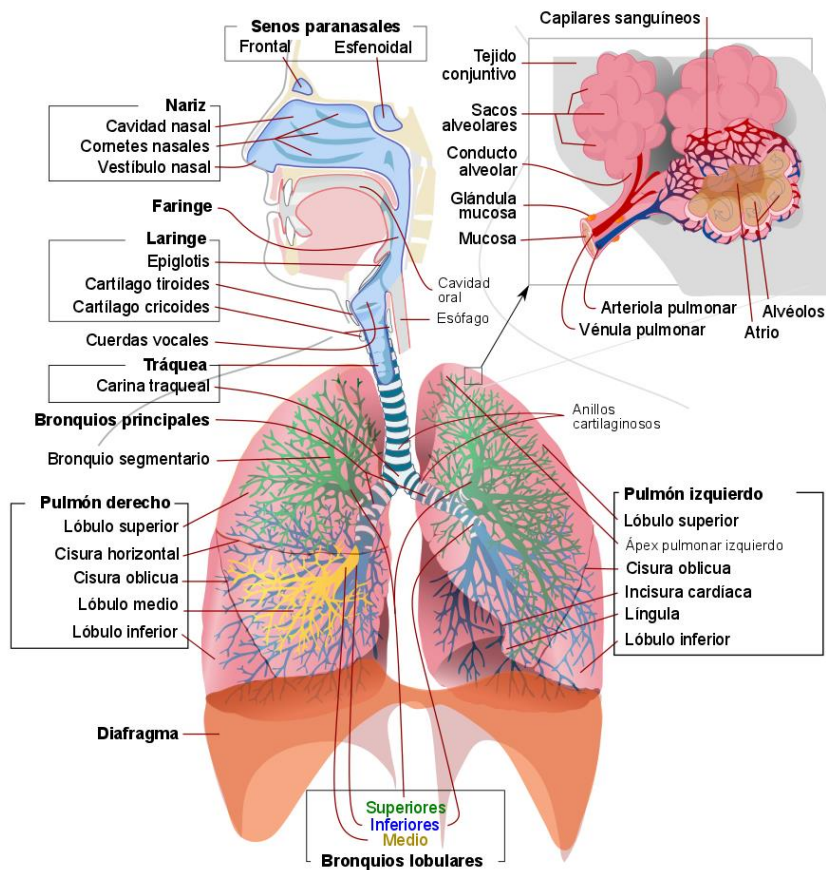
## **I. Introducción general**

Las infecciones del tracto respiratorio humano son una de las principales causas de mortalidad en el mundo[1-4]. Según la OMS[5] representan la tercera causa de muerte a nivel mundial y para niños menores de cinco años representan la segunda causa de muerte, independientemente del área geográfica. De todos los virus que infectan el sistema respiratorio, el Metapneumovirus humano (hMPV) es uno de los más prevalentes junto con el virus de la influenza, la parainfluenza y el virus respiratorio sincicial (VRS). Este último está filogenéticamente relacionado con el hMPV[6]. El hMPV presenta una mayor prevalencia en invierno y primavera[7]. Se estima que de todas las hospitalizaciones de infantes y niños pequeños por infecciones al tracto respiratorio inferior ocurridas en el planeta, un 10% de ellas tienen como agente etiológico al hMPV[1]. Este virus descubierto en Holanda[8] ha sido detectado en todos los continentes incluido Latinoamérica[9]. Estudios de seroprevalencia indican que no es un virus emergente sino que ha estado presente desde hace al menos 50 años[8]. Este virus infecta el tracto respiratorio superior e inferior desencadenando efectos citopáticos en las células epiteliales ciliadas de los bronquiolos y los pneumocitos de los alveolos del tracto respiratorio en humanos[10], haciendo a las células refringentes, pequeñas, granulares, formando sincicios e interrumpiendo la homeostasis celular[11]. Tiene un período de incubación de 4 a 6 días y de dispersión excretoria de 5 días a dos semanas, produciendo un cuadro clínico indistinguible del generado por VRS. En el tracto respiratorio superior puede producir cuadros de catarro, tos, carraspera, rinitis, conjuntivitis, faringitis, otalgia y otitis. Cuando se extiende al tracto respiratorio inferior puede producir ronquido de pecho, taquipnea, disnea, fiebre, hipoxia, hiperinflación pulmonar y originar cuadros respiratorios severos como bronquiolitis, bronquitis, pneumonia dependiente de ventilación mecánica, y exacerbación del asma. El hMPV afecta principalmente infantes, niños pequeños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos[12-15]. Es un virus de monohebra de RNA negativo no segmentado, que pertenece al orden de los Mononegavirales, familia

Paramyxoviridae, subfamilia Pneumovirinae, género *Metapneumovirus*[8]. Su morfología es pleomórfica, esférica y filamentosa, y está envuelto en un manto lipídico derivado de la célula huésped con proteínas proyectadas en su superficie[16].

## **1.1 Las infecciones al tracto respiratorio**

Las infecciones agudas al tracto respiratorio (ARTI) se clasifican en infecciones agudas al tracto superior (URTI) e infecciones agudas al tracto respiratorio inferior (LRTI)[17]. El tracto respiratorio superior va desde la ventana de la nariz hasta las cuerdas vocales incluyendo las cavidades nasales y el oído medio y el tracto respiratorio inferior empieza en la tráquea y llega hasta los alveolos pasando por los bronquios y los bronquiolos[17](figura 1). La mayor parte de las infecciones respiratorias tienen etiología viral y se producen por inhalación del virus. Esto le permite llegar a las células epiteliales de la mucosa respiratoria[18]. En las infecciones al tracto respiratorio superior los cuadros clínicos más comunes son otitis y sinusitis. La mayor parte de este tipo de infecciones remiten por sí mismas, sin embargo en un significativo porcentaje el virus logra llegar al tracto respiratorio inferior y desencadenar una infección aguda desencadenando cuadros como bronquitis, bronquiolitis y neumonía[17]. El patógeno se multiplica en las células epiteliales de la mucosa respiratoria e induce inflamación e incremento de la producción de secreciones mucosas afectando la función muco-ciliar, también se puede producir necrosis del tejido e inflamación severa llevando al paciente a una obstrucción respiratoria[18].



**Figura 1. El sistema respiratorio humano.** El tracto respiratorio superior parte en la nariz pasa por la cavidad nasal, la laringe, la faringe, las cuerdas vocales y llega hasta la tráquea. El tracto respiratorio inferior parte en la tráquea y llega hasta los alveolos. (Adaptado de "atlas fotográfico de anatomía del cuerpo humano" McGraw-hill ISBN.968 25 16773).

## **1.2 Patógenos respiratorios emergentes**

En las últimas dos décadas se ha descubierto un número considerable de nuevos patógenos respiratorios. Los cambios producidos por la globalización como el aumento demográfico en zonas rurales, la masificación de los supermercados de mascotas , el aumento exponencial de viajes internacionales , el aumento en las expectativas de vida y las infecciones oportunistas asociadas a la inmunosupresión han hecho que nuevos patógenos respiratorios emerjan en el horizonte global[19]. Por otro lado el mejoramiento en la tecnología en biología molecular ha permitido una vigilancia y análisis más eficiente de la etiología asociada a las infecciones respiratorias [20].

## **1.3 Descubrimiento del hMPV**

En el año 2001 un nuevo virus fue aislado desde muestras de 28 pacientes infantiles que mostraban síntomas de infección al tracto respiratorio inferior similares a los del VRS. El ARN extraído de células infectadas con el virus desconocido no pudo ser amplificado por RT-PCR usando cebadores de virus respiratorios conocidos. Sin embargo usando cebadores aleatorios fueron amplificadas bandas que se asemejaban a las obtenidas con el Metapneumovirus aviar (AMPV), indicando una relación cercana entre ambos virus. Estudios filogenéticos posteriores clasificaron el virus como el primer virus del género Metapneumovirus capaz de infectar a mamíferos. Estudios serológicos posteriores indicaron que éste virus había estado en circulación desde hace al menos 50 años atrás[8].

## 1.4 Epidemiología

Las infecciones agudas al tracto respiratorio son la tercera causa de mortalidad y morbilidad en el mundo y para niños menores de cinco años constituyen la primera causa de mortalidad para la población de países en desarrollo, principalmente la africana[21]. Las infecciones al tracto respiratorio constituyen una de las principales cargas para los sistemas de salud y uno de los principales problemas de salud pública mundial. Por otro lado, en diferentes estudios epidemiológicos recientes se ha visto que en aproximadamente la mitad de los casos de neumonía el agente etiológico es un virus, y que entre ellos el hMPV tiene una prevalencia muy significativa[22]. Desde su descubrimiento en el año 2001[8] el hMPV ha sido identificado en todos los continentes como uno de los más frecuentes en las infecciones al tracto respiratorio superior e inferior. De prevalencia estacional, principalmente en invierno y primavera [1, 23], éste virus es responsable de al menos el 10% de las infecciones respiratorias que requieren hospitalización[24]. Últimamente se ha equiparado su prevalencia con la de la influenza para niños menores de cinco años[25]. Si bien en los adultos tiene una prevalencia importante[26], los principales grupos etarios afectados son los niños menores de cinco años y los ancianos[27]. En Chile estudios epidemiológicos mostraron que el hMPV era el agente etiológico[28] en el 10% de los niños hospitalizados por infecciones agudas al tracto respiratorio. También se ha demostrado que aproximadamente un 100% de los niños entre 5 y 10 años son seropositivos para hMPV[8, 29]. En el ser humano la mayor parte de los cuadros de enfermedad inducidos por hMPV son leves o moderados y solo requieren tratamiento ambulatorio, sin embargo en los grupos de riesgo derivan en una falla respiratoria aguda que requiere hospitalización. Se estima que del 5% al 10% de estos casos terminan en muerte del paciente[1, 14, 30-32].

## 1.5 Virología del hMPV

Los virus de la familia paramyxoviridae contienen genomas de mono hebra de RNA no segmentado de polaridad negativa y su genoma se replica exclusivamente en el citoplasma. Están rodeados de un manto lipídico desde el cual protruyen la glicoproteína G de unión y la glicoproteína F de fusión viral. Al interior del manto lipídico se encuentra una nucleocápside helicoidal formada por la proteína P, la proteína L y la proteína N. Esta última encapsida el genoma viral de RNA antisentido y lo protege de nucleasas, adicionalmente ésta proteína funciona en asociación con la proteína P y la proteína L en el proceso de replicación y transcripción. Entre el manto lipídico y la nucleocápside se encuentra la proteína M que interactúa con la proteína N durante el ensamblaje de nuevos viriones[33]. (Figura 2)

Análisis genéticos de aislados de hMPV basados en análisis de secuencia de las proteínas F Y G del virus han revelado que existen dos cepas principales de hMPV, la cepa A y B, que representan dos serotipos distintos. Es posible diferenciar dos subgrupos en cada cepa, correspondientes a A1, A2, B1 y B2, respectivamente. [8]

## 1.6 Organización genómica

El tamaño del genoma de HMPV es de alrededor de 13,3 kb. Contiene 8 genes y 9 marcos de lectura abiertos (ORFs). El gen M2 contiene 2 ORFs a partir de los cuales se expresan las proteínas M2-1 y M2-2. El genoma de HMPV contiene regiones no codificantes que varían en tamaño de 23 a 209 nucleótidos y contienen señales de término, regiones intergénicas y señales de inicio. La organización genómica se asemeja al de otros neumovirus tales como HRSV. Sin embargo, a diferencia de HRSV, el genoma de HMPV carece de los genes no estructurales (NS1 y NS2) y el orden de los genes entre M y L es diferente[34].(Figura 2)

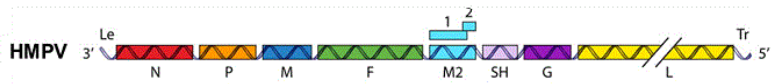
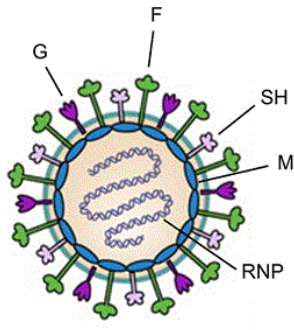
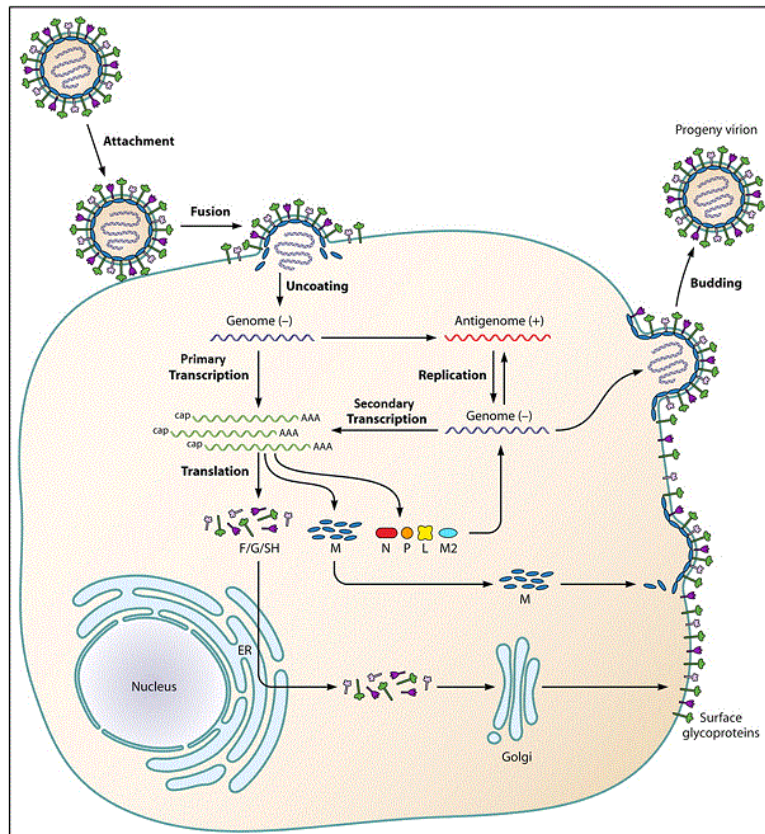


Figura 2. Representación del virion de hMPV incluyendo el manto lipídico con las glicoproteínas (F, SH y G), la proteína de matriz M y el complejo ribonucleoprotéico. Adicionalmente se incluye una representación esquemática del genoma viral de hMPV.



## 1.7 Ciclo viral

El ciclo viral de hmpv ha sido determinado usando como referencia el ciclo viral asociado a otros paramyxovirus. Mayores detalles se explican en la figura 3.



**Figura 3. Ciclo viral del Metapneumovirus humano (adaptado de [30]).** Después de la unión del virión a la membrana plasmática se fusionan las membranas víricas y plasmáticas. Este proceso permite el desnudamiento del virión y la liberación de la ribonucleoproteína (vRNP) en el citoplasma. El complejo vRNP realiza la transcripción primaria de todos los transcritos. Luego el genoma se utiliza como plantilla para producir el antígeno. Este último se utiliza como plantilla para sintetizar el ARN genómico, que se incorpora en los viriones de la progenie. También el RNA genómico recién sintetizado participa en la producción de nuevos transcritos en un proceso llamado transcripción secundaria. Después de la traducción, las proteínas M y las proteínas del complejo ribonucleoprotéico (proteínas N, P y L) se transportan intracelularmente a la membrana plasmática. Por otro lado las glicoproteínas virales F, G y SH se transportan desde el retículo endoplásmico (ER) hasta el aparato de Golgi y luego a la membrana plasmática. Finalmente al confluir todos los componentes en la membrana plasmática se forman nuevos viriones, liberándose al medio mediante el proceso de brotación viral.

## 1.8 Vías de transmisión del Metapneumovirus Humano

El Metapneumovirus se transmite al igual que VRS por contacto con secreciones contaminadas desde las manos a la boca o desde las manos a los ojos[35, 36], vía gotas de Flügger o por contacto con fómites[35]. Al llegar al tracto respiratorio inferior infecta al epitelio ciliado ubicado en la primera capa de células que rodean el lumen de los bronquiolos y los pneumocitos de los alvéolos[10] entre otros tejidos del tracto respiratorio e infecta otras células, incluidas las del sistema inmune[37] y del sistema nervioso central[38]. El hMPV puede persistir en los pulmones aún después de 154 días post-infección [39].

## 1.9 Respuesta inmune del modelo animal y Patogénesis

Las primeras células blanco del hMPV son las células epiteliales del tracto respiratorio luego de haber superado las barreras físicas mucosas y las células ciliares[40]. Cuando el hMPV infecta células epiteliales se activan vías de transducción de señales que resultan en la activación de mecanismos antivirales y pro inflamatorios[41, 42]. La especie *Mus musculus* es uno de los modelos establecidos para estudiar la patogénesis de la enfermedad inducida por la infección por hMPV. Dentro de esta especie la cepa Balb/c ha sido establecida como un modelo exitoso de infección y enfermedad. En ésta cepa se observa una eficiente replicación viral con máximos a los 7 y 14 días[43], pérdida de peso entre los días 4 y 10 post-infección con un máximo al día 7, dificultad respiratoria y pelo enmarañado[40, 44]. En el pulmón del ratón se produce un estado inflamatorio general que alcanza un máximo entre los días 5 y 7 y que se mantiene por semanas con infiltración de células inflamatorias como PMNs y macrófagos en el espacio alveolar (alveolitis), mientras que la infiltración de linfocitos en pulmón alcanza su máximo entre los días 3 y 5 post-infección. La infección por hMPV sobre células dendríticas induce una disminución en su capacidad de presentar antígeno y activar células T[45]. El perfil de citoquinas y quimioquinas

en el pulmón asociado a la infección está caracterizado por altos niveles de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-8, RANTES y MCP-1 lo que induce mayor infiltración de neutrófilos y células NK activadas[44]. Otros estudios suman a estos datos la existencia de GM-CSF en los lavados bronqueoalveolares[46]. Por otro lado la infección por hMPV no induce niveles detectables de IL-10 o IL-12p70 pero si IL-12p40[42].

En un estudio de depleción de células T se encontró que éstas células tienen un rol crucial en la eliminación del virus durante la infección primaria, pero también son responsables de la patología posterior, principalmente las células T CD4<sup>+</sup>[47].

## **1.10 Células dendríticas en el tracto respiratorio**

Las células dendríticas son células profesionales presentadoras de antígenos del sistema inmune (APC profesionales). Se diferencian desde progenitores mieloides y linfoides provenientes de la médula ósea y están ampliamente distribuidas entre tejidos linfoides secundarios, terciarios y no linfoides. Juegan un rol fundamental en la detección de patógenos y en la activación de células T, desencadenando la respuesta inmune adaptativa[48]. En el sistema respiratorio las células dendríticas están presentes en el epitelio respiratorio, en la submucosa y en tejidos parenquimales asociados al pulmón[49]. En ausencia de inflamación las células dendríticas están presentes en un promedio de cientos por milímetro cuadrado en las vías aéreas superiores, mientras que en las vías respiratorias inferiores se encuentran en menos de 100 por milímetro cuadrado[50]. Cuando se desarrolla un proceso inflamatorio las células dendríticas son reclutadas en mayor cantidad hacia el pulmón[51]. Después de detectar y degradar a los virus, las células dendríticas inician la respuesta inmune vía la secreción de interferones, quimioquinas y citoquinas proinflamatorias, también expresan una variedad de moléculas coestimuladoras y receptores en un proceso que se conoce globalmente como maduración. Después de la maduración las células dendríticas son capaces de migrar hacia los linfonodos pulmonares y presentar antígenos a las células T de forma eficiente[52].

## **1.11 Fenotipos de célula dendrítica en el pulmón**

Existen al menos 3 subgrupos de células dendríticas descritos en pulmón. Las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) secretoras de IFNs de tipo I, las células dendríticas asesinas (IKDCs) que comparten marcadores con las células asesinas naturales (Células NK) y las células dendríticas convencionales (cDCs). Estas últimas son consideradas las principales presentadoras de antígenos del sistema inmune[53]. Las cDCs pulmonares se subdividen en dos grupos. Ambos subgrupos expresan el marcador CD11c pero pueden diferenciarse por la expresión del marcador

CD11b (fenotipos CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> y CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>) [54]. Otra manera de diferenciarlas es el uso del marcador CD103, de esta manera las células dendríticas CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> son CD103<sup>+</sup> mientras que las células dendríticas CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> son CD103<sup>-</sup> [54].

### **1.13 Funciones efectoras de las células dendríticas CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> y CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>**

Las células dendríticas CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> y CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> poseen propiedades efectoras diferentes[55]. Las células dendríticas CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> presentan antígeno mediante MHC-II de forma más eficiente[56]. Por otro lado se ha informado que éste fenotipo posee un potente efecto proinflamatorio[57] y han sido responsabilizadas de la inducción de respuesta Th2[58]. Por otro lado las células dendríticas CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> son mucho más eficientes al presentar antígeno de forma cruzada hacia células T CD8<sup>+</sup>[55] permitiendo la activación de CTLs y producen una cantidad mayor de IL-12[59]. Adicionalmente ha sido demostrado que éstas células son capaces de presentar antígenos foráneos provenientes de células apoptóticas y han sido relacionadas con la inducción de respuesta Th1[60].

### **1.14 Efecto de la infección por hMPV sobre el fenotipo y la migración de las células dendríticas pulmonares**

Existe evidencia experimental de que el virus hMPV induce el reclutamiento de células dendríticas en respuesta a la infección en la cepa BALB/c[61] entre otras, siendo las cDCs las más abundantes y en donde el fenotipo CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> predomina sobre el fenotipo CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> [61]. Además la infección con hMPV induce en el pulmón una disminución significativa del fenotipo CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> y la cantidad normal de células dendríticas CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> no se recupera después de al menos 8 semanas post-infección[61].

### **1.15 Necesidad de una vacuna y estado del arte en el desarrollo de profilaxis contra hMPV**

Se ha reportado que en humanos la infección por hMPV no induce inmunidad protectora contra posteriores reinfecciones[62]. Este resultado también se encontró en estudios realizados en primates[63], lo que sugiere que la infección induce una inmunidad protectora transiente de corta duración, efecto que también se observa en otros virus de la familia *Paramyxoviridae* como VRS[64]. Estos resultados pueden explicarse porque hMPV despliega mecanismos de evasión del sistema inmune que impiden una correcta formación de memoria inmunológica[65]. Esto implica que para estimular una inmunidad efectiva es necesario inducir una respuesta inmune adaptativa contra antígenos del virus en ausencia de estos factores virales inmunomoduladores que estarían bloqueando la formación de memoria inmunológica protectora.

Hasta la fecha se han ensayado distintos prototipos de vacuna contra Metapneumovirus, incluyendo vacunas basadas en virus quiméricos[66], virus atenuados, virus inactivados y proteínas recombinantes. Las vacunas basadas en virus quiméricos que expresan la proteína F han dado resultados de protección inmune transiente. En ratas aldoneras se indujo protección humoral contra hMPV[67] mediante ésta vacuna pero al probar una formulación similar en simios no humanos la protección humoral inducida por la vacuna no se mantuvo en el tiempo[68]. Las vacunas basadas en virus inactivados generan una reacción inmune tipo Th2 acoplada a la ausencia de producción de anticuerpos neutralizantes, lo que produce una reacción inflamatoria descontrolada e injuriosa para el sistema respiratorio. Por consiguiente este tipo de vacunas han sido descartadas[69]. Con virus atenuados se han obtenido resultados más auspiciosos; este tipo de vacuna induce una fuerte respuesta inmune en una infección secundaria con una considerable disminución del título viral[70]. Su principal desventaja es que pueden resultar demasiado atenuadas o producir una respuesta inmune inflamatoria exacerbada por la gran cantidad de PAMPs que contienen. Adicionalmente, considerando la tasa de error de la RNA polimerasa RNA

dependiente del virus, siempre está el riesgo de una posible reversión de la atenuación. En cambio el uso de proteínas recombinantes más un adyuvante eluden estas complicaciones y permiten un diseño más racional de la formulación.

### **1.16 Elección de la proteína N de hMPV como antígeno**

La secuencia de la proteína N de hMPV es una de las más conservada entre todas las cepas de hMPV[71] por lo tanto una vacuna desarrollada en base a sus antígenos permitiría proteger al individuo de un amplio espectro de cepas del virus. Adicionalmente existen predicciones bioinformáticas y datos experimentales que demuestran que ésta proteína contiene epítopes que son cargados en el MHC-I de células presentadoras de antígenos y son presentados a células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas dirigiendo su activación[72].

### **1.17 El adyuvante ISCOMATRIX**

El adyuvante ISCOMATRIX deriva de los complejos inmunoestimuladores ISCOM que fueron descritos inicialmente por Morein *et al.* en 1984[73]. Ellos demostraron que bajo condiciones controladas y en ausencia de antígeno los ISCOMs forman espontáneamente estructuras tipo caja y llamaron a esas estructuras "ISCOMATRIX". ISCOMATRIX está compuesto por ISCOMPREP que corresponde a una fracción de las saponinas del quillay además de colesterol y fosfolípidos. Este adyuvante puede ser formulado junto a cualquier antígeno proteico que se haya purificado después de la manufactura del adyuvante. Ha probado ser seguro, bien tolerado y altamente inmunogénico en humanos generando eficientes respuestas de tipo humoral y celular [74].

ISCOMATRIX induce respuesta inmune humoral de larga vida y con capacidad neutralizante estimulando la generación de distintos isotipos de inmunoglobulina con diferentes propiedades

efectoras. Otro efecto importante de este adyuvante es el depósito del antígeno dentro de la célula dendrítica induciendo su presentación prolongada lo que facilita la activación de células T[75]. Además facilita la llegada del antígeno a las células dendríticas ubicadas en los nodos linfáticos que drenan la zona de inyección, permitiendo así la maduración de las células dendríticas que han captado el antígeno[74]. También se ha demostrado que los adyuvantes ISCOMATRIX favorecen la translocación del antígeno desde compartimentos endosomales hacia el citosol y su procesamiento vía tripeptidil peptidasa II y posterior carga del antígeno en MHC I[75]. Por otro lado favorece la vía de procesamiento y presentación del antígeno vía MHC II para la presentación hacia células T CD4<sup>+</sup> y la colaboración de la célula T CD4<sup>+</sup> con el linfocito B para una mejor respuesta humoral. También se ha mostrado que ISCOMATRIX aumenta el reclutamiento de células efectoras innatas y adaptativas como células B, células T CD4<sup>+</sup> y células T CD8<sup>+</sup> hacia el linfonodo que drena el tejido en el cual la vacuna ha sido inyectada. Adicionalmente se ha demostrado que ISCOMATRIX es capaz de estimular una mayor capacidad de presentación cruzada de antígeno por parte de las células dendríticas que permite la activación de células T citotóxicas capaces de eliminar tumores[76]. Por último, ISCOMATRIX induce por sí mismo un ambiente de citoquinas equilibrado entre la respuesta Th1 y Th2 (IL-4, IL-2, IFN- $\gamma$ ) que favorece la maduración de las células dendríticas y una óptima presentación de antígeno. En esta tesis se utilizó el adyuvante AbISCO-100, una de las presentaciones del adyuvante ISCOMATRIX. AbISCO contiene ISCOMs pre-formados lo que facilita la preparación de la vacuna.



## **II. Hipótesis**

En base a los antecedentes presentados, se propone la siguiente hipótesis:

“El prototipo de vacuna compuesto por la proteína N de hMPV formulada con el adyuvante AbISCO-100 induce una respuesta inmune protectora contra una infección con hMPV en ratones Balb/c”.

### **Objetivo general**

Caracterizar y evaluar la respuesta inmune contra una infección con hMPV inducida por el prototipo de vacuna compuesto por la proteína N de hMPV formulada con el adyuvante AbISCO-100 en ratones Balb/c.

### **Objetivos específicos**

- 1) Generar un prototipo de vacuna a partir del gen de la proteína N de hMPV más AbISCO-100.
- 2) Caracterizar la respuesta inmune contra hMPV en ratones Balb/c vacunados con el prototipo de vacuna y evaluar la protección contra la enfermedad inducida por hMPV.

### III. Materiales y Métodos

#### 3.1 Reactivos

**Merck** (Whitehouse Station, Nueva Jersey , EEUU): Cloruro de sodio, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, agarosa, glucosa, etanol, ácido acético glacial, dimetilsulfóxido (DMSO), SDS, ácido sulfúrico 37%, urea, metanol y glicerol.

**Difco** (Franklin Lakes, Nueva Jersey, EEUU): agar-agar, extracto de levadura, triptona.

**Applichem** (Gatersleben, Alemania): Bromuro de etidio, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

**Invitrogen** (Carlsbad, California, EEUU) : Estándares de peso molecular  $\lambda$ /Hind III,  $\phi$ X174/Hae III y Benchmark Protein Ladder P7708S, Taq DNA polimerasa-, dNTPs, tampones de reacción PCR, resina Probond, Medio RPMI, glutamina, penicilina-streptomicina, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, Suero fetal Bovino. Azul de tripán.

**BD Pharmigen** (Franklin Lakes, Nueva Jersey, EEUU): Anticuerpos anti-mouse CD11c conjugados con FITC (Isocianato de Fluoresceína), anti-mouse CD11b conjugados con PE (Ficoeritrina) y anti-mouse Gr-1 conjugado con APC (Alofocianina), Triptona, extracto de levadura.

**Sigma** (St. Louis, Missouri, EEUU): anti-mouse IgG, bicarbonato de sodio, DNAsa I.

**Winkler** (Santiago, Chile): Albúmina de suero Bovino.

**Isconova** (Gaithersburg, Maryland, EEUU): Adyuvante AbISCO-100.

**Life Technologies-Gibco** (Bangalore, India): Medio de cultivo eucarionte RPMI 1640 y medio de cultivo eucarionte Optimem.

### 3.2 Medios de cultivo bacteriano

Para el cultivo bacteriano se utilizó medio Luria Bertani (LB) compuesto por 1% de triptona, 1% de NaCl y 0,5% de extracto de levadura[77].

### 3.3 Suplementación para medio de cultivo eucarionte

Para el cultivo de esplenocitos se utilizó RPMI suplementado con 0,2% de bicarbonato de sodio, 1% de glutamina, 1% de penicilina, 1% de estreptomina, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato de sodio y 5% de suero fetal bovino.

Para el cultivo de células LLC-MK2 se utilizó medio RPMI suplementado con 0,2% de bicarbonato de sodio, 1% de glutamina, 1% de penicilina, 1% de estreptomina, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato de sodio y 5% de suero fetal bovino y medio Optimem suplementado con 3.4 g/L de bicarbonato de Sodio y penicilina-streptomina (10 U/mL).

### 3.4 Sistemas comerciales

**Thermo Fischer Scientific** (Waltham, Massachusetts, EEUU): Micro BCA™ Protein Assay Kit para cuantificación de proteína.

**Invitrogen** (Carlsbad, California, EEUU): PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep para purificación de plasmidios, resina ProBond para purificación de nucleoproteína recombinante N de hMPV.

**BD Pharmingen** (Minneapolis, Minnesota, EEUU): Quantikine ELISA Kits para IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e IL-17 R&D Systems, Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit.

**OMEGA-BIOTEK** (Norcross, Georgia, EEUU) : EZNA plasmid mini kit I.

**Promega** (Madison, USA): ImProm II Reverse Transcription System.

### **3.5 Soluciones y tampones**

### **3.6 Antibióticos para medios de cultivo bacterianos**

**Sigma Aldrich** (St.Louis, Missouri, EEUU): Ampicilina (100 µg/mL), cloramfenicol (34 µg/mL), estreptomycin (75 µg/mL) y ácido nalidíxico (20 µg/mL).

### **3.7 Anticuerpo para Western Blot**

**Gene Script** (Jiangsu, China): Anti-Histag.

### **3.8 Plasmidio de expression**

**PROMEGA** (Wisconsin, USA): pET-21a.

### 3.9 Línea celular para replicación viral de hMPV

Células epiteliales LLC-MK2 de riñón provenientes de la especie *Macaca mulatta*. Código ATCC: LLC-MK2 Original. ATCC® CCL-7™.

### 3.10 Cepas bacterianas

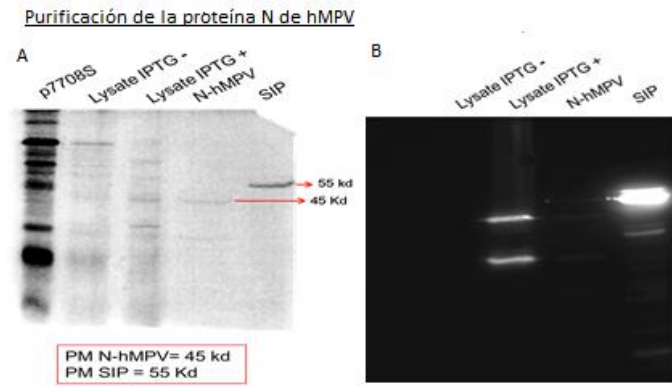
**BL21(DE3) Codon Plus RIPL de Stratagene (La Jolla, California, EEUU):** *E. coli* B F<sup>-</sup> ompT hsdS(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Camr] [argU ileY leuW Strep/Spcr]

### 3.11 Expresión y purificación de la proteína recombinante N de hMPV

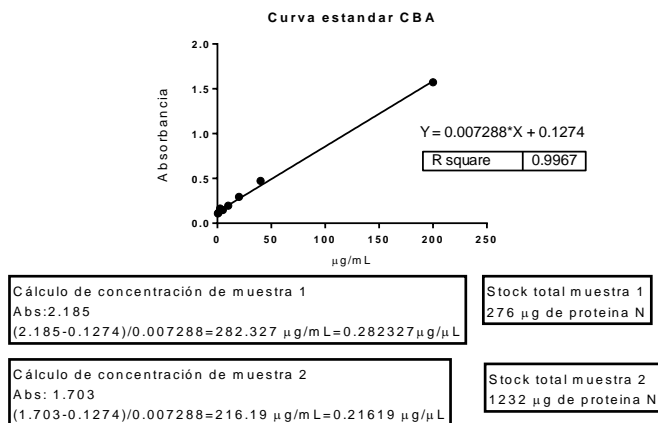
Con el fin de obtener la formulación del prototipo de vacuna ensayado en esta tesis se procedió a purificar la nucleoproteína N de hMPV por cromatografía de afinidad por Nickel (IMAC por nickel) utilizando la resina Probond montada en columna de vidrio obteniéndose el flujo de la fase móvil por gravedad. Como sistema heterólogo de expresión se utilizó la cepa bacteriana BL21 CODON PLUS, la cual se transformó por electroporación con el plasmidio de expresión pET-21a cuyo inserto contenía el gen de la nucleoproteína N del Metapneumovirus humano. Luego de la electroporación se cultivó el inóculo por una hora en ausencia de antibiótico y a continuación se plaqueó en agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (34 µg/mL) y estreptomycin (75 µg/mL), éstos tres antibióticos fueron utilizados juntos. Al día siguiente se escogió una colonia transformada de la placa de agar LB y se inoculó en 100 mL de medio LB suplementado con antibióticos y se cultivó a 37°C y 220 rpm durante toda la noche. Luego este inóculo se diluyó 1:100 en un nuevo cultivo de 500 mL de medio LB suplementado antibióticos más glucosa al 1% p/v. El cultivo se incubó a 37°C y 220 rpm hasta que alcanzó una OD<sub>600nm</sub> entre 0,4 y 0,6. En ese momento se indujo con IPTG a una concentración de 1 mM y se incubó durante dos horas más. Luego el sedimento bacteriano se recuperó por centrifugación a 4200 x g durante

10 minutos. Luego se resuspendió en tampón de extracción a pH 8 y se agregó una punta de espátula de lisozima. Todo este material se incubó a 4 °C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se agregó DNasa I y se incubó durante 15 minutos más a 4°C. A continuación el sedimento bacteriano se disgregó con una prensa y el material resultante se centrifugó a 21000 x g durante 20 minutos, obteniéndose el extracto proteico. El proceso de purificación se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante de la resina Probond (Invitrogen). En resumen, primero se ambientó la resina Probond con el tampón de extracción, luego se le agregó el extracto proteico obtenido anteriormente y se mantuvo en agitación suave toda la noche a 4°C. Posteriormente la proteína recombinante N de hMPV (rN-hMPV) se limpió de posibles proteínas contaminantes con cinco volúmenes de columna de Imidazol 25 mM. Luego se eluyó la proteína con 15 mL de Imidazol 250 mM. La identidad de la proteína eluida se determinó mediante SDS-PAGE al 12,5 % de acrilamida y western Blot utilizando como anticuerpo primario anti-His tag en una dilución 1:1000. Para cuantificar la proteína obtenida se utilizó el sistema comercial Pierce™ BCA Protein Assay kit de ThermoScientific.

Como resultado se pudo obtener la nucleoproteína N de hMPV en condiciones nativas. Como se observa en la figura 2 al analizar por SDS-PAGE el eluido resultante se obtuvo la banda correspondiente a la nucleoproteína N de hMPV con un peso de 45 KDa más otra banda correspondiente a 30 kDa. Luego al realizar Western Blot de éste eluido se observó señal de quimioluminiscencia para ambas bandas. No fue posible eliminar la segunda banda bajo ningún método, ni de lavado ni de elución por gradiente de concentración, ambas bandas siempre eluyeron juntas en todas las condiciones testeadas, por lo tanto se asumió que la segunda banda correspondía a una forma trunca de la proteína N de hMPV.



**Figura 4. Purificación de la proteína N de hMPV.** En la figura 4A se muestra un gel de poliacrilamida al 12% obtenido mediante SDS-PAGE. En el primer carril se muestra el estándar de peso molecular proteico P7708S (no visible en el western blot) en el segundo carril se muestra el patrón de banda correspondiente al extracto proteico obtenido de un sedimento de bacterias CODÓN PLUS transformadas pero no inducidas con IPTG, en el tercer carril se muestra el patrón de banda correspondiente al extracto proteico obtenido de un sedimento de bacterias CODÓN PLUS transformadas e inducidas con IPTG, en el cuarto carril se muestra el eluido obtenido a partir de purificación por cromatografía de afinidad por Nickel y que contiene a la proteína N de hMPV y en el quinto carril se muestra la proteína SIP recombinante usada como control positivo. En la figura 4 B se muestra un Western Blot con el mismo orden de carriles. Tanto la proteína N de hMPV como la proteína SIP de *Streptococcus agalactiae* fueron identificadas mediante el anticuerpo anti-HISTAG, contra la cola de seis histidinas.



**Figura 5. Cuantificación de proteína N de hMPV.** Se obtuvo cantidad suficiente de nucleoproteína para poder evaluar experimentalmente el prototipo de vacuna compuesta por la nucleoproteína N más AbISCO-100 propuesta en esta tesis.

### 3.12 Preparación de virus hMPV

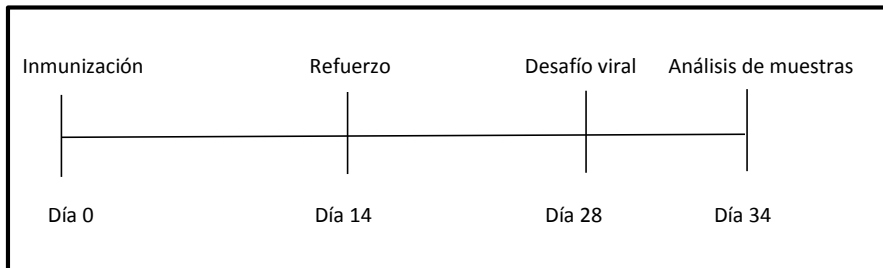
Se obtuvo un aislado clínico de hMPV correspondiente al serogrupo A llamado CZ0107 del Laboratorio de Infectología y Virología del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile y se propagó en cultivos de mono capa de células LLC-MK2 al 80%-90% de confluencia. Luego de realizar la infección a baja MOI se esperaron 24 horas o hasta observar efecto citopático. Posteriormente el debris celular más el sobrenadante fueron centrifugados a 300 x g por 10 min y las fracciones sobrenadante y sedimento celular fueron alicuotados y llevados a -80°C. Posteriormente estas alícuotas fueron descongeladas y tituladas por el método de diluciones seriadas sobre células LLC-MK2 confluentes.

### 3.13 Inmunización de animales y desafío

Como modelo animal se utilizó la especie *Mus musculus* cepa Balb/C nativa por ser un modelo exitoso de infección y enfermedad capaz de recapitular en gran parte la respuesta inmune aberrante observada en humanos infectados con hMPV y que desarrollan la enfermedad respiratoria[78]. Los animales fueron proveídos por el bioterio del Instituto de Salud Pública de Chile; la manipulación de los animales se hizo según las normativas establecidas por la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" del Consejo Nacional de Investigación de Canadá, como es recomendado por los comités de Bioética y Bioseguridad de las instituciones participantes de este trabajo. Para evaluar la respuesta inmune inducida por la vacuna ante la infección se utilizaron 36 ratones hembras de 4 a 6 semanas. Se formaron seis grupos de ratones Balb/c con seis ratones cada uno. Como vía de administración de la vacuna y sus respectivos controles se utilizó vía de inyección intraperitoneal (i.p.). El primer grupo control no fue inmunizado ni infectado y se denominó grupo *Naive*; el segundo grupo control fue inyectado con PBS 1X y se llamó grupo PBS 1X; el tercer grupo control fue inmunizado con 14,4 µg de AbISCO-100 más PBS (control de vehículo) y se llamó AbISCO; el cuarto grupo control fue inmunizado con



1x10<sup>6</sup> PFU de hMPV inactivado por UV y se llamó UV-hMPV; el quinto grupo control fue inmunizado con 20 µg de proteína N de hMPV y se llamó N-hMPV y el sexto grupo fue inmunizado con 20 µg de proteína N de hMPV más 14,4 µg de AbISCO-100 y se llamó N-hMPV/AbISCO (Tabla 1). Las formulaciones fueron diseñadas de acuerdo al protocolo del fabricante (ISCONOVA). Después de 14 días todos los animales recibieron un refuerzo de las mismas formulaciones anteriores. Después de 28 días desde la primera inmunización todos los ratones excepto los del grupo *Naive*, fueron desafiados con 1x10<sup>6</sup> PFU de hMPV cepa CZ0107 por vía intranasal. En el caso de los ratones *Naive* se administró 100 µL de sobrenadante no infeccioso de células LLC-MK2 por vía intranasal como control *Mock*. Este procedimiento permite determinar el posible efecto fisiológico o inmune del medio de cultivo (vehículo) en las variables evaluadas en el modelo animal de infección. Después del desafío el peso de los ratones se midió todos los días hasta el día 34, momento en el que los ratones fueron sacrificados por sobredosis de anestesia (ketamina 5 mg/Kg y Xilazina 100 mg/Kg) seguido por dislocación cervical. Se recuperaron muestras de sangre, pulmones y bazo de todos los grupos. (Figura 3).



**Figura 6. Esquema de inmunización.** Los ratones fueron inmunizados o tratados el día cero, luego 14 días después recibieron un refuerzo con las mismas formulaciones anteriores, al día 28 todos los animales menos los del grupo Naive fueron desafiados por vía intranasal con 100  $\mu$ L de inóculo que contenía  $1 \times 10^6$  PFU de hMPV. Los ratones del grupo Naive recibieron sobrenadante no infeccioso por vía intranasal. Al día 34 todos los animales fueron sacrificados y se procedió a la extracción de pulmones, bazo y sangre.

Grupos experimentales		
Grupo	Tratamiento	Código en gráficos
1	Mock	Naive
2	PBS 1X	PBS 1X
3	$1 \times 10^6$ pfu UV-hMPV	UV-hMPV
4	PBS 1X + 14,4 $\mu$ g AbISCO	AbISCO
5	20 $\mu$ g rN-hMPV	N-hMPV
6	20 $\mu$ g rN-hMPV + 14,4 $\mu$ g AbISCO	N-hMPV/AbISCO

**Tabla 1. Esquema de grupos experimentales.** La formulación del prototipo de vacuna se hizo en función de las recomendaciones del fabricante del adyuvante ISCONOVA. Todos los grupos de ratones recibieron por vía intraperitoneal un volumen de 100  $\mu$ L de tratamiento cuya composición se especifica en la Tabla.

### 3.14 Determinación de carga viral en muestras de pulmón

Para determinar la carga viral se midió la cantidad de transcrito del gen de la nucleoproteína N de Hmpv presente en las muestras de pulmón obtenidas al quinto día post-infección. Primero un lóbulo pulmonar de cada animal evaluado se homogenizó en PBS 1X por fricción. Para ello se utilizó un émbolo de jeringa y un cedazo de 70 µm de poro. A continuación la suspensión de tejido obtenida se centrifugó a 4000 RPM por 3 min a 4 °C. Luego se descartó el sobrenadante y el sedimento celular remanente se resuspendió en 5 ml de TRIzol (Invitrogen), posteriormente se extrajo el RNA de cada muestra siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Luego 1 µg de RNA fue retrotranscrito a cDNA mediante el sistema comercial ImProm II Reverse Transcription System (Promega) según el protocolo del fabricante. Con el cDNA obtenido se procedió a realizar un qPCR. Se formó un mix de reacción con 0.1 pmol de partidor, 0.1Mm de ROX como sonda fluorescente normalizadora, 1 µg de cDNA de cada muestra y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 10 µL. Se tomó el gen β-actina murina como gen de estandarización.

Para la reacción de qPCR se usó el termociclador Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies). Los datos fueron analizados mediante el software MxPro (Agilent Technologies).

Para la cuantificación de copias del transcrito de la nucleoproteína N de Hmpv se hizo una curva estándar utilizando el plasmidio *pET21a::N-hMPV*(4,44x10<sup>6</sup> gr/mol). Se hicieron diluciones seriadas del plasmidio obteniéndose finalmente entre 4,50 x 10<sup>-2</sup> ng y 4,5 x10<sup>-6</sup> ng por µL de muestra de DNA en el mix de reacción. Para la curva estándar para β-actina se usó el plasmidio *TOPO-TA::β-actina*(2,67x10<sup>6</sup> gr/mol). Se hicieron diluciones seriadas del plasmidio obteniéndose entre 1.15x10<sup>2</sup>ng hasta 4.50x10<sup>-2</sup>ng por 1 µL de muestra de DNA en el mix de reacción. La expresión relativa del gen N se calculó en base a la fórmula

$$Ratio = (E_{Target})^{\Delta Ct_{target(naive-muestra)}} / (E_{ref})^{\Delta Ct_{ref(naive-muestra)}}$$

Donde el gen *target* corresponde al gen de la nucleoproteína N de hMPV y el gen *ref* corresponde al gen  $\beta$ -actina. Se tomó el valor obtenido del grupo naive como control.

<b>Partidores</b>	
Partidores gen N-hMPV	FW 5'-ACAGCAGATTCTAAGAACTCAGG-3'
Fragmento esperado: 120bp	ReV 5'-CTTCTTTGTCTATCTTCCACCC-3'
Partidores gen $\beta$ -actina	FW 5'-ACCTCCTACATTGAGCTGCG-3'
Fragmento esperado: 147bp	ReV 5'-CTGGATGGCTACGTACATGG-3'
<b>Programa qPCR</b>	
Segmento 1, 1 ciclo	50°C por 2 min
Hot Start	95°C por 10 min
Segmento 2, 40 ciclos	95°C por 15 s
Amplificación	58°C por 1 min
	72°C por 1 min
Segmento 3, 1 ciclo	95°C por 1 min
Curva de Disociación	55°C por 30 s
	95°C por 30 s

**Tabla 2.** Programa de qPCR utilizado para determinar cantidad relativa de transcrito de la nucleoproteína N de hMPV en muestras de pulmón.

### **3.15 Análisis por FACS de infiltración de Neutrófilos y DCs**

Para determinar nivel de infiltración de neutrófilos y células dendríticas en los pulmones de los ratones inmunizados, éstos fueron extraídos y homogeneizados usando un cedazo de 70  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro con PBS a 5mM de EDTA. Posteriormente se realizó una lisis de eritrocitos utilizando tampón de lisis ACK. Luego se lavó dos veces con PBS estéril. A continuación se resuspendieron  $10^6$  células por cada ratón en 100 $\mu\text{L}$  de PBS 1X y se marcaron durante una hora con 0,2  $\mu\text{L}$  de anti-CD11b FITC, 0,2 $\mu\text{L}$  de anti-Gr1 (Ly-6G) APC y 0,2 $\mu\text{L}$  de anti-CD11c PE. La adquisición y el análisis de datos se realizó en un citómetro FACS VERSE utilizando el software FCAP Array version 3.0, ambos de BD Biosciences.

### **3.16 Procesamiento de muestras de bazo y cultivo de esplenocitos**

Con el objetivo de obtener cultivos de esplenocitos provenientes de los ratones inmunizados y de los grupos control se extrajeron los bazos de todos los ratones y se perfundieron con 10 mL de PBS 1X hasta obtener una suspensión celular. Las células se centrifugaron a 300 x g durante 6 minutos a 4°C, luego se re suspendieron en solución de lisis ACK. Posteriormente para extraer el tampón de lisis ACK se hizo un lavado final con PBS 1X y una centrifugación en las mismas condiciones anteriores. Luego, las células se re suspendieron en 3 mL de medio RPMI 1640 suplementado (5% de suero fetal bovino inactivado por calor, 1 mM de penicilina/estreptomicina, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 1 mM, 2-mercaptoetanol 50  $\mu\text{M}$ , HEPES 10mM y L-glutamina 2 mM).

Luego se procedió al conteo de células. Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular anterior y se mezclaron con 10  $\mu\text{L}$  de azul de tripán (dilución 1:2). Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución resultante y se observaron las células en un microscopio óptico con un aumento de 20X en una cámara de Neubauer. Para cuantificar la concentración de células se utilizó la fórmula:

$$\text{Células/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas}}{\text{Área conteo x profundidad x dilución}} \times 1000 \mu\text{L/mL}$$

$$\text{Células/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas}}{1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} \times 1/2} \times 1000 \mu\text{L/mL}$$

$$\text{Células/mL} = \text{n}^\circ \text{ de células contadas} \times 10 \times 2 \times 1000$$

Luego los esplenocitos se sembraron en placas de 24 pocillos a  $10^6$  células por pocillo y se estimularon con  $10 \mu\text{g/mL}$  de proteína recombinante N de hMPV. Las células se cultivaron durante 3 días a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Al día 3 de cultivo se recuperaron los sobrenadantes y se midió la concentración de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e IL17A secretadas al medio utilizando el sistema comercial BD OptEIA de ELISA sándwich.

### 3.17 Cuantificación de citoquinas por sándwich de ELISA

Para la determinación de interleuquinas secretadas al medio de cultivo por los esplenocitos se utilizó el método de ELISA sándwich. Primero la placa contenida en el sistema comercial de ELISA se activó con el anticuerpo de captura diluido 1:500 con PBS 1X toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  a un volumen de  $50 \mu\text{L}$  por pocillo. Luego las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0,1% y se realizó un lavado adicional con PBS libre de detergente. Posteriormente se procedió al bloqueo de la placa con PBS-BSA 1% y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Las placas nuevamente se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0,1% y un lavado con PBS libre de detergente. Se preparó una curva estándar de cuantificación cuyos valores límites dependieron de la citoquina en particular (Entre  $2000 \text{ pg/mL}$  y  $15 \text{ pg/mL}$  para IL-4 e IL-10, entre  $4000 \text{ pg/mL}$  y  $30 \text{ pg/mL}$  para IFN- $\gamma$  y entre  $2 \mu\text{g/mL}$  y  $0,5 \mu\text{g/mL}$  para IL-17). Luego se agregaron  $100 \mu\text{L}$  de la muestra a cuantificar en distintas diluciones con el objetivo de obtener valores interpolables entre los límites de la curva estándar de cuantificación. Se hizo una dilución 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:50 y sin diluir.

Tanto las muestras diluidas como la curva estándar se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Luego, después de eliminar el contenido de los pocillos las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0,1% y un lavado con PBS 1X libre de detergente. Luego se agregaron 50 µL del anticuerpo biotinilado anti-interleuquina en PBS-BSA al 1% diluido 1:2500 y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se eliminó el contenido de los pocillos y las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0,1% y un lavado con PBS 1X libre de detergente. Se agregaron 50 µL de estreptavidina-HRP a cada pocillo a una concentración de  $7,5 \times 10^{-6}$  mg/mL y se incubó durante 1 hora a 4°C. Luego se reveló con 50 µL de una solución 1:1 de peróxido y MTB, se esperó 3 minutos y se detuvo la reacción con 50 µL de ácido sulfúrico 2M. Finalmente se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA.

### **3.18 Extracción y preparación de sueros de ratones inmunizados**

Se tomaron muestras de sangre antes de inmunizar (suero pre-inmune), antes del desafío (suero pre-desafío) y al momento del sacrificio (suero post-desafío). Se extrajo la muestra de sangre desde el seno retro-orbital con capilares de 75 mm de largo y se extrajo una cantidad aproximada de 180 µL de sangre cada vez. Los ratones fueron anestesiados con ketamina/xilazina (100 (mg/Kg)/5 (mg/Kg)), antes de extraer la sangre. La sangre obtenida se incubó 30 minutos a 37°C, posteriormente se centrifugó a 4000 x g durante dos minutos.

### **3.19 Determinación de cantidades relativas de inmunoglobulina y caracterización de subclases IgG1 e IgG2A en suero**

Para la cuantificación de anticuerpos IgG específicos para la proteína N de hMPV se utilizó el sistema comercial Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit. Primero se activó una placa de ELISA durante toda la noche a 4°C con 1 µg de nucleoproteína N viral por pocillo en un volumen de 100 µL. Luego las placas se lavaron dos veces con PBS-Tween al 0,05% y se bloquearon con 200 µL PBS-BSA al 1% durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se lavaron con PBS-Tween al 0,05%. Diluciones seriadas de suero se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en un volumen final de 100 µL. Se incubó el control positivo con el anticuerpo monoclonal anti-His tag (Genescript). El control negativo se incubó con PBS. Después las placas se lavaron dos veces con PBS-Tween al 0,05% y una tercera vez con PBS 1X libre de detergente. Luego se agregó el anticuerpo secundario anti-mouse IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina contenido en el sistema comercial a una dilución final de 1:1000 en PBS-BSA al 1% y se incubándose durante una hora a 4°C. Finalmente, después de un último lavado se reveló la placa con 100 µL de solución de p-nitrofenilfosfato (pnPP) durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo después de 30 minutos con 50 µL de NaOH 3 M y se midió absorbancia a 405 nm de longitud de onda.

Para la cuantificación de las subclases de IgG1 e IgG2A se utilizó el sistema comercial immunoglobulin Isotyping ELISA kit. Se activaron placas de ELISA con 1 µg de proteína recombinante N de hMPV en un volumen de 100 µL por pocillo a 4°C durante toda la noche. Luego la placa se lavó 3 veces con solución de lavado y se agregaron 50 µL de suero por pocillo incubándose una hora a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron las placas con solución de lavado, se agregó 50 µL de anticuerpo anti-IgG1 o anti-IgG2A a una dilución 1:5 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavaron las placas por última vez con PBS 1X y se agregaron 100 µL de anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:200 y se



incubó a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 100  $\mu$ L de sustrato peroxidasa a cada pocillo, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se midió absorbancia a 450 nm.

### **3.20 Determinación de capacidad seroneutralizante de sueros inmunes sin desafiar e inmunes y desafiados con el virus hMPV**

Para determinar la capacidad seroneutralizante de los sueros obtenidos desde los ratones inmunizados y los ratones inmunizados y desafiados con el virus se infectaron células LLC-MK2 con inóculos virales incubados previamente con los sueros a estudiar. En resumen, primero se tomaron inóculos de un virus hMPV transgénico que expresa GFP (hMPV-GFP) y se mezclaron con los distintos sueros provenientes de los distintos grupos de ratones inmunizados o tratados en una dilución 1:50 en medio de cultivo Optimem libre de suero. Luego se incubaron durante una hora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego se utilizaron los inóculos para infectar células LLC-MK2 a un 90% de confluencia y a una MOI de 1. Se dejó absorber el inóculo viral durante una hora y se cambió el medio a RPMI. Luego de 24 horas se midió la expresión de GFP en las células LLC-MK2 infectadas mediante citometría de flujo.

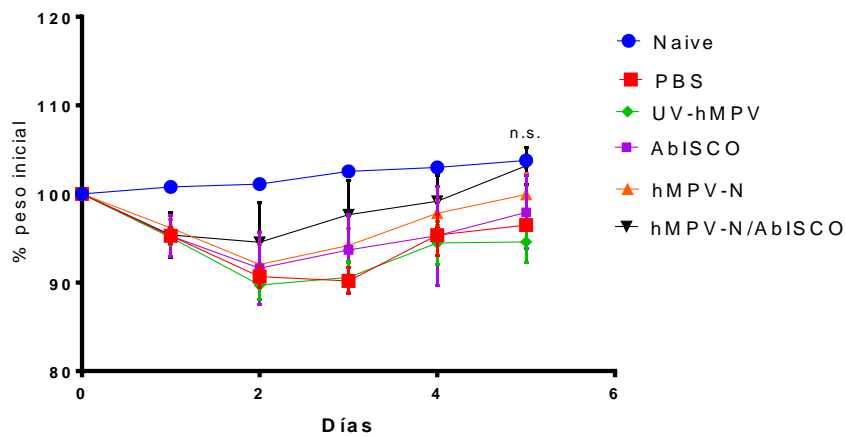
### **3.21 Análisis estadísticos**

Para determinar diferencias significativas entre los grupos experimentales se realizaron tests ANOVA de una vía y la corrección de Bonferroni utilizando el programa GraphPad versión 6.0 (GraphPad software, Inc, San Diego, CA).

## IV. Resultados

### **4.1 La inmunización con la proteína recombinante N de hMPV mas AbISCO-100 protege contra la pérdida de peso en una infección posterior con hMPV**

Diversos estudios han establecido que los ratones que se infectan con hMPV y desarrollan enfermedad respiratoria experimentan una baja de peso. Se ha determinado que ésta variable está asociada con la magnitud de la patología inducida por la infección[44]. En ésta tesis con el objetivo de evaluar éste parámetro asociado al nivel de enfermedad respiratoria se procedió a medir diariamente el peso de todos los animales después de la infección. En los grupos PBS 1X, PBS 1X/AbISCO y UV-hMPV se midió una pérdida de peso estadísticamente significativa. Sin embargo se encontró que la pérdida de peso en el grupo hMPV-N/AbISCO comparada con la del grupo PBS 1X o UV-hMPV es significativamente menor. Incluso al quinto día el peso del grupo N-hMPV/AbISCO igualó al peso del grupo *Naive* (Figura 4). Un efecto similar pero menor se observa en la evolución del peso del grupo inmunizado solamente con la nucleoproteína N. Además no se observó disminución de peso en el grupo Naive tratado intranasalmente con sobrenadante no infeccioso. Todas estas mediciones sugieren que los ratones vacunados del grupo hMPV-N/AbISCO no desarrollan patología después de la infección.

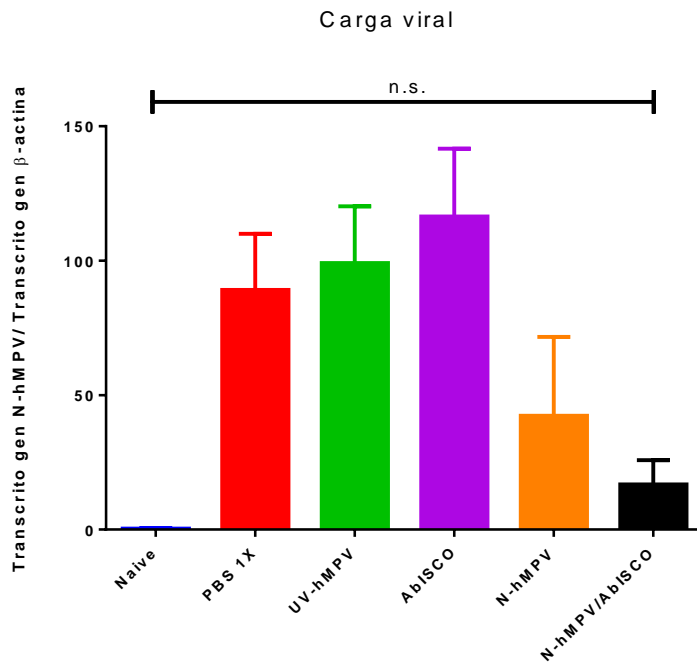


**Figura 7. Los ratones vacunados con la nucleoproteína N más el adyuvante AbISCO-100 pierden en promedio menos peso al ser infectados con hMPV y recuperan el mismo peso promedio que los ratones control *Naive* al quinto día post-infección.** Al ser infectados con el virus los ratones previamente vacunados con la nucleoproteína N de hMPV mas AbISCO-100(morado) pierden menos peso durante la evolución de la enfermedad y recuperan el mismo peso que los ratones *Naive*(negro) al quinto día post-infección. Por otro lado los ratones tratados con PBS(azul), PBS mas AbISCO-100 (rojo) y los inmunizados con hMPV inactivado por UV (naranja) experimentan una baja en su peso al ser infectados con hMPV y no logran recuperar el mismo peso que el grupo *Naive* al quinto día post-infección. Esto sugiere que los ratones vacunados con el prototipo de vacuna ensayado en esta tesis sufren de una patología leve y transiente si lo comparamos con los ratones no vacunados e infectados.

## **4.2 La inmunización con la proteína recombinante N de hMPV mas AbISCO-100 disminuye la carga viral frente a una infección posterior con hMPV**

El hMPV infecta a las células epiteliales respiratorias y replica en ellas con alta eficiencia en los primeros días post-infección[79] . Una forma de evaluar la capacidad del hospedero de protegerse contra la infección y contra la enfermedad respiratoria producida después de la infección es determinar la carga viral en las células blanco del virus. Para éste propósito se procedió a homogenizar los pulmones de los ratones evaluados y realizar extracción de RNA y síntesis de cDNA con el fin de cuantificar mediante RT-qPCR la presencia de transcrito de la nucleoproteína N de hMPV.

Como resultado se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad promedio de transcrito del gen de la nucleoproteína N siendo mucho menor en el grupo *Naive* y en el grupo vacunado con la nucleoproteína N de hMPV más AbISCO-100 comparado con los otros grupos experimentales (figura 5). Esto significa que la vacunación con la nucleoproteína N de hMPV más AbISCO-100 permite frente a una infección con hMPV una disminución significativa de la actividad transcripcional del gen de la nucleoproteína N de hMPV sobre sus células blanco. Este gen forma parte de un complejo proteico que empaqueta el genoma replicado de hMPV. Por lo tanto es vital para el desarrollo del ciclo viral[33, 34]. En conclusión es posible asumir que la vacunación produce una disminución significativa de ciclo viral activo en el hospedero. Las posibles razones de esta disminución se discutirán más adelante.



**Figura 8. La carga viral disminuye en los ratones vacunados con la proteína N de hMPV más AbISCO-100 luego de una infección con hMPV.** Al sexto día post-infección el nivel de expresión del transcrito de la nucleoproteína N en el pulmón de los ratones vacunados no difiere significativamente del grupo control *Naive* sin infectar. Por otro lado en los demás grupos los niveles de transcrito de la nucleoproteína N de hMPV son significativamente más altos. Por tanto es posible concluir que la vacunación con la nucleoproteína N de hMPV mas AbISCO-100 induce una disminución de la carga viral en los pulmones de los ratones vacunados. El análisis estadístico corresponde a un ANOVA de una vía y un análisis a posteriori de Bonferroni para comparaciones múltiples. (\*\*\*) = estadísticamente significativo, n.s. = no significativo)

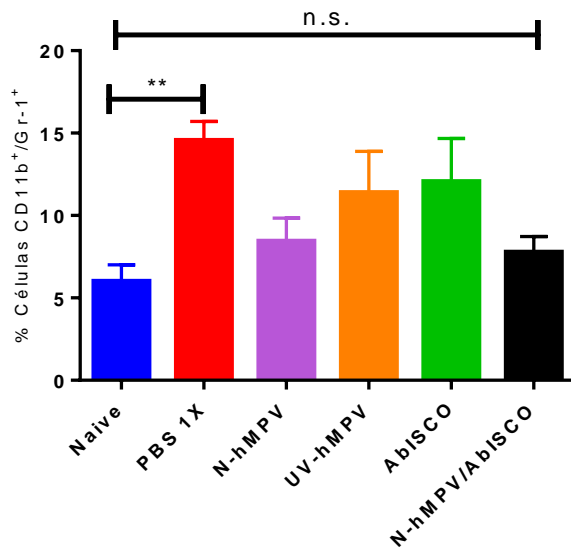
Con formato: Justificado, Interlineado: sencillo

Con formato: Fuente: Cursiva

### **4.3 La vacunación con la proteína N de hMPV más AbISCO-100 induce al quinto día post-infección una disminución en la infiltración de neutrófilos en el pulmón después del desafío con el virus**

Dentro de los parámetros más importantes en la patogénesis celular producida por la infección con hMPV se encuentra la infiltración con células inflamatorias principalmente granulocitos[80]. Con el objeto de evaluar el nivel de inflamación presente en el pulmón de los distintos ratones de los distintos grupos experimentales se procedió a la disgregación de los pulmones en sus componentes celulares y posteriormente al marcaje de CD11b y GR-1 con anticuerpos de citometría. Al analizar las células provenientes de los pulmones de los ratones de los distintos grupos experimentales, se encontró que la cantidad de granulocitos en el grupo *Naive* no tiene diferencias significativas con respecto al grupo inmunizado con la nucleoproteína N de hMPV más AbISCO, es decir la vacuna induce infiltración de granulocitos de nivel fisiológico al quinto día post-infección, protegiendo al pulmón de la acción deletérea de estas células sobre el tejido. Por otro lado si se compara el grupo tratado con PBS 1X con respecto al grupo inmunizado con la nucleoproteína N de hMPV más AbISCO-100, se encuentra que hay una magnitud significativamente mayor de infiltración granulocitos en pulmón. Por lo tanto la vacunación con la nucleoproteína N de hMPV más AbISCO-100, previene la infiltración de granulocitos frente a una infección con hMPV al quinto día post-infección. (Figura 9)

## Porcentaje de granulocitos infiltrados en pulmón



**Figura 9. Disminución de la infiltración de neutrófilos en el grupo vacunado.** Después de la infección con hMPV se observa una disminución de infiltración de granulocitos en los ratones vacunados con la nucleoproteína N más el adyuvante AbISCO-100. Por otro lado se observa que en el grupo vacunado la magnitud de infiltración de granulocitos es igual a la del grupo Naive no infectado.

Con formato: Fuente: Negrita

Con formato: Fuente: Negrita

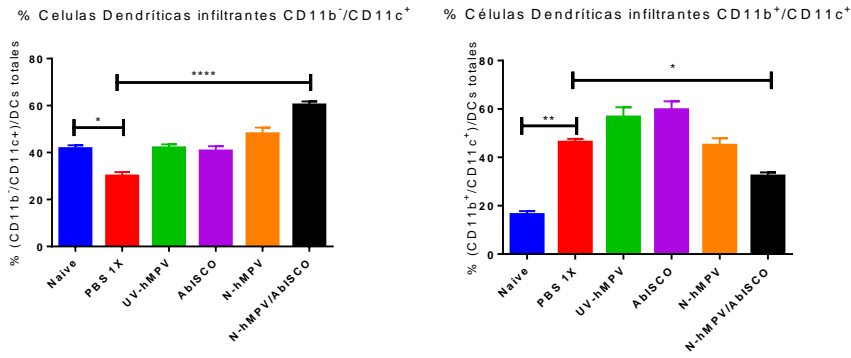
#### **4.4 En tejido pulmonar el prototipo de vacuna disminuye la infiltración de la subpoblación de células dendríticas CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> e incrementa la infiltración de células dendríticas CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>**

Con el fin de evaluar en los distintos grupos experimentales el fenotipo mayoritario presente de células dendríticas en el pulmón de los ratones después de la infección, se realizó un marcaje con anticuerpos de citometría. Esta medición se hizo puesto que las células dendríticas no solamente tienen una función en la presentación antigénica a las células T, sino también participan en la regulación de la respuesta inflamatoria. En particular, se ha descrito que en pulmón las células dendríticas CD11b<sup>-</sup> y CD11c<sup>+</sup> inducen una respuesta anti-inflamatoria que contribuye al mantenimiento de la homeostasis tisular[81], a diferencia de las células dendríticas CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> que promueven la respuesta inflamatoria y daño en el tejido[82].

Como resultado al determinar por citometría las poblaciones de células dendríticas infiltradas en el pulmón de los ratones analizados en esta tesis, se encontró que la población de células dendríticas CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> están presentes en mayor cantidad en el grupo vacunado con la nucleoproteína N de hMPV más AbISCO-100 en comparación al grupo infectado tratado con PBS 1X (Figura 10), lo que tendría un efecto protector contra la patología pulmonar. También se observa que esta infiltración es mayor con respecto al grupo *Naive*. Por lo tanto, la vacuna compuesta con la nucleoproteína N de hMPV más AbISCO-100 induce infiltración de células dendríticas con función anti-inflamatoria ante el desafío con el virus. Distinto es el caso de las células dendríticas infiltradas en los demás grupos evaluados, dado que ninguno de ellos mostró alta infiltración de células dendríticas CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>. Sin embargo sí mostraron alta infiltración de células dendríticas CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>, fenotipo asociado a la exacerbación de la inflamación. En conclusión, la vacuna compuesta por la nucleoproteína N de hMPV más AbISCO-100 induce infiltración de células dendríticas que podrían proteger al animal del daño por exacerbación de la respuesta inflamatoria (Figura 10).

Con formato: Fuente: Cursiva

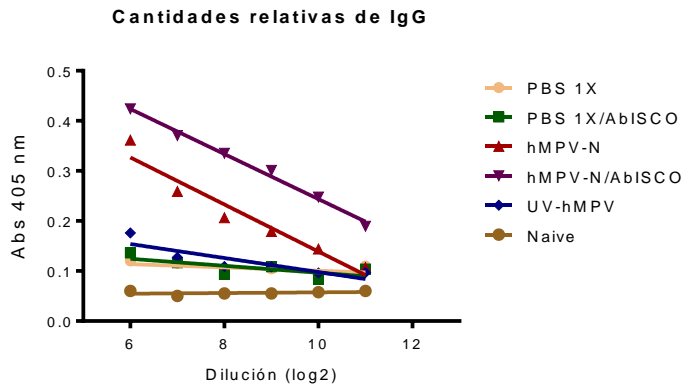




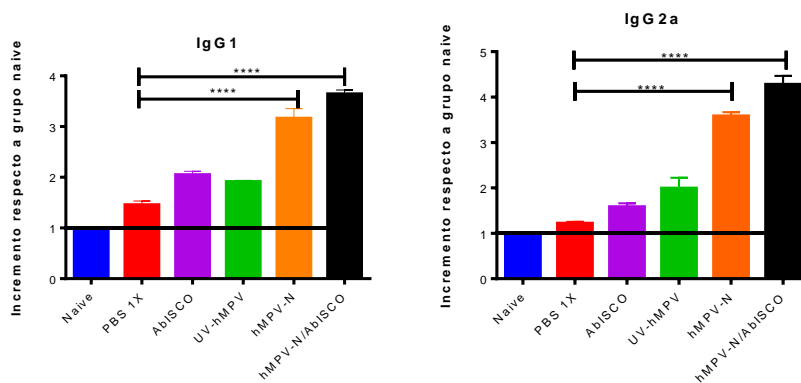
**Figura 10. Fenotipo de células dendríticas CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> infiltradas en los pulmones del grupo vacunado.** La vacunación con la proteína N de hMPV mas el adyuvante AbISCO induce en el pulmón un aumento de infiltración promedio del fenotipo de célula dendrítica CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> y una disminución en la infiltración del fenotipo proinflamatorio CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> ante una infección posterior con hMPV (Izquierda). Por otro lado la vacunación con la proteína N de hMPV más el adyuvante AbISCO induce en el pulmón una disminución del fenotipo proinflamatorio CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> (Derecha). Mientras tanto la situación inversa se produce en el grupo no vacunado PBS 1X en ambas gráficas.

#### **4.5 La vacuna induce un incremento de los niveles de IgG en suero con una tendencia hacia el isotipo IgG2A.**

Con el fin de caracterizar la respuesta humoral inducida por la vacuna ensayada en esta tesis se realizó un ensayo de cuantificación de isotipo IgG presente en el suero de los animales evaluados. Se decidió determinar el nivel en sangre de este isotipo puesto que su presencia está asociada a la respuesta inmune adaptativa humoral secundaria después de que se ha producido maduración o cambio de isotipo. Esto para evaluar la capacidad del prototipo de vacuna de desencadenar la secreción de anticuerpos que participan en una respuesta profiláctica -humoral protectora. Como resultado al analizar los sueros de los ratones de los distintos grupos, se observó que en el grupo inmunizado con la nucleoproteína N de hMPV más AbISCO-100 existe un aumento de la cantidad de inmunoglobulina G específica para la nucleoproteína N de hMPV. Por lo tanto la vacuna es capaz de inducir una respuesta humoral contra la proteína N significativamente mayor que en el resto de los grupos evaluados (Figura 10). Adicionalmente se midió la presencia del isotipo IgG 2A con capacidad de participar en respuesta antivirales de perfil Th1, un perfil de respuesta especializado en el combate antiviral. Al analizar la cantidad de isotipo de IgG se vio que en el grupo vacunado el isotipo IgG2A está en mayor cantidad con respecto al resto de los grupos de ratones analizados- (Figura 11).



**Figura 10.** Los ratones vacunados con la nucleoproteína N más AbISCO-100 contienen una mayor cantidad de isotipo IgG en su sangre con respecto a los ratones no vacunados. Gráfico de cuantificación de IgG por ELISA con diluciones seriadas de sueros provenientes de los distintos grupos de ratones. Se observa que en el grupo vacunado con N-hMPV-AbISCO-100 hay mayor presencia de IgG en suero que en el resto de los grupos evaluados.

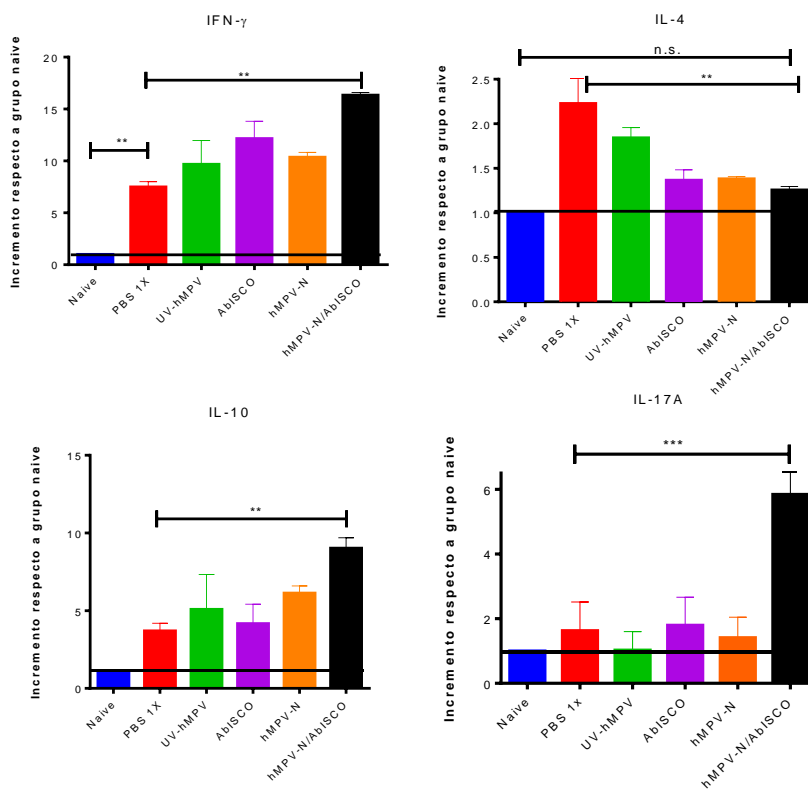


**Figura 11.** Los ratones vacunados con la nucleoproteína N más AbISCO-100 contienen una mayor cantidad de isotipo IgG subtipo IgG2A en suero con respecto a los ratones no vacunados.

#### **4.6 La vacuna induce un aumento de secreción de INF- $\gamma$ , IL-10 e IL-17 desde esplenocitos en cultivo provenientes de ratones vacunados y desafiados mostrando un perfil de respuesta T ayudadora híbrida tipo Th1/Th17 ante la estimulación con la proteína N de hMPV.**

Para evaluar el perfil de respuesta T que induce la vacuna se midió la concentración de citoquinas en los sobrenadantes de los esplenocitos en cultivo correspondientes a los ratones de los distintos grupos experimentales. Esta medición se justifica en la medida que se ha demostrado que la respuesta inmune adaptativa que despliega el linfocito T ayudador se caracteriza por perfiles de respuesta Th que inducen distintos componentes inmunes adaptados a patógenos con características específicas. En el caso de la respuesta inmune antiviral se ha demostrado que la mejor respuesta de linfocito T ayudador corresponde a la Th1. Este perfil de respuesta se puede estudiar estimulando a esplenocitos provenientes del animal con el antígeno de interés y posteriormente analizando la concentración de citoquinas secretadas por estos esplenocitos. Se ha determinado que la respuesta Th1 se caracteriza por una alta concentración de INF- $\gamma$ , por otro lado como se explicó en la introducción, la enfermedad respiratoria producida ante una infección por hMPV produce un perfil de respuesta tipo Th2 que se caracteriza principalmente por mostrar altas concentraciones de IL-4 por parte de los linfocitos T ayudadores previamente sensibilizados con el antígeno. Como resultado, al cuantificar el perfil de citoquinas secretado por esplenocitos en cultivo y estimulados con la nucleoproteína N de hMPV (Figura 13) se encontró una concentración significativamente superior de INF- $\gamma$ , de IL-10 e IL-17A en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos proveniente de los ratones vacunados con la nucleoproteína N de hMPV más AbISCO-100 en comparación con el resto de los grupos experimentales. No se encontraron niveles de IL-4 significativamente superiores a los del grupo *Naive* en los sobrenadantes provenientes del cultivo de esplenocitos extraídos desde los ratones vacunados con la proteína N de hMPV más el adyuvante AbISCO. Por otro lado, se encontró un aumento significativo de IL-4 en los sobrenadantes provenientes del cultivo de esplenocitos

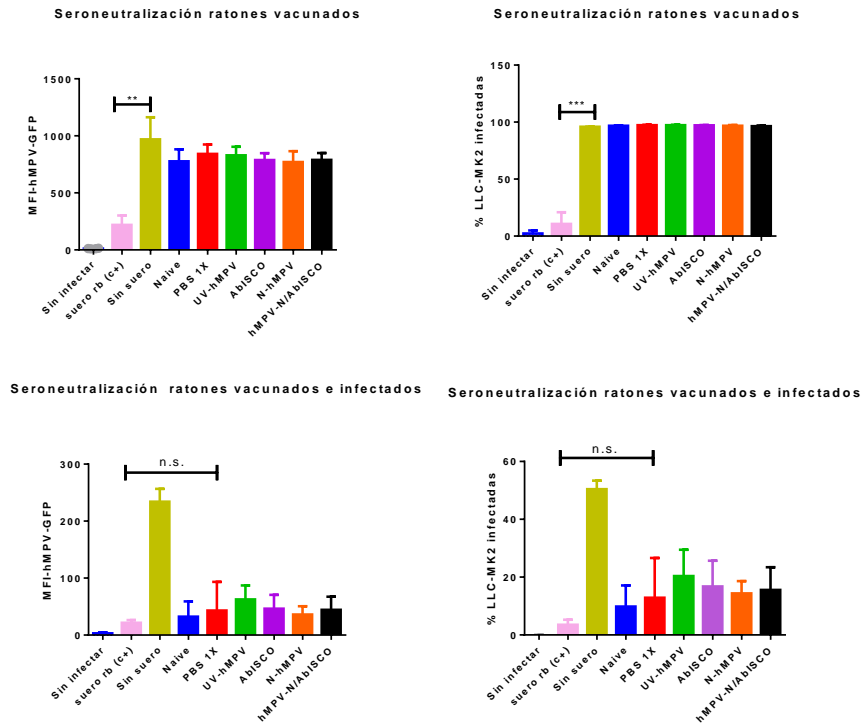
extraídos desde los ratones tratados con virus UV y desafiados con el virus hMPV y en el cultivo de esplenocitos proveniente del grupo PBS-1X, perfil de respuesta asociado a la patología inducida por la infección con hMPV. En conclusión la vacuna logró producir una respuesta inmune específica contra el antígeno que contiene en su formulación y esta respuesta corresponde a la de un perfil híbrido Th1/Th17 (Figura 12).



**Figura 12. Perfil de citoquinas Th1/Th17 secretadas al medio de cultivo por esplenocitos en el grupo vacunado.** El cultivo de esplenocitos del grupo vacunado al ser estimulado con la proteína N de hMPV muestra una alta secreción de INF- $\gamma$  e IL-17 lo que define un perfil de respuesta T tipo Th1/Th17. También se observa una alta secreción de IL-10. Por otro lado el perfil de respuesta medido en el grupo PBS 1X muestra un perfil Th2 al mostrar una importante magnitud de secreción de IL-4 y una magnitud significativamente menor de secreción de INF- $\gamma$  e IL-17 en comparación con el grupo vacunado.

#### **4.7 La vacuna no induce la producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus que permitan evitar la infección. La infección por sí misma induce la producción de anticuerpos neutralizantes contra hMPV en todos los grupos**

Con el fin de determinar la capacidad de los anticuerpos provenientes de los sueros de los distintos grupos experimentales, se hizo un ensayo de inhibición de infección que consiste en incubar los inóculos virales con suero extraído a los ratones vacunados o vacunados e infectados, y posteriormente el ensayo de estas preparaciones de inóculo viral más suero sobre células LLC-MK2 permisivas a la infección. La detección del virus sobre las células es posible gracias a la expresión de proteína fluorescente verde proveniente del virus por parte de las células infectadas. Al analizar la capacidad neutralizante de los sueros provenientes de los distintos grupos experimentales no se encontró capacidad neutralizante contra la infección viral por parte de ninguno de los sueros obtenidos de cualquiera de los grupos experimentales de ratones previo a la infección. Posterior a la infección sí se observó capacidad neutralizante por parte de todos los sueros. La intensidad de fluorescencia media (MFI) y el porcentaje de células infectadas fue estadísticamente similar por lo tanto todas las células se infectaron con aproximadamente la misma cantidad de virus y en el mismo porcentaje (Figura 13). En conclusión la vacuna compuesta por la nucleoproteína N de hMPV más AbISCO-100 no induce por sí misma una respuesta humoral neutralizante de partículas virales que pueda evitar la infección mediante este mecanismo. Aun así es posible que los anticuerpos inducidos por la vacuna puedan proteger al animal en etapas resolutivas de la enfermedad, por ejemplo mediante ADCC o fijación del complemento de células infectadas. Tales mecanismos de protección requieren nuevos experimentos que evalúen esta hipótesis.



**Figura 13. La vacunación con la nucleoproteína N de hMPV mas el adyuvante AbISCO no induce producción de anticuerpos neutralizantes.** Los sueros obtenidos de los ratones del grupo vacunado no neutralizaron la infección de las células LLC-MK2 por hMPV al igual que los sueros provenientes del resto de los animales en experimentación. Ningún grupo logro el porcentaje de neutralización del control positivo de neutralización utilizado (siero de conejo). Por otro lado todos los ratones desarrollaron anticuerpos neutralizantes al ser desafiados con el virus hMPV. Por lo tanto la vacuna compuesta por la nucleoproteína N de hMPV más el adyuvante AbISCO no induce ninguna variación en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra la infección.

## V. Discusión

El Metapneumovirus humano es actualmente un importante problema de salud pública a nivel mundial [83], por lo tanto el desarrollo de una vacuna contra este virus es urgente. En este estudio evaluamos la capacidad de proteínas virales purificadas del virus metapneumovirus solas o combinadas con un adyuvante AbISCO-100 con el propósito de estudiar si este tipo de formulación es capaz de conferir inmunidad protectora contra un desafío con este patógeno en modelo murino. Para medir la efectividad de la vacuna ensayada y la robustez del modelo animal se evaluaron múltiples parámetros de patogénesis de la enfermedad descritos anteriormente en la literatura[44] y se compararon con los datos obtenidos. Se observó que la vacunación intraperitoneal con proteína N de hMPV más AbISCO-100 reduce significativamente la pérdida de peso de este grupo comparado al resto de los grupos desafiados. Al día 5 los ratones inmunizados con la vacuna ensayada equiparan su peso con respecto al grupo control sin desafiar (grupo Naive), por lo tanto el prototipo de vacuna ensayado protegió a los animales contra la pérdida de peso. Adicionalmente se sabe que al sexto día post-infección la infiltración de granulocitos llega a constituir el 25% del total de células los pulmones[84]. Se obtuvieron resultados similares en la citometría de flujo con aproximadamente un 25% de infiltración de granulocitos en el grupo desafiado sin inmunizar, mientras que la infiltración de granulocitos en el grupo inmunizado con la nucleoproteína N de hMPV mas AbISCO se produjo una disminución de infiltración bajo el 10%, por consiguiente la vacuna ensayada protege contra la infiltración excesiva de éstas células inflamatorias protegiendo al pulmón de daño inflamatorio. Por otro lado, la determinación de infiltración de subpoblaciones de células dendríticas de fenotipo CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> y fenotipo CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> en el pulmón al sexto día p.i. es importante, ya que éstas subpoblaciones de células dendríticas tienen distintas propiedades inmunes. Las células dendríticas derivadas de monocitos de fenotipo CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> actúan en procesos inflamatorios, tienen capacidad microbicida y son capaces de modular la producción de



inmunoglobulinas por parte de las células B. Están asociadas a respuestas tipo Th2[85], la cual es una respuesta T efectora inmunopatológica e ineficiente en la respuesta inmune a la infección por hMPV. Los resultados muestran que en el grupo sin inmunizar la infección promueve en el pulmón la infiltración de células dendríticas inflamatorias CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> dato obtenido anteriormente en otras investigaciones, mientras que en el grupo vacuna se inhibe la infiltración de esta subpoblación al desafiar con hMPV. De acuerdo a los resultados al momento de enfrentar la infección por hMPV en el grupo vacuna filtra en el pulmón principalmente la subpoblación de células dendríticas CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>. Esto respalda la idea de que la vacuna es capaz de inducir al momento del desafío con hMPV la infiltración de una subpoblación de células dendríticas capaces de proteger contra la enfermedad inducida por la infección con hMPV. Esta capacidad funcional de las células dendríticas CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> infiltradas en los pulmones del grupo inmunizado y desafiado con el virus se puede relacionar con los resultados de citoquinas secretadas por esplenocitos en cultivo de los diferentes grupos experimentales. Los resultados muestran que en el grupo inmunizado se observa una secreción significativamente mayor de INF- $\gamma$  e IL-10 y una baja secreción de IL-4, una citoquina capaz de desencadenar la respuesta Th2 en la célula T CD4<sup>+</sup>. El patrón de secreción INF- $\gamma$  más IL-10 ha sido mostrado antes en literatura durante la infección con otro virus respiratorio como es la influenza[86]. En este trabajo previo se ha mostrado que la secreción de INF- $\gamma$  junto con IL-10 por parte de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> está asociada a una respuesta inmunológica protectora Th1 que combate al virus y al mismo tiempo se autorregula para no producir una respuesta inmunológica exacerbada que podría contribuir a la enfermedad mediante la secreción de IL-10. Esta idea ha sido reforzada por trabajos recientes que describen la función de *feedback* auto regulatorio ejercido por IL-10 que sirve como señal de restricción de las respuestas Th1 y Th2 exacerbadas[87]. En nuestros resultados observamos que el perfil de citoquinas INF- $\gamma$ /IL-10 es inducido por la vacuna, lo que sugiere que se estaría induciendo un perfil de citoquinas protector que podría estar secretado por células T CD4<sup>+</sup> Th1 o células T citotóxicas secretoras de INF- $\gamma$  e IL-10. Adicionalmente se obtuvo un alto

nivel de secreción de IL-17A en el grupo vacunado, lo que podría indicar un rol protector importante por parte de las células Th17, en otros estudios de respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis* se ha reportado que la infiltración inicial de células Th17 es condición necesaria para la posterior infiltración de células Th1 [88]. Para probar ésta hipótesis hace falta estudiar de forma más específica a las células T en los ratones vacunados. Por otro lado se ha mostrado en la literatura que la respuesta humoral inducida por la infección es débil en modelo murino, y que la infección puede persistir incluso cuando se logra inducir la producción de anticuerpos neutralizantes[79]. Por lo tanto, aunque en los resultados en esta tesis también se muestra que la infección induce la producción de anticuerpos neutralizantes después de la infección primaria, éstos no serían eficientes para proteger contra el desarrollo de la enfermedad, por lo tanto sería necesaria la respuesta eficiente de células T. Por otro lado se ha mostrado en literatura que la transferencia pasiva de anticuerpos permite disminuir el título viral[43], esto sugiere que aunque los anticuerpos neutralizantes no son completamente protectores, sí son un componente importante de la respuesta inmune protectora. En este sentido los resultados muestran que la vacuna induce una respuesta humoral de isotipo IgG2A, el cual está asociado a la respuesta inmunológica tipo Th1. El isotipo IgG2A es un potente mediador de la fijación del complemento[89], con capacidad de neutralizar virus[90] y con capacidad de facilitar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos[91]. Este último mecanismo efector podría estar ayudando a la resolución de la enfermedad en el grupo de ratones inmunizados con ISCOMATRIX más la nucleoproteína N de hMPV. Puesto que los resultados muestran que la vacuna no induce anticuerpos neutralizantes que permitan prevenir la infección de células LLC-MK2 por parte de hMPV, es posible argumentar que la vacuna testada induce la producción anticuerpos contra una proteína viral que no está expuesta en la partícula viral. Sin embargo, es posible que el anticuerpo pueda proteger al animal mediante otros mecanismos efectores dependientes de anticuerpo como ADCC o fijación del complemento que permitan eliminar células infectadas. En resumen, la vacuna testada induce protección inmune contra la

enfermedad producida por el virus hMPV y no produce anticuerpos neutralizantes por sí misma. Por lo tanto los resultados sugieren fuertemente que el mecanismo de protección inmune es dependiente de células del sistema inmune innato y adaptativo que responderían a un tipo de respuesta eventualmente dirigido por células T específicas contra hMPV con una polarización Th1/Th17.

## **VI. Conclusiones**

- El prototipo de vacuna ensayada en esta tesis induce inmunidad protectora contra la enfermedad producida por el Metapneumovirus humano.
- La respuesta inmune protectora tiene una polarización Th1/Th17 y su mecanismo no depende de anticuerpos neutralizantes.

## VII. Referencias

1. Kahn, J.S., *Epidemiology of human metapneumovirus*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(3): p. 546-57.
2. Tanner, H., E. Boxall, and H. Osman, *Respiratory viral infections during the 2009-2010 winter season in Central England, UK: incidence and patterns of multiple virus co-infections*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012. **31**(11): p. 3001-6.
3. Organization, W.H., *World Health Statistics 2012*. 2012: p. 35.
4. Debiaggi, M., et al., *The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children*. Virol J, 2012. **9**(1): p. 247.
5. Murray, C., A. Lopez, C. Mathers, and C. Stein, *The Global Burden of Disease 2000 project: aims, methods and data sources*. In *Global programme on evidence for health policy*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2001.
6. Papenburg, J. and G. Boivin, *The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus*. Rev Med Virol, 2010. **20**(4): p. 245-60.
7. Wang, Y., et al., *Seasonal distribution and epidemiological characteristics of human metapneumovirus infections in pediatric inpatients in Southeast China*. Arch Virol, 2012.
8. van den Hoogen, B.G., et al., *A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease*. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 719-24.
9. Garcia, J., et al., *Human metapneumovirus strains circulating in Latin America*. Arch Virol, 2012. **157**(3): p. 563-8.
10. Sumino, K.C., et al., *Detection of severe human metapneumovirus infection by real-time polymerase chain reaction and histopathological assessment*. J Infect Dis, 2005. **192**(6): p. 1052-60.
11. Boivin, G., et al., *An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(9): p. 1152-8.
12. Boivin, G., et al., *Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups*. J Infect Dis, 2002. **186**(9): p. 1330-4.
13. Bastien, N., et al., *Human metapneumovirus infection in the Canadian population*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(10): p. 4642-6.
14. Boivin, G., et al., *Human metapneumovirus infections in hospitalized children*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(6): p. 634-40.
15. Esper, F., et al., *A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years*. J Infect Dis, 2004. **189**(8): p. 1388-96.
16. Peret, T.C., et al., *Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America*. J Infect Dis, 2002. **185**(11): p. 1660-3.
17. Simoes, E.A.F., et al., *Acute Respiratory Infections in Children*, in *Disease Control Priorities in Developing Countries*, D.T. Jamison, et al., Editors. 2006: Washington (DC).
18. Dasaraju, P.V. and C. Liu, *Infections of the Respiratory System*, in *Medical Microbiology*, S. Baron, Editor. 1996: Galveston (TX).
19. Chiu, C.Y., *Viral pathogen discovery*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(4): p. 468-78.
20. Lipkin, W.I., *Pathogen discovery*. PLoS Pathog, 2008. **4**(4): p. e1000002.
21. Schluger, N.W., *The acute respiratory infections atlas*. World lung foundation. 2010.
22. Ruuskanen, O., et al., *Viral pneumonia*. Lancet, 2011. **377**(9773): p. 1264-1275.
23. Hahn, A., et al., *Human metapneumovirus infections are associated with severe morbidity in hospitalized children of all ages*. Epidemiol Infect, 2013. **141**(10): p. 2213-23.
24. Freymuth F, V.A., Lebon P, Legrand L, Bach N, Brouard J, et al, *Le metapneumovirus humain*. Virologie, 2004. **8**: p. 413-23.
25. Edwards, K.M., et al., *Burden of human metapneumovirus infection in young children*. N Engl J Med, 2013. **368**(7): p. 633-43.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Izquierda

26. Haas, L.E., et al., *Human metapneumovirus in adults*. *Viruses*, 2013. **5**(1): p. 87-110.
27. Widmer, K., et al., *Rates of hospitalizations for respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and influenza virus in older adults*. *J Infect Dis*, 2012. **206**(1): p. 56-62.
28. Jaime Lozano C., L.Y.P., Michelangelo Lapadula A., Monica Lafourcade R., Felipe Burgos F., Luis Herrada H., Isolda Budnik O., *Infección por metapneumovirus humano en niños hospitalizados por una enfermedad respiratoria aguda grave: Descripción clínico-epidemiológica*. *Revista Chilena de enfermedades respiratorias*, 2009. **25**: p. 211-217.
29. Leung, J., et al., *Seroepidemiology of human metapneumovirus (hMPV) on the basis of a novel enzyme-linked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus*. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(3): p. 1213-9.
30. Principi, N., S. Bosis, and S. Esposito, *Human metapneumovirus in paediatric patients*. *Clin Microbiol Infect*, 2006. **12**(4): p. 301-8.
31. Principi, N., S. Esposito, and S. Bosis, *Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in children*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(17): p. 1788-90; author reply 1788-90.
32. Caracciolo, S., et al., *Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with acute respiratory tract disease: virologic and clinical features*. *Pediatr Infect Dis J*, 2008. **27**(5): p. 406-12.
33. Knipe David M., H.P.M., *Paramyxoviruses. Fields Virology. Sixth Edition. Wolters Kluwer. Lippincott Williams & Williams.*: p. 957-995.
34. Schildgen, V., et al., *Human Metapneumovirus: lessons learned over the first decade*. *Clin Microbiol Rev*, 2011. **24**(4): p. 734-54.
35. MANDELL, D., and BENNETT'S, *PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFECTIOUS DISEASES*. 2010: p. 2227.
36. Mahalingam, S., et al., *Perspective on the host response to human metapneumovirus infection: what can we learn from respiratory syncytial virus infections?* *Microbes Infect*, 2006. **8**(1): p. 285-93.
37. Kolli, D., et al., *Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits TLR4-dependent signaling in monocyte-derived dendritic cells*. *J Immunol*, 2011. **187**(1): p. 47-54.
38. Arnold, J.C., et al., *Human metapneumovirus associated with central nervous system infection in children*. *Pediatr Infect Dis J*, 2009. **28**(12): p. 1057-60.
39. Hamelin, M.E., et al., *Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice*. *J Infect Dis*, 2006. **193**(12): p. 1634-42.
40. Darniot, M., et al., *Immune response and alteration of pulmonary function after primary human metapneumovirus (hMPV) infection of BALB/c mice*. *Vaccine*, 2005. **23**(36): p. 4473-80.
41. Papenburg, J. and G. Boivin, *The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus*. *Reviews in Medical Virology*, 2010. **20**(4): p. 245-260.
42. Guerrero-Plata, A., et al., *Activity and regulation of alpha interferon in respiratory syncytial virus and human metapneumovirus experimental infections*. *J Virol*, 2005. **79**(16): p. 10190-9.
43. Alvarez, R. and R.A. Tripp, *The immune response to human metapneumovirus is associated with aberrant immunity and impaired virus clearance in BALB/c mice*. *J Virol*, 2005. **79**(10): p. 5971-8.
44. Hamelin, M.E., et al., *Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats*. *J Virol*, 2005. **79**(14): p. 8894-903.
45. Cespedes, P.F., P.A. Gonzalez, and A.M. Kalergis, *Human metapneumovirus keeps dendritic cells from priming antigen-specific naive T cells*. *Immunology*, 2013. **139**(3): p. 366-76.

46. Guerrero-Plata, A., A. Casola, and R.P. Garofalo, *Human metapneumovirus induces a profile of lung cytokines distinct from that of respiratory syncytial virus*. J Virol, 2005. **79**(23): p. 14992-7.
47. Kolli, D., et al., *T lymphocytes contribute to antiviral immunity and pathogenesis in experimental human metapneumovirus infection*. Journal of Virology, 2008. **82**(17): p. 8560-8569.
48. Belz, G., A. Mount, and F. Masson, *Dendritic cells in viral infections*. Handb Exp Pharmacol, 2009(188): p. 51-77.
49. Stumbles, P.A., J.W. Upham, and P.G. Holt, *Airway dendritic cells: co-ordinators of immunological homeostasis and immunity in the respiratory tract*. APMIS, 2003. **111**(7-8): p. 741-55.
50. Schon-Hegrad, M.A., et al., *Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways*. J Exp Med, 1991. **173**(6): p. 1345-56.
51. McWilliam, A.S., et al., *Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli*. J Exp Med, 1996. **184**(6): p. 2429-32.
52. Grayson, M.H. and M.J. Holtzman, *Emerging role of dendritic cells in respiratory viral infection*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(10): p. 1057-68.
53. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
54. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 412-24.
55. del Rio, M.L., et al., *CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6861-6.
56. Dudziak, D., et al., *Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo*. Science, 2007. **315**(5808): p. 107-11.
57. Lin, K.L., et al., *CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2562-72.
58. Plantinga, M., et al., *Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 322-35.
59. Soroosh, P., et al., *Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance*. J Exp Med, 2013. **210**(4): p. 775-88.
60. Furuhashi, K., et al., *Mouse lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T-cell responses*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. **46**(2): p. 165-72.
61. Guerrero-Plata, A., et al., *Subversion of pulmonary dendritic cell function by paramyxovirus infections*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 3072-83.
62. Ebihara, T., et al., *Early reinfection with human metapneumovirus in an infant*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(12): p. 5944-6.
63. van den Hoogen, B.G., et al., *Experimental infection of macaques with human metapneumovirus induces transient protective immunity*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 4): p. 1251-9.
64. Durbin, J.E. and R.K. Durbin, *Respiratory syncytial virus-induced immunoprotection and immunopathology*. Viral Immunol, 2004. **17**(3): p. 370-80.
65. Cespedes, P.F., P.A. Gonzalez, and A.M. Kalergis, *Human metapneumovirus keeps dendritic cells from priming antigen-specific naive T cells*. Immunology, 2013.
66. Tang, R.S., et al., *Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity*. J Virol, 2003. **77**(20): p. 10819-28.

67. Cseke, G., et al., *Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats*. J Virol, 2007. **81**(2): p. 698-707.
68. Herfst, S., et al., *Immunogenicity and efficacy of two candidate human metapneumovirus vaccines in cynomolgus macaques*. Vaccine, 2008. **26**(33): p. 4224-30.
69. Hamelin, M.E., et al., *Enhanced lung disease and Th2 response following human metapneumovirus infection in mice immunized with the inactivated virus*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 12): p. 3391-400.
70. Herfst, S., et al., *Generation of temperature-sensitive human metapneumovirus strains that provide protective immunity in hamsters*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 7): p. 1553-62.
71. Bastien, N., et al., *Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains*. Virus Res, 2003. **93**(1): p. 51-62.
72. Herd, K.A., et al., *Cytotoxic T-lymphocyte epitope vaccination protects against human metapneumovirus infection and disease in mice*. J Virol, 2006. **80**(4): p. 2034-44.
73. Morein, B., et al., *Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses*. Nature, 1984. **308**(5958): p. 457-60.
74. Drane, D., et al., *ISCOMATRIX adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines*. Expert Rev Vaccines, 2007. **6**(5): p. 761-72.
75. Schnurr, M., et al., *ISCOMATRIX adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II*. J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1253-9.
76. Duenwell, P., et al., *ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells in vivo leading to effective cross-priming of CD8+ T cells*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 55-63.
77. Bertani, G., *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 1951. **62**(3): p. 293-300.
78. Alvarez, R. and R.A. Tripp, *The immune response to human metapneumovirus is associated with aberrant immunity and impaired virus clearance in BALB/c mice*. Journal of Virology, 2005. **79**(10): p. 5971-5978.
79. Alvarez, R., et al., *Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 14003-11.
80. Huck, B., et al., *Human metapneumovirus induces more severe disease and stronger innate immune response in BALB/c mice as compared with respiratory syncytial virus*. Respir Res, 2007. **8**: p. 6.
81. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
82. del Rio, M.L., et al., *CX3CR1+ c-kit+ bone marrow cells give rise to CD103+ and CD103- dendritic cells with distinct functional properties*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6178-88.
83. Lozano, R., et al., *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2095-128.
84. Kolli, D., et al., *T lymphocytes contribute to antiviral immunity and pathogenesis in experimental human metapneumovirus infection*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8560-9.
85. Leon, B. and C. Ardavin, *Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(4): p. 320-4.
86. Sun, J., et al., *Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10*. Nat Med, 2009. **15**(3): p. 277-84.
87. Ng, T.H., et al., *Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 129.
88. Khader, S.A., et al., *IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 369-77.

89. Klaus, G.G., et al., *Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody*. Immunology, 1979. **38**(4): p. 687-95.
90. Coutelier, J.P., et al., *IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections*. J Exp Med, 1987. **165**(1): p. 64-9.
91. Kipps, T.J., et al., *Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies*. J Exp Med, 1985. **161**(1): p. 1-17.