

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**



**“IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS Y REGIONES
INMUNODOMINANTES EN PROTEÍNAS VIRALES DE
HANTAVIRUS ANDES”**

**Seminario de título entregado a la
Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
Para optar al título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular**



**Andrés Mori Arellano
Julio 2008
Santiago – Chile**

Director de Seminario de Título: Paulette Conget PhD.

UCH-FC
Biotecnología
M 854
C. 1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS Y REGIONES INMUNODOMINANTES
EN PROTEÍNAS VIRALES DE HANTAVIRUS ANDES”**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

ANDRÉS MORI ARELLANO

Dra. Paulette Conget
Director Seminario de Título



Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente Comisión

Dr. Marcelo López Lastra
Corrector

Santiago de Chile, 3 Agosto de 2008

Per aspera ad astra



Agradecimientos

A continuación me tomaré unas líneas de este tomo para dar agradecimientos sin un orden específico.

- A mi familia, a mis hermanos que me ayudaron en tiempos de incertidumbre y en especial a mi madre Cristina, la mujer que me regaló la vida.
- A mis padrinos Jaime y Aurora, quienes siempre me han apoyado más allá de lo esperado y me han demostrado su cariño como a un hijo más.
- A la gente de la Udd, a los integrantes del instituto de ciencias y del grupo hantavirus. A todos esos héroes no laureados que contribuyeron de las más diversas formas al desarrollo de esta tesis.
- A Tobias y a Rebecca, por todo lo que aprendí de ellos y por darme a conocer las ventajas de la aplicación del rigor germano a la investigación.
- A los charistas de planta y asociados, gracias por hacerme parte de una familia engendrada a partir de diversas circunstancias, que ha sido una fuente de inspiración y apoyo incondicional. Gracias por hacer del Charismo, parte de mi identidad histórica.
- A Richard Kawada y a Pateste, el santo charista, por ayudarme a resolver la crisis vocacional y convertirme en un creyente del metodismo científico.



Índice de contenidos

1.- Índice de tablas	vi
2.- Índice de figuras	vi
3.- Lista de abreviaturas	vii
4.- Resumen	ix
5.- Abstract	xi
6.- Introducción	1
6.1.- Epidemiología	1
6.2.- Virología	3
6.3.- Patogénesis	4
6.3.1.- Efectos directos	5
6.3.2.- Efectos indirectos	7
6.4.- Inmunidad	8
6.4.1.- Inmunidad humoral	8
6.4.2.- Inmunidad celular	9
6.4.3.- Consideraciones para el desarrollo de una vacuna	12
7.- Hipótesis y objetivos	13
7.1.- Hipótesis	13
7.2.- Objetivo general	13
7.3.- Objetivos específicos	13
8.- Pacientes, materiales y métodos	15
8.1.- Pacientes	15
8.2.- Consideraciones bioéticas	15
8.3.- Medios de cultivo celular	15
8.4.- Obtención de células sanguíneas mononucleadas periféricas (PBMC)	16





8.5.- Cuantificación de PBMC	16
8.6.- Criopreservación de PBMC	17
8.7.- Descongelamiento de PBMC	17
8.8.- Péptidos sintéticos	17
8.9.- Screening de regiones inmunodominantes mediante ELISPOT para IFN- γ	18
8.10.- Criterio de significancia para ensayos de ELISPOT	19
8.11.- Diseño experimental	21
8.12.- Establecimiento de línea celular linfocito B (B-LCL)	22
8.12.1.- Preparación de sobrenadantes con EBV	22
8.12.2.- Inmortalización de linfocitos B por infección con EBV	22
8.13.- Establecimiento de líneas de linfocitos T específicos para péptidos	22
8.14.- Ensayos de restricción a HLA para péptidos individuales truncados	23
8.15.- Análisis estadístico	24
9.- Resultados	25
9.1.- Pacientes convalecientes mantienen respuesta inmune celular y la proteína G1 de ANDV es altamente inmunogénica	25
9.2.- Longevidad de la respuesta inmune de linfocitos T específicos contra G1	29
9.3.- Epítomos en la proteína N	32
9.4.- Inmunodominancia de G ₁₄₆₁₋₄₇₅ en el extremo carboxilo terminal de la proteína G1	33
9.5.- Restricción a HLA-B*35 de G ₁₄₆₁₋₄₇₅	35
9.6.- Epítomo mínimo de G ₁₄₆₁₋₄₇₅	37
10.- Discusión	40
11.- Conclusiones	51
12.- Bibliografía	52

1. Índice de tablas

Tabla 1: Distribución geográfica de cepas de hantavirus patogénicos, enfermedad causada, y vectores que transmiten la enfermedad al hombre	2
--	---

2. Índice de figuras

Figura 1: Diagrama esquemático de la estructura del hantavirus	3
Figura 2: Ejemplo de péptidos traslapados de proteína N	18
Figura 3: Diagrama resumen del diseño experimental	21
Figura 4: Porcentaje de pacientes con o sin respuesta a antígenos de ANDV según resultados de ELISPOT para IFN- γ	25
Figura 5: Respuesta inmune celular contra proteínas de ANDV en los 47 pacientes con respuesta significativa contra por lo menos un antígeno viral en ensayo de ELISPOT para IFN- γ	26
Figura 6: Respuesta inmune celular contra regiones aminoacídicas de la proteína N	27
Figura 7: Respuesta inmune celular contra las regiones aminoacídicas del precursor de las proteínas G1 y G2	28
Figura 8: Longevidad de la respuesta inmune v/s años post hospitalización para las proteínas de ANDV	29
Figura 9: Contribución relativa de la respuesta inmune celular específica contra las proteínas N, G1, y G2 a la respuesta inmune celular con respecto al tiempo post hospitalización de los pacientes	30
Figura 10: Epítomos de linfocitos T en diferentes regiones de la proteína N	32
Figura 11: Epítomos de linfocitos T en la proteína G1	33
Figura 12: Restricción a HLA clase I del epítomo G1 ₄₆₁₋₄₇₅	36
Figura 13: Determinación del epítomo mínimo en G1 ₄₆₁₋₄₇₅	37
Figura 14: Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas del precursor de las glicoproteínas G1/G2 de distintas cepas de hantavirus causantes de SCPH y FHSR	39

3. Lista de abreviaturas

aa: Aminoácido (Aminoacid)

ANDV: Hantavirus Andes (Andes Virus)

APC: Célula presentadora de antígeno (Antigen Presenting Cell)

BAYV: Hantavirus Bayou (Bayou Virus)

BCG: Bacillus Calmette-Guérin (Bacille Calmette-Guérin)

BLASTp: Herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales de proteína (Protein Basic Local Alignment Search Tool)

BSA: Seroalbúmina de bovino (Bovine Serum Albumin)

B-LCL: Línea celular linfoide B (B Lymphoid Cell Line)

CFU: Unidad formadora de colonia (Colony Forming Unit)

CMV: Virus citomégalo (Cytomegalovirus)

cRNA: Ácido ribonucleíco complementario (Complementary Ribonucleic Acid)

DMSO: Dimetil sulfóxido (Dimethyl Sulfoxide)

DOBV: Hantavirus Dobrava (Dobrava Virus)

DNA: Ácido desoxirribonucleíco (Deoxyribonucleic Acid)

EBV: Virus Epstein Barr (Epstein Barr Virus)

ELISPOT: Spot "inmuno-absorbente" ligado a enzima (Enzyme Linked Immunosorbent Spot)

FHSR: Fiebre hemorrágica con síndrome renal (Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome)

HCV: Virus de hepatitis C (Hepatitis C Virus)

HIV: Virus de inmunodeficiencia humana (Human Immunodeficiency Virus)

HLA: Antígeno leucocitario humano (Human Leukocyte Antigen)

HTNV: Hantavirus Hantaan (Hantaan Virus)

IFN: Interferón (Interferon)

IgG: Inmunoglobulina G (Immunoglobulin G)

IL: Interleukina (Interleukin)

LNV: Hantavirus Laguna Negra (Laguna Negra Virus)

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero (Messenger Ribonucleic Acid)

NYV: Hantavirus New York (New York Virus)

PBMC: Células sanguíneas mononucleadas periféricas (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)

PHA: Fitohemaglutinina (Phytohaemagglutinin)

PHV: Hantavirus Prospect Hill (Prospect Hill Virus)

PUUV: Hantavirus (Puumala Puumala Virus)

RNA: Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)

SCPH: Síndrome cardiopulmonar por hantavirus (Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome)

SEOV: Hantavirus Seúl (Seoul Virus)

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Acquired Immunodeficiency Syndrome)

SNV: Hantavirus Sin Nombre (Sin Nombre Virus)

SFB: Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)

SFU: Unidad formadora de spot (Spot Forming Unit)

ssRNA: Ácido ribonucleico de hebra simple (Single Stranded Ribonucleic Acid)

TNF: Factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor)

vRNA: Ácido ribonucleico viral (Viral Ribonucleic Acid)

4. Resumen

El síndrome cardiopulmonar por hantavirus (SCPH) causado por la infección por hantavirus Andes (ANDV), es una enfermedad infecciosa endémica en Chile y Argentina. Existe evidencia que linfocitos T específicos contra hantavirus participan en la protección inmune independiente del título de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo a la fecha no se han descrito en la literatura estudios que describan en humanos la respuesta inmune celular contra ANDV. El objetivo de la presente tesis fue detectar y cuantificar linfocitos T específicos contra ANDV y determinar el o los epítomos inmunodominantes por medio de estimulación de PBMC de 75 pacientes convalecientes de la infección con ANDV (entre 4 y 159 meses después de la infección). En ensayos de ELISPOT para IFN- γ se estimularon PBMC con 310 péptidos de 15 aminoácidos trasladados que representan las secuencias completas de las proteínas de la Nucleocápside (N) y del precursor de las Glicoproteínas (G1 y G2) de ANDV. Luego para determinar las regiones y epítomos inmunodominantes las PBMC de los pacientes se estimularon con péptidos individuales en ensayos de ELISPOT.

En 47 de los 75 pacientes estudiados (63%) se detectaron linfocitos T de memoria secretores de IFN- γ específicos contra ANDV. Dentro de este grupo el extremo carboxilo terminal de la proteína G1 fue la región más inmunodominante ya que 22 (47%) de los pacientes exhibieron una respuesta positiva con un promedio de 622 linfocitos T/ 10^6 PBMC. Se pudo demostrar que dentro de la región carboxiterminal que el epítomo G1₄₆₆₋₄₇₂ fue reconocido solamente por pacientes que expresaban el alelo HLA-B*35. Cabe hacer notar que solo la respuesta inmune de linfocitos T contra G1 pero no contra N ni contra G2 fueron detectados hasta más de 13 años después de la infección aguda con ANDV. Además se identificaron epítomos en la proteína N, así como epítomos

adicionales en G1. La presente tesis corresponde al primer trabajo en que se muestra en pacientes la respuesta inmune celular contra la infección con ANDV. En contraposición con lo que se ha descrito para otros hantavirus, la proteína G1 constituye un antígeno altamente inmunogénico. Por lo tanto G1 podría ser un excelente candidato para una vacuna que induzca inmunidad celular a largo plazo contra la infección con ANDV. No obstante, dado que el alelo HLA-B*35 se expresa en un 25% de la población residente en la región endémica, se requieren estudios adicionales para determinar la restricción a HLA de otros epítomos en G1. Adicionalmente, nuestros datos forman la base para realizar estudios futuros con tetrámeros de MHC clase I para estudiar la función y el fenotipo de los linfocitos T específicos contra ANDV durante la fase aguda de la infección. Esto ayudaría a comprender mejor la patogénesis de la infección permitiendo así el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento.

5. Abstract

Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome (HCPS) due to Andes hantavirus (ANDV) is an emerging infectious disease endemic to Chile and Argentina. There is evidence that hantavirus-specific T-cells can mediate protective immunity independently of neutralizing antibodies. However, up to date, there are no data available on the human T cell response to ANDV infection, the immunodominant regions and epitopes of ANDV-specific T cells. The objective of this thesis was to detect and enumerate ANDV-specific T-cells and to determine the immunodominant epitope(s) by stimulation of PBMC from 75 convalescent ANDV patients (4-159 months post hospitalization). Therefore, PBMC were stimulated in *in vitro* IFN- γ ELISPOT assays using a panel of 310 overlapping 15mer peptides which span the entire (N)ucleocapsid- and (G)lyco-(G1 and G2) protein of ANDV. Subsequently, determination of immunodominant regions and epitope mapping was performed by stimulation of cryopreserved PBMC with individual peptides in ELISPOT assays.

Among all patients, 47 (63%) showed circulating, ANDV-specific memory T-cells. Among these patients, the carboxy-terminus of G1 was by far the most immunodominant region with 22 (47%) patients scoring positive with a mean response of 622 T lymphocytes/ 10^6 PBMC. Through this thesis we were able to demonstrate that the epitope G1₄₆₆₋₄₇₂ contained within the carboxyterminal region of G1 protein, was recognized exclusively by HLA-B*35⁺ patients. Interestingly, the G1-, but not N- or G2-, specific T-cell responses were maintained over time, for up to 13 years after acute infection with ANDV. Additional G1-specific as well as N-specific T-cell epitopes were identified. This thesis constitutes the first report on human cellular immune responses towards the emerging infection with ANDV. In contrast to what is described for other hantaviruses, the G1-protein represents a highly immunogenic antigen. Thus, G1 might be an excellent candidate for a vaccine

inducing long-term cellular immunity towards ANDV. And yet, given that 25% of the population living in the endemic region of ANDV express the HLA-B*3501 allele, additional studies are necessary to determine the HLA-restriction of further G1-epitopes. Additionally, our data will allow the synthesis of MHC class I tetramers in order to determine the function and phenotype of ANDV specific T cells during the acute phase of infection. This would broaden our understanding of the pathogenesis of ANDV infection and thereby allow the development of new treatment strategies.

6 Introducción

6.1 Epidemiología

Los hantavirus son virus de ssRNA de hebra negativa pertenecientes a la familia *Bunyaviridae*. El reservorio y vector natural de los hantavirus, son los roedores de la familia *Muridae* (Maes y col, 2004). Mientras que la infección por hantavirus en animales es crónica y asintomática, en el hombre se puede producir Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR) o Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus (SCPH) dependiendo de la cepa responsable de la infección. En Chile, el SCPH es endémico desde el año 1996, siendo hantavirus Andes (ANDV) la cepa responsable y el ratón colilargo, *Oligoryzomys longicaudatus* el vector principal de esta zoonosis.

La vía principal de transmisión de los hantavirus desde el vector al hombre es mediante la inhalación de aerosoles de heces, orina, o saliva del roedor infectado. Existen también casos reportados de transmisión por contacto directo con el vector y por mordeduras (St. Jeor, 2004). Además, hay que destacar que ANDV es la única cepa de hantavirus para la cual se ha documentado la transmisión persona-persona (Padula y col, 1998; Ferrés y col, 2007).

Se estima que mundialmente más de 200000 infecciones anuales en humanos son causadas por las cepas del género hantavirus, la mayoría (aprox. 150000) de ellas causando FHSR (Maes y col, 2004). Gran parte de los casos de FHSR ocurren en China (HTNV; virus Hantaan), pero los hantavirus responsables se encuentran ampliamente distribuidos por Europa (DOBV; virus Dobrava), Escandinavia (PUUV; virus Puumala), Corea (SEOV; virus Seoul) y Rusia (HTNV y SEOV) (Clement y col, 1998).

En América los hantavirus Choclo, Oran, Lechiguanas, Sin Nombre (SNV), New York (NYV), Bayou (BAYV), Laguna Negra (LNV), y Andes son capaces de inducir el SCPH

(ver tabla 1) y su incidencia es variada entre los distintos países de América. En Chile y Argentina existen 923 casos documentados de SCPH por ANDV entre 1993 y 2004 (Organización panamericana de la salud, 2004). En particular en Chile se han documentado 540 casos entre 1996 y diciembre del 2007, con una letalidad promedio del 37% (Ministerio de Salud: Gobierno de Chile, 2007). Otros países se encontraron afectados con casos de SCPH, como Brasil y Paraguay, con 321 y 99 casos respectivamente, mientras que en Bolivia el número de casos registrados fue de 36 en el mismo período (Organización panamericana de la salud, 2004). El centro de control y prevención de enfermedades de EE.UU. (CDC) ha confirmado 438 casos de SCPH causado por SNV entre 1993 y junio del 2006 en Estados Unidos, con una letalidad del 35% (Center for disease control and prevention, 2006).

Tabla 1: Distribución geográfica de cepas de hantavirus patogénicos, enfermedad causada, y vectores que transmiten la enfermedad al hombre (Modificado de Zeier y col, 2005)

Área geográfica	Virus	Enfermedad	Vector	
Asia	Seoul(SEOV)	FHSR	<i>Rattus norvegicus</i>	
	Hantaan (HNTV)	FHSR	<i>Apodemus agrarius</i>	
Europa	Dobrava (DOBV)	FHSR	<i>Apodemus flavicollis</i>	
	Puumala (PUUV)	FHSR	<i>Clethrionomys glareolus</i>	
América	-Norte	Sin nombre (SNV)	SCPH	<i>Peromyscus maniculatus</i>
		Bayou (BAYV)	SCPH	<i>Oryzomys palustris</i>
		Choclo	SCPH	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>
	-Sur	New York (NYV)	SCPH	<i>Peromyscus leucopus</i>
		Lechiguanas	SCPH	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
		Andes (ANDV)	SCPH	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>
		Oran	SCPH	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>
		Laguna Negra (LNV)	SCPH	<i>Calomys laucha</i>

FHSR: Fiebre hemorrágica con síndrome renal

SCPH: Síndrome cardiopulmonar por hantavirus

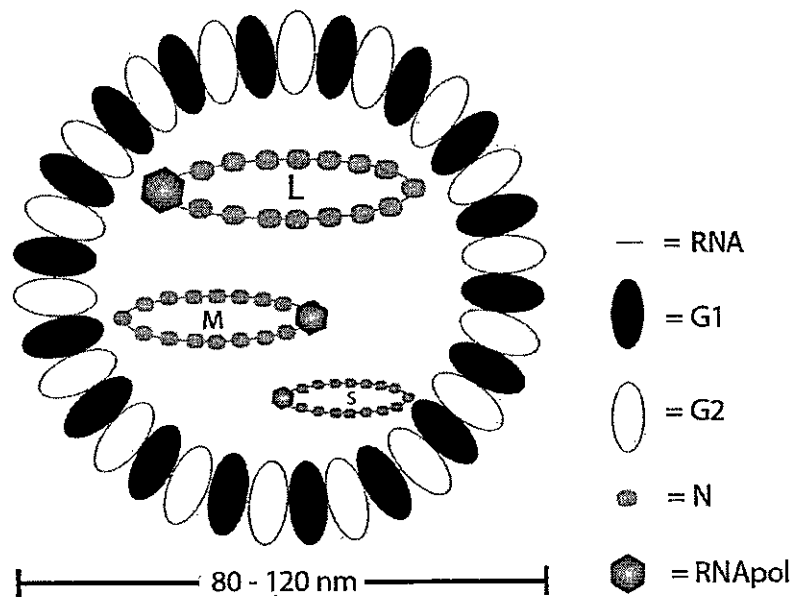


Figura 1: Diagrama esquemático de la estructura del hantavirus (modificado de Muranyi y col, 2005).

6.2 Virología

Los hantavirus poseen envoltura y su genoma se divide en tres segmentos de ssRNA de hebra negativa de distinto tamaño (ver fig. 1). El segmento S corresponde al segmento de menor tamaño y codifica para la proteína N (430 aa) de la nucleocápside (Plyusnin y col, 1996). La función principal de la nucleocápside es proteger al vRNA de las nucleasas del huésped, sin embargo se ha reportado que la proteína N en conjunto con la RNA polimerasa es crucial para el proceso de replicación en el género hantavirus (Schmaljohn y Nichol, 2006). El segmento M es de tamaño intermedio y codifica para el precursor de 2 glicoproteínas de la envoltura, G1 y G2, también conocidas como Gn y Gc respectivamente, (1140 aa en total). El precursor de las glicoproteínas es procesado por un complejo de peptidasas que reconocen un péptido señal en la región comprendida entre los aa 616 y 648. El sitio de corte específico se encuentra directamente río abajo de secuencia señal WAASA (aa 644-648) (Löber y col, 2001). Posteriormente las glicoproteínas G1 y G2 forman un heterodímero en el retículo endoplasmático que es glicosilado, para luego ser transportado al aparato de

Golgi (Ruusala y col, 1992) y a continuación ser exportado hacia la membrana plasmática de la célula infectada. El de mayor tamaño, el segmento L, codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (2153 aa). Esta proteína es la encargada de la transcripción de vRNA a mRNA (transcripción primaria) y de la replicación del vRNA genómico (transcripción secundaria) utilizando la hebra complementaria positiva (cRNA) como templado (Kukkonen y col, 2005).

6.3 Patogénesis

Los hantavirus infectan principalmente células endoteliales (Zaki y col, 1995), dendríticas (Raftery y col, 2002) y macrófagos (Asada y col, 1989). Reportes recientes de experimentos realizados en roedores infectados con ANDV han descrito la presencia de cuerpos de inclusión viral en el hígado y el bazo, acompañados por infiltrados de células mononucleadas y apoptosis de linfocitos (Wahl-Jensen y col, 2007).

A pesar de las diferencias en el órgano principalmente afectado por FHSR (riñón) o SCPH (pulmón), ambos síndromes se asocian a una permeabilidad elevada de la vasculatura endotelial ("vascular leak syndrome") seguido por una disfunción del órgano afectado (Zaki y col, 1995). Así, el SCPH rápidamente desencadena en edema pulmonar, lo que a su vez lleva a hipoxemia, shock cardiogénico y en algunos casos la muerte (Peters y col, 1999). Hasta la fecha existen diversas hipótesis sobre los mecanismos que contribuyen a la patogenicidad por infección con hantavirus. Se discuten tanto efectos directos sobre las células infectadas como efectos indirectos producto de la respuesta inmune. En este contexto es importante destacar, que a diferencia de otros miembros de la familia *Bunyaviridae*, como Nairovirus (Burt y col,

1997), Phlebovirus (Crance y col, 1997) y Orthobunyavirus (Pekosz y col, 1996), los hantavirus no tienen un efecto citopático directo sobre las células infectadas.

6.3.1 Efectos directos

Estudios sobre la interacción entre receptores celulares y los hantavirus, sugieren que hay elementos conservados en la secuencia aminoacídica de las glicoproteínas de hantavirus, que median la unión entre el virus y las integrinas (Mackow y Gavrilovskaya, 2001). Las integrinas β_3 , abundantes en la superficie de las células del endotelio, se unen a receptores que regulan la permeabilidad vascular (Borges y col, 2000). Adicionalmente estudios moleculares evidencian que la entrada del virus mediada por la interacción entre las glicoproteínas de hantavirus e integrina $\alpha_V\beta_3$ se asocia a la infección por los hantavirus patogénicos New York (NYV) y SNV pero no de su contraparte no-patogénica, el hantavirus Prospect Hill (PHV) (Gavrilovskaya y col, 1998). El grupo de Mackow y col ha descrito con detalle la interacción entre las integrinas $\alpha_V\beta_3$ en conformación plegada y distintos hantavirus (Raymond y col, 2005). En este contexto hay que mencionar que la unión de un ligando a $\alpha_V\beta_3$ lleva a la fosforilación de la fosfolipasa C- γ_1 , aumento de inositol trifosfato y aumento de Ca^{+2} intracelular (Bhattacharya y col, 2000). Se ha mostrado en células endoteliales pulmonares que estos procesos resultan en el deterioro de la barrera endotelial (Lum y col, 1992), la secreción de citoquinas (Conboy y col, 1999) y la adhesión de leucocitos (Allen y col, 1998).

Estos hallazgos en conjunto con descubrimientos que la unión de ligandos de alta afinidad como vitronectina y que anticuerpos contra integrinas β_3 , inhiben la infección por NYV y SNV (Gavrilovskaya y col, 1998) sugieren una relación entre la disfunción en

la permeabilidad del tejido vascular observado en el SCPH y la interacción entre el hantavirus y las integrinas β_3 . No obstante McElroy y col. recientemente realizaron estudios con virus quimera de SNV y ANDV, compuesto por G1 y G2 de ANDV y N de SNV. Con esto determinaron que las glicoproteínas de ANDV, no son suficientes para producir el efecto letal observado en hámster Sirio (McElroy y col, 2004). Por lo tanto, la interacción entre glicoproteínas virales y receptores en las células blancas no parecen ser fundamentales para la inducción del SCPH.

Otra arista de la patogenicidad en la infección por hantavirus es la disrupción de la respuesta inmune innata mediada por interferones de tipo I. Estas proteínas participan en la respuesta inmune innata contra las infecciones virales y están compuestas de dos subgrupos, IFN- α , que comprende a varias proteínas, e IFN- β . Principalmente los interferones tipo I tienen como función inhibir la replicación viral por medio de la inducción de enzimas como la 2',5'oligoadenilato sintetasa que interfiere con la transcripción de los ácidos nucleicos virales (Abbas y Lichtman, 2003). A su vez los interferones de este tipo incrementan la expresión de moléculas de MHC clase I (Abbas y Lichtman, 2003). Un ejemplo claro de la interrupción de la respuesta mediada por IFN- β , se aprecia en los trabajos de Alff y col (Alff y col, 2006) y Spiropoulou y col (Spiropoulou y col 2007). En ambos trabajos se observa que el hantavirus no patogénico (PHV) induce la expresión de IFN- β mientras que este efecto no se observa en los hantavirus patogénicos (ANDV, NYV y HTNV). La diferencia en la inducción de IFN- β se centra en la interferencia de las glicoproteínas virales con IRF-3, TBK-1 y/o RIG-I, lo que impide la translocación de factores nucleares (ej. STAT1/STAT2) y la activación de promotores de la transcripción del gen de IFN- β . Por lo tanto los hantavirus patogénicos son capaces de evadir la respuesta inmune innata basada en

interferones tipo I, así como la respuesta inmune celular adquirida mediante la disminución de la expresión de moléculas de MHC clase I.

6.3.2 Efectos indirectos

Cabe destacar que el segmento de la proteína G1 previamente mencionado, tanto en ANDV, HTNV, y en NYV, ha sido caracterizado con mayor detalle y se han encontrado secuencias ("degrons") que dirigen el segmento a la degradación proteosómica. Al comparar los resultados obtenidos con segmentos de G1 de ANDV, HTNV, y de NYV contra los de PHV, se observó que sólo los segmentos de los hantavirus patogénicos eran degradados (Sen y col, 2007). Dado que la degradación proteosómica de una proteína lleva a la presentación de epítomos peptídicos a linfocitos T CD8⁺ mediante moléculas de MHC clase I (Abbas y Lichtman, 2003), estos datos apoyan la hipótesis de una inmunopatogénesis del SCPH.

Esta hipótesis es también apoyada por datos obtenidos tanto de pacientes con FHSR, como de pacientes con SCPH producto de la infección con SNV, exhibiendo infiltrados linfocitarios en los órganos afectados. En pacientes fallecidos por infección con SNV se han encontrado números elevados de linfocitos T CD8⁺ proinflamatorios (secretores de TNF- α , IL-2, e IFN- γ) en infiltrados intersticiales del tejido pulmonar comparados con pacientes víctimas de síndrome pulmonar no relacionado con hantavirus (Mori y col, 1999). Adicionalmente en un reporte con pacientes con infección aguda con SNV, se documentaron frecuencias de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos sanguíneos específicos contra el virus significativamente superiores en pacientes con SCPH grave (con ventilación mecánica), que en pacientes con SCPH leve (sin ventilación mecánica) (Kilpatrick y col, 2004). Además, datos *in vitro* con linfocitos T citotóxicos y una línea

celular de células endoteliales infectadas con SNV, revelan que hay un aumento en la permeabilidad de monocapas de estas células endoteliales producto de la acción citotóxica de los linfocitos T específicos contra SNV (Hayasaka y col, 2006).

Aunque estos antecedentes indican una asociación, entre linfocitos T proinflamatorios/citotóxicos y la patogénesis, a la fecha fue imposible comprobar una causalidad entre estos dos factores en el modelo animal para SCPH, el hamster sirio (*Mesocricetus auratus*) infectado por ANDV (Hooper y col, 2001). Esto es debido a la ausencia de los reactivos para hamster que permitirían estudios inmunológicos, como por ejemplo la depleción de linfocitos T previo a la infección por ANDV.

6.4 Inmunidad

La respuesta inmune adaptativa esta compuesta por la respuesta inmune humoral y por la respuesta inmune celular. En la investigación en hantavirus, generalmente ha existido un interés sesgado hacia la importancia de la inmunidad humoral. Específicamente los estudios se han enfocado en el rol de los anticuerpos neutralizantes contra las glicoproteínas G1/G2 que a diferencia de los anticuerpos contra la proteína N, son capaces de prevenir la infección viral de las células blanco (Arikawa y col, 1989; Schmaljohn y col, 1990; Schmaljohn y col, 1992; Chu y col, 1995).

6.4.1 Inmunidad humoral

En lo que respecta a modelos *in vivo* de SCPH la mayoría de estos han sido realizados en el hámster sirio infectado por ANDV. En este modelo roedor se ha descrito que la transferencia pasiva de anticuerpos generados en macacos o conejos inmunizados con una vacuna de DNA del segmento M de ANDV, administrada hasta el cuarto día después del desafío con el virus, protegió al 100% de los hámsters de la muerte por

SCPH. No obstante, no se indujo inmunidad activa con la misma vacuna en hámsters (Custer y col, 2003; Hooper y col, 2008). En línea con la evidencia en roedores, pacientes con SCPH leve por SNV presentan títulos de anticuerpos neutralizantes más altos que pacientes con SCPH grave en el momento de la admisión hospitalaria (Bharadwaj y col, 2000).

En conjunto estos antecedentes plantean la posibilidad de utilizar anticuerpos neutralizantes (por ejemplo mediante el plasma de pacientes convalecientes) como una potencial herramienta terapéutica mediante la transferencia pasiva de ellos. A pesar del gran potencial protector de los anticuerpos neutralizantes, hasta la fecha los estudios clínicos han mostrado que vacunas basadas en HTNV inactivados o en vectores de virus vaccinia no son capaces de inducir títulos altos y duraderos de anticuerpos neutralizantes en gran parte de los individuos vacunados (McClain y col, 2000; Cho y col, 2002)

6.4.2 Inmunidad celular

Ahora bien, al tomar en consideración los resultados de la investigación de la respuesta inmune celular contra hantavirus, en humanos la participación de los linfocitos T en la protección frente a hantavirus ha sido poco estudiada. En contraparte existe evidencia en modelos murinos que los linfocitos T son responsables de la erradicación de antígeno del tejido blanco y de la inmunidad a largo plazo contra la infección (Nakamura y col 1985). A su vez se previno la infección persistente en ratones atímicos mediante la transferencia adoptiva de células del bazo de ratones Balb/c previamente inoculados con HTNV (Asada y col, 1987). En modelos murinos *in vivo* se mostró que la vacunación con proteína N recombinante confiere protección cruzada a la infección con distintos hantavirus y esta protección es producto de la

respuesta inmune celular y no de la acción de anticuerpos (de Carvalho y col, 2002). Por su parte, en la infección natural en roedores, se observaron altos niveles de antígeno, altos títulos de anticuerpos neutralizantes, y bajos niveles de linfocitos T CD8⁺ durante la fase aguda y en la fase de persistencia del antígeno (Araki y col, 2003). A pesar de esto, el aumento de linfocitos T específicos productores de IFN- γ y TNF- α fue asociado a la desaparición de antígeno viral de los tejidos. La producción de TNF- α se observó en más de la mitad de los linfocitos productores de IFN- γ en esta fase, lo que concuerda con el perfil de citoquinas pro inflamatorias secretadas por linfocitos T antivirales. Finalmente, en murinos vacunados con DNA de la proteína N de HTNV, Woo y col. detectaron la presencia de linfocitos T CD8⁺ de memoria específicos contra la proteína N. Se demostró la proliferación y activación de aquellos linfocitos T y una protección parcial posterior al desafío con virus HTNV (Woo y col, 2005). En conjunto estos datos sugieren que los linfocitos T tienen la capacidad de restringir, controlar y eliminar la infección por hantavirus en roedores y entregar inmunidad al huésped.

Las primeras evidencias concretas de la respuesta inmune mediada por linfocitos T específica contra HTNV en humanos fueron dadas a conocer por las investigaciones realizadas por Van Epps y col (Van Epps y col, 1999). En este reporte además se identificaron epítomos para linfocitos T en la proteína N a través de experimentos con líneas celulares de linfocitos T citotóxicos específicos contra estas proteínas. Es importante mencionar que los pacientes en este estudio habían contraído la infección entre 10 y 15 años antes de la investigación. Siguiendo la misma línea de investigación, en pacientes convalecientes de la infección por PUUV se encontraron linfocitos T

específicos para PUUV *ex vivo* hasta 15 años después de la infección, en ausencia de RNA viral, y con una frecuencia máxima de 300 SFU (spot forming units: unidades formadoras de spots)/ 10^6 PBMC (Van Epps y col, 2002). De manera similar sería esperable que en la infección con ANDV también se mantengan altas las frecuencias de linfocitos T específicos circulantes durante la fase convaleciente. Esto sugeriría la participación de los linfocitos T de memoria en la inmunidad contra la infección. Desgraciadamente el trabajo de Van Epps (Van Epps y col, 2002) y el de Tuuminen (Tuuminen y col, 2007) son los únicos estudios realizados que describen frecuencias *ex vivo* de linfocitos T de memoria específicos para epítomos individuales en una población de pacientes. No obstante, la población estudiada no fue exhaustiva respecto a los haplotipos de HLA (estudios restringidos a HLA-A*02, HLA-A*28, HLA-B*07, y HLA-B*08). En estos estudios las frecuencias de linfocitos T encontradas alcanzaron como máximo las 2800 SFU / 10^6 PBMC seis semanas después de la fase aguda en el estudio de Tuuminen y col. La información en pacientes infectados con hantavirus causantes de SCPH es limitada y no existe ningún estudio comparable en sobrevivientes de la infección con ANDV. Para SNV se identificaron epítomos de linfocitos T CD8⁺ en la proteína N y G2 restringidos a HLA-B*35 (Kilpatrick y col, 2004) y un epítomo de linfocitos T CD4⁺ restringido a DR17 o DQw2, (Ennis y col, 1997). El pequeño tamaño muestral de los estudios de Ennis (n=2), Van Epps (n=13), Kilpatrick (n=11) y de Tuuminen (n=16), el hecho que la respuesta inmune celular por linfocitos T CD8⁺ haya estado restringida como máximo a 4 alelos de HLA y usando sólo cuatro epítomos de la proteína N (Van Epps y col, 2002), sugiere que existe una subestimación en la magnitud de la respuesta inmune celular específica contra PUUV y SNV. Cabe destacar que aún menos información está disponible respecto a las funciones efectoras, la longevidad y el fenotipo de los linfocitos T específicos. Sin

embargo con el objetivo de desarrollar una vacuna es de suma importancia conocer los epítomos y el fenotipo de los linfocitos T involucrados en este tipo de respuesta inmune.

6.4.3 Consideraciones para el desarrollo de una vacuna

A pesar del importante rol de los anticuerpos neutralizantes en conferir protección contra la infección por hantavirus, a la fecha se desconoce el blanco viral de estos anticuerpos y hasta el momento ha sido difícil inducir anticuerpos neutralizantes de larga duración en humanos (ver arriba). Además otra restricción de los anticuerpos neutralizantes anti-ANDV es la ausencia de una reacción cruzada con SNV y viceversa (Valdivieso y col, 2006), impidiendo el uso exclusivo de anticuerpos para distintos hantavirus causantes de SCPH. Por otra parte, la capacidad de conferir protección cruzada de los linfocitos T entre cepas de virus filogenéticamente distintas como ANDV y HTNV (de Carvalho y col, 2002), y la posibilidad de conferir protección a largo plazo, respaldan la importancia de los linfocitos T como candidatos para el desarrollo de una vacuna contra esta infección viral. Generalmente el uso de la inducción de linfocitos T con fines terapéuticos depende del conocimiento previo de epítomos inmunodominantes del patógeno a combatir, es decir de epítomos que se encuentran reconocidos en frecuencias más altas dentro de la población general (Frahm y col., 2006). Desgraciadamente no existe un consenso en la literatura respecto a los factores que determinan la inmunodominancia, pero la discusión se centra entre los epítomos capaces de inducir una respuesta de alta magnitud (Yewdell, 2005).

Existen varios casos de desarrollo de vacunas basadas en la inducción de linfocitos T y su valor terapéutico en otras infecciones virales como infección con CMV (cytomegalovirus; virus citomégalo) (La Rosa y col, 2001), EBV (Epstein Barr virus; virus Epstein Barr) (Kuzushima y col, 1996), HCV (virus de hepatitis C) (Fournillier y col,

2007), e infección con virus respiratorio sincicial (Chen y col, 2002) demuestran la validez de este concepto. Así, la identificación de los epítomos inmunodominantes de ANDV, contribuiría al desarrollo de una vacuna para la prevención y posiblemente el tratamiento de la infección con ANDV y otros hantavirus relacionados.

7. Hipótesis y objetivos

7.1 Hipótesis:

"Las personas que sobreviven a la infección por ANDV desarrollan una respuesta inmune celular de larga durabilidad basada de linfocitos T específicos de memoria para epítomos inmunodominantes de proteínas virales."

7.2 Objetivo General:

Demostrar que en pacientes convalecientes de la infección por ANDV permanecen linfocitos T de memoria y determinar las regiones y epítomos inmunodominantes de las proteínas de hantavirus Andes (N, G1 y G2) capaces de gatillar una reactivación de aquellos linfocitos T.

7.2.1 Objetivos Específicos:

- En pacientes que sobrevivieron la infección, detectar, cuantificar la frecuencia, y la durabilidad de linfocitos T de memoria específicos para ANDV en base a la secreción de IFN- γ frente a péptidos traslapados que representan las proteínas N, G1, y G2 de ANDV.
- Determinar el o los epítomo(s) inmunodominantes de los linfocitos T reconocidos con mayor frecuencia entre los pacientes estudiados, identificar la o las

secuencias aminoacídicas y el tipo de HLA responsable de la presentación de aquellos epítomos.

8. Pacientes, materiales y métodos

8.1 Pacientes

Todos los pacientes fueron reclutados en Chile y con por lo menos 3 meses sin síntomas de la infección. Se reclutaron 75 individuos en que se documenta infección por hantavirus mediante serología (positivos para IgG anti-N), y 20 individuos sin infección por hantavirus documentada (negativos para IgG anti-N).

8.2 Consideraciones bioéticas

El protocolo de la extracción de sangre periférica y el protocolo experimental fueron revisados y aprobados por el Servicio de Salud Araucanía (Temuco, 26 de agosto 2004) y el comité de bioética de la Clínica Alemana Universidad del Desarrollo (Santiago, 19 de Julio 2004).

8.3 Medios de cultivo celular

Para todos los ensayos que involucraron cultivo celular se utilizó medio PBMC (peripheral blood mononuclear cells; células sanguíneas mononucleadas periféricas, compuesto por RPMI 1640 (Gibco, USA), SFB descomplementado (Gibco, USA) 10% V/V, gentamicina (Laboratorios Sanderson, Chile) 80 µg/mL y L-glutamina (Gibco, Japón) 2 mM.

Para la criopreservación de las PBMC se utilizó medio CP compuesto por SFB 70% V/V, DMSO (Dimetil sulfóxido; Dimethyl Sulfoxide) (Sigma-Aldrich, Alemania) 20% V/V y RPMI 1640 10% V/V.

8.4 Obtención de células sanguíneas mononucleadas periféricas (PBMC)

A partir de muestras de sangre venosa periférica recolectadas en tubos heparinizados de 10 mL (BD vacutainer, Becton Dickinson, USA), se prepararon diluciones 1:1 con PBS (phosphate buffer saline solution; tampón fosfato salino). A continuación se agregaron cuidadosamente 35 mL de sangre diluida sobre 15 mL de Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Suecia) para formar un gradiente, el cual fue centrifugado por 22 min a 400xg a 22°C sin frenos. Posteriormente las PBMC presentes en la interfase fueron aisladas, lavadas con PBS estéril y centrifugadas dos veces por 10 min a 400xg a 4°C.

8.5 Cuantificación de PBMC

El precipitado obtenido de los lavados fue resuspendido en 5 mL a 10 mL de medio PBMC y de este se transfirieron 10 µl y se adicionaron 90 µl de una dilución 1:10, de una solución de azul tripan (Gibco, USA). Luego se determinó el número de PBMC viables mediante conteo en una cámara de Neubauer. Se contaron 4 cuadrantes y se determinó el número y la concentración de las células vivas por medio de la siguiente fórmula.

$$\text{Número de células viables} / \text{mL} = \frac{\text{Número de células viables}}{4} \times 10 \times 10^4$$

8.6 Criopreservación de PBMC

Las PBMC restantes de la separación por gradiente de Ficoll fueron criopreservadas para su utilización en experimentos futuros. Para esto fueron resuspendidas en medio CP a una concentración de 2×10^7 PBMC/mL y almacenadas en criotubos de 2 mL (Nunc, Dinamarca) para luego ser congeladas dentro de una cámara con isopropanol

(Merck, Chile) a -80°C . Posteriormente las células fueron transferidas a estanques de nitrógeno líquido a -196°C .

8.7 Decongelamiento de PBMC

Una vez retiradas las células del estanque de nitrógeno líquido, éstas fueron sumergidas en un baño termostático a 37°C hasta estar parcialmente descongeladas. Luego se le agregó PBS estéril lentamente hasta completar 15 mL. Después de esto se centrifugó por 10 min a $400\times g$ a 4°C . Finalmente se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en medio PBMC para contar las PBMC.

8.8 Péptidos sintéticos

Para el "screening" de regiones inmunodominantes fueron sintetizados 310 péptidos comerciales (Mimotopes, Australia) de 15 aa con 10 aa traslapados (de secuencia correlativa) que representan la proteína N (número de acceso GenBank NC 003466) y las glicoproteínas G1 y G2 (número de acceso GenBank NC 003467) de la cepa de Hantavirus Andes R123 (Meissner y col, 2002) (ver fig. 2). Los péptidos stock fueron preparados en DMSO 5% V/V a una concentración de 1,3 mg/mL para los péptidos correspondientes a la proteína N y a 1,2 mg/mL para los péptidos correspondientes a las glicoproteínas G1 y G2. Todos los péptidos stock fueron almacenados a 4°C . Se realizaron ensayos de ELISPOT con los 310 péptidos, organizados en 13 mezclas compuestas por 12 a 44 péptidos individuales (de secuencia correlativa) cada una. En cada una de las mezclas se prepararon concentraciones de $20\ \mu\text{g/mL}$ por péptido. En los ensayos de ELISPOT se usó una concentración final de $1\ \mu\text{g/mL}$ (mezclas de péptidos) o $10\ \mu\text{g/mL}$ (péptidos individuales).

Péptido 1: MSTLQELQENITAHE
 Péptido 2: ELQENITAHEQQLVT
 Péptido 3: ITAHEQQLVTARQKL
 Péptido 4: QQLVTARQKLKDAEK
 Péptido 5: ARQKLKDAEKAVEVD
 Péptido 6: KDAEKAVEVDPDDVN
 Péptido ...

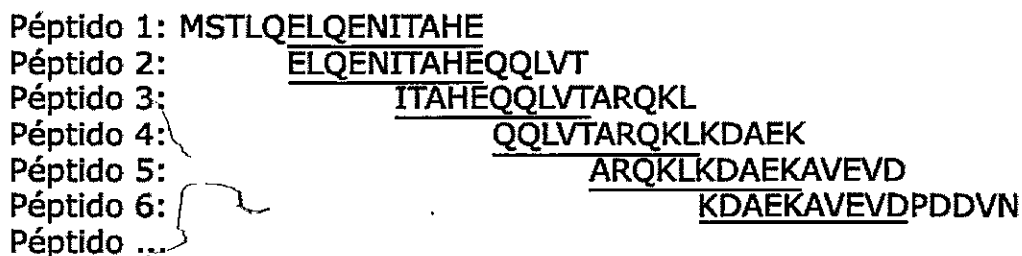


Figura 2: Ejemplo de péptidos traslapados de proteína N. Los segmentos subrayados corresponden a la secuencia traslapada entre dos péptidos consecutivos.

8.9 Screening de regiones inmunodominantes mediante ELISPOT para IFN- γ

El día anterior al ensayo se incubaron las placas de ELISPOT (MultiscreenHTS-IP 0,45 μm , Millipore, Francia) con 100 μl por pocillo de una solución de anticuerpo monoclonal anti IFN- γ humano (clon 2G1, Endogen, USA) 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS. El mismo día del ensayo se lavaron las placas 4 veces con PBS y se bloquearon con 100 μl por pocillo de una solución de PBS con BSA (Sigma-Aldrich, Alemania) 1% P/V por 1 hora. Posteriormente se realizaron los ensayos utilizando 10^5 - 2×10^5 PBMC por pocillo (en triplicados) y péptidos (ver sección 3.6) en un volumen final de 200 μl de medio PBMC por pocillo. Los resultados fueron expresados en SFU/ 10^6 PBMC (spot forming unit: unidades formadoras de spot). Como controles negativos se utilizaron diluciones de DMSO correspondientes al contenido de DMSO de las mezclas de péptido o péptidos individuales utilizados. Como control positivo se utilizó PHA (forma M, Gibco, USA) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las placas fueron incubadas por 38 hrs a 37°C y CO₂ 5% V/V. En algunos pacientes se realizaron ensayos de ELISPOT con BCG (Bacille Calmette-Guérin, BCG Vaccine SSI®, Statens Serum Institute, Dinamarca) utilizando $1,25 \times 10^4$ CFU/mL (colony forming units; unidades formadoras de colonia) por pocillo y como control negativo se utilizó una solución que contiene sulfato de magnesio, fosfato ácido de

potasio, ácido cítrico, L-asparagina, citrato de amonio hierro (III), glicerol al 85% v/v y agua bidestilada (diluyente de BCG, Statens Serum Institute, Dinamarca) diluida en medio PBMC.

Posterior a la incubación el medio y las células fueron eliminados y las placas fueron lavadas 4 veces con una solución de PBS/Tween 20 (Tween 20, Sigma-Aldrich, Alemania) 0,05% V/V y luego 4 veces con PBS. Una vez lavadas las placas fueron incubadas con 100 µl por pocillo de una solución de anticuerpo monoclonal anti IFN-γ humano biotinilado (clon B133.5, Endogen, USA) 0,25 µg/mL diluido en PBS por toda la noche a 4°C. Después de esta incubación, las placas fueron lavadas 4 veces con PBS e incubadas con una solución de estreptavidina fosfatasa alcalina (Vector Laboratories, USA) 0,1% V/V en PBS BSA 1% P/V Tween 20 0,05% V/V por 2 hrs a temperatura ambiente en oscuridad. Luego las placas fueron lavadas 4 veces con PBS y reveladas con el kit AP conjugate substrate (BioRad, USA). Se utilizó la solución tampón del kit y los sustratos A (Nitroblue de tetrazolio en solución acuosa de N,N-Dimetilformamida) y B (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en N,N-Dimetilformamida) según las indicaciones del fabricante. Finalmente la membrana de la placa de ELISPOT fue analizada mediante la unidad Eli.Scan® utilizando el software Eli.Analyse® (ambos A.EL.VIS, Alemania).

8.10 Criterio de significancia para ensayos de ELISPOT

Todos los experimentos fueron realizados en triplicados para permitir el cálculo de un promedio y de la desviación estándar. Se tomaron como respuestas significativas aquellas que cumplían con los siguientes tres criterios:

- Que fueran significativamente mayores ($p < 0,05$ en prueba de T de student con muestras independientes de dos colas) que sus respectivos controles negativos (dilución de DMSO correspondiente al péptido investigado o al diluyente de BCG).
- Que fueran significativamente mayores que el valor de corte tomando en cuenta la respuesta de 20 controles sanos ($p < 0,05$ en prueba de T de student con muestras independientes de dos colas).
- Que fueran valores superiores a las $50 \text{ SFU}/10^6 \text{ PBMC}$, dado que en general valores inferiores a este no son considerados como significativos.

Los resultados obtenidos en los ensayos de ELISPOT fueron expresados como SFU específicos, es decir, la diferencia entre el promedio de la respuesta frente a antígeno(s) y el control negativo correspondiente.

8.11 Diseño experimental

Los pasos del procesamiento de PBMC y la secuencia de los ensayos experimentales se muestran en la figura 3.

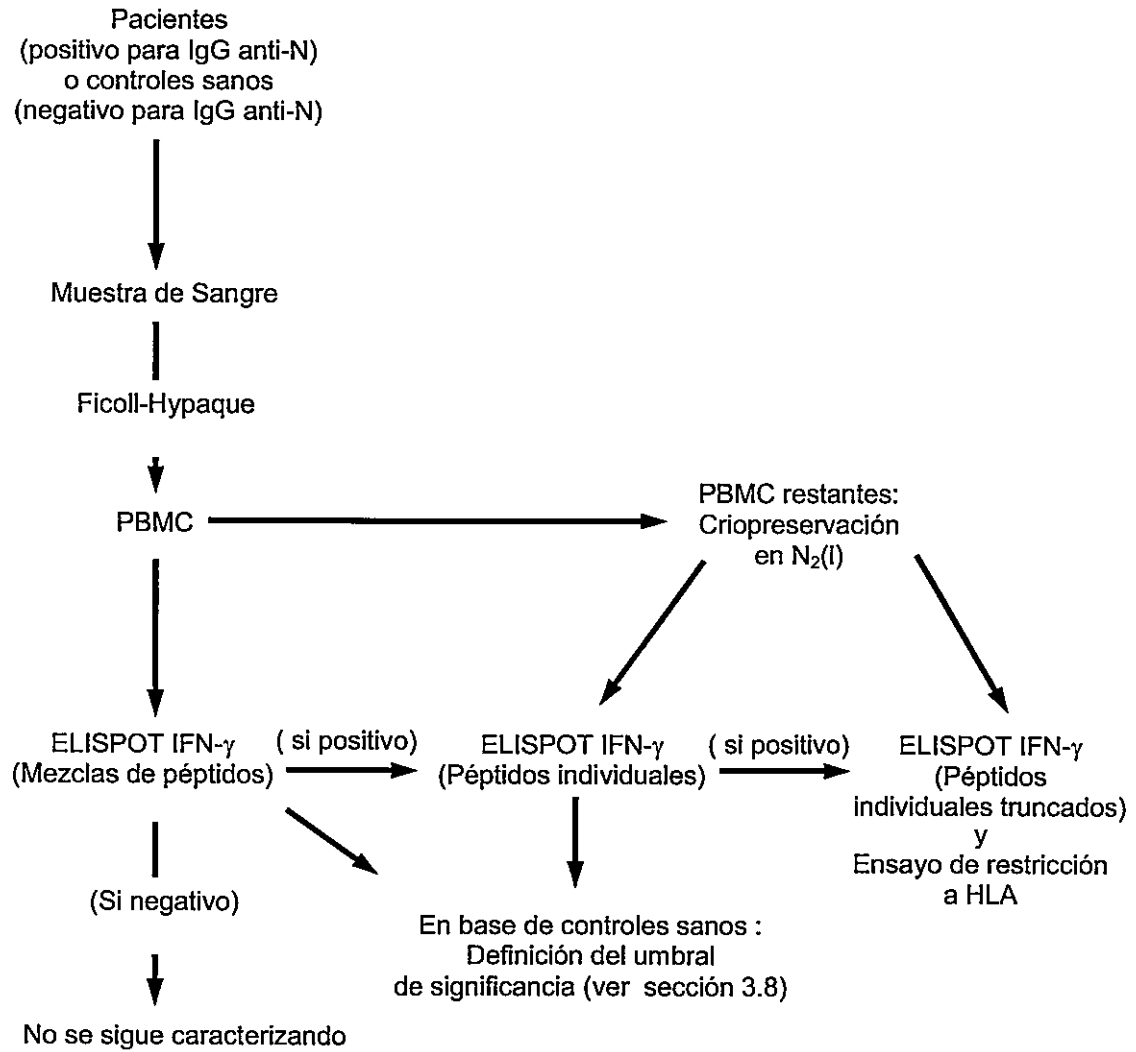


Figura 3. Diagrama resumen del diseño experimental.

8.12 Establecimiento de línea celular linfoide B (B-LCL)

8.12.1 Preparación de sobrenadantes con EBV

Se cultivaron células B95-8 en medio compuesto por medio RPMI 1640, SFB descomplementado 10% V/V, gentamicina 80 µg/mL y L-glutamina 2 mM a una concentración de 1×10^6 células/mL. Estas fueron incubadas por 3 días a 37°C y CO₂ 5% V/V. Luego se centrifugaron por 10 min a 300xg a 4°C. El sobrenadante fue recolectado y fue filtrado a través de un filtro de 0,45 µm.

8.12.2 Inmortalización de linfocitos B por infección con EBV

Se añadieron 1×10^7 PBMC a 2 mL del sobrenadante con EBV. A continuación las células fueron incubadas por 1 hr a 37°C en un baño termostático. Posteriormente se agregaron 4 mL de medio compuesto por medio RPMI 1640, SFB descomplementado 10% V/V, gentamicina 80 µg/mL y L-glutamina 2 mM con ciclosporina A (Sandimmun (ciclosporina A), Laboratorio Novartis, Chile) 1 µg/mL y la suspensión fue transferida a botellas de cultivo celular de 25 cm² de área. Luego las células fueron incubadas a 37°C y CO₂ 5% V/V reemplazando 2 mL de sobrenadante por 2 mL medio PBMC cada 3 a 4 días. Normalmente la inmortalización de linfocitos B (B-LCL: línea celular linfoide B) se observó después de 3 a 4 semanas de cultivo.

8.13 Establecimiento de líneas de linfocitos T específicos para péptidos

Para los ensayos de restricción de HLA y ensayos de determinación de la secuencia del epítipo mínimo, se generaron cultivos de linfocitos T expandidos (línea de linfocitos T) y específicos para un péptido dado. En placas Nunc de 96 pocillos de fondo cóncavo

(Nunc, USA), se cultivaron 2×10^5 PBMC por pocillo en medio compuesto por medio RPMI 1640, SFB descomplementado 10% V/V, gentamicina 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y L-glutamina 2 mM con péptido 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IL-7 (R & D systems, USA) 5 ng/mL, e IL-12 (R & D systems, USA) 300 pg/mL en un volumen final de 100 μl . Las células fueron cultivadas a 37°C y CO_2 5% V/V. Al cuarto día se agregaron 100 μl por pocillo de medio compuesto por medio RPMI 1640, SFB descomplementado 10% V/V, gentamicina 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y L-glutamina 2 mM con IL-2 (R & D systems, USA) 4 ng/mL e IL-15 (R & D systems, USA) 500 ng/mL. Al séptimo día se agregaron 100.000 PBMC autólogas irradiadas (30 Gy) o B-LCL irradiados (100 Gy)(ver arriba) por pocillo en presencia de péptido 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IL-2 2 ng/mL e IL-7 10 ng/mL. Al décimo primer día se tomaron 100 μl de sobrenadantes por pocillo y se reemplazó por 100 μL de medio compuesto por medio RPMI 1640, SFB descomplementado 10% V/V, gentamicina 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y L-glutamina 2 mM fresco con IL-2 4 ng/mL e IL-15 500 ng/mL. Al décimo cuarto día se repitió el procedimiento del séptimo día, pero se utilizó medio compuesto por medio RPMI 1640, SFB descomplementado 10% V/V, gentamicina 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y L-glutamina 2 mM con péptido 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e IL-2 2 ng/mL. El décimo octavo día se repitió el procedimiento del décimo primer día y se utilizaron las células al vigésimo primer día.

8.14 Ensayos de restricción de HLA para péptidos individuales truncados.

Se utilizaron células de la línea de linfocitos T específica para el péptido G1₄₆₁₋₄₇₅ y B-LCL autólogos o heterólogos previamente irradiados en una proporción 1 a 2,5 respectivamente por pocillo. Una vez irradiados los B-LCL, estos fueron incubados en tubos de 15 mL por 2 hrs a 37°C en un baño termorregulado en medio compuesto por medio RPMI 1640, SFB descomplementado 10% V/V, gentamicina 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y L-

glutamina 2 mM con péptido a 10 µg/mL. Para el control negativo se incubaron las células en las mismas condiciones pero en medio compuesto por medio RPMI 1640, SFB descomplementado 10% V/V, gentamicina 80 µg/mL y L-glutamina 2 mM con DMSO a la concentración correspondiente. A continuación los B-LCL fueron lavados con medio compuesto por medio RPMI 1640, SFB descomplementado 10% V/V, gentamicina 80 µg/mL y L-glutamina 2 mM y se centrifugaron por 10 min a 400xg a 4°C. Este último paso se realizó dos veces. Luego se eliminó el sobrenadante y los B-LCL fueron resuspendidos en medio compuesto por medio RPMI 1640, SFB descomplementado 10% V/V, gentamicina 80 µg/mL y L-glutamina 2 mM, para finalmente ser utilizadas en el ensayo de ELISPOT. Como criterio de significancia se aplicó una diferencia significativa ($p < 0,05$ en prueba de T de Student, muestras independientes, de dos colas) respecto al control negativo del mismo experimento.

8.15 Análisis estadístico

Para la determinación de la significancia de los valores obtenidos en los ensayos de ELISPOT se utilizó $p < 0,05$ en prueba de T de Student, muestras independientes, de dos colas. Para el análisis de la longevidad de la respuesta inmune v/s años post-hospitalización (ver fig. 8) se utilizó una regresión lineal simple y el coeficiente de correlación de Pearson (r)

9. Resultados

9.1 Pacientes convalecientes mantienen respuesta inmune celular y la proteína G1 de ANDV es altamente inmunogénica.

Para detectar linfocitos T específicos contra ANDV se desafiaron *ex vivo* PBMC de 75 pacientes chilenos convalecientes de la infección con ANDV (ver materiales y métodos) con 310 péptidos traslapados (que representan las secuencias de la proteínas N y del precursor de las glicoproteínas G1 y G2, respectivamente) y luego se evaluó su activación mediante ensayos de ELISPOT para IFN- γ por 38 horas (ver fig. 4).

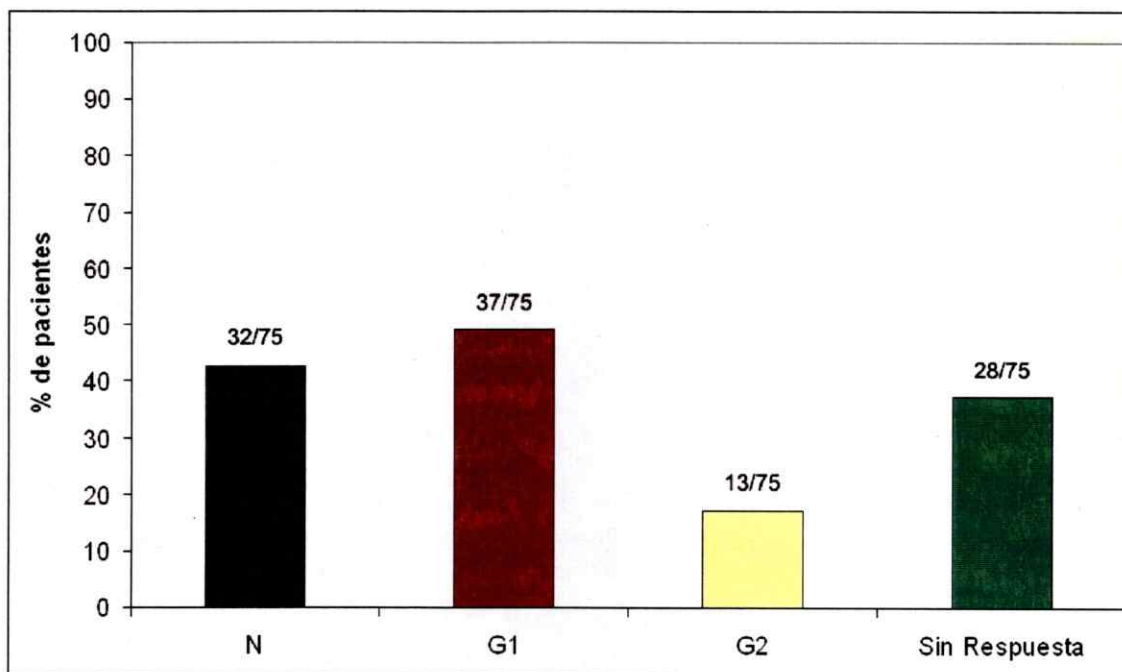


Figura 4: Porcentaje de pacientes con o sin respuesta a antígenos de ANDV según resultados de ELISPOT para IFN- γ (38 hrs). Los números sobre las categorías representan la proporción entre los pacientes que reconocen significativamente un antígeno y el total de los pacientes estudiados (N, G1, y G2: n=75).

Considerando los tres criterios de positividad (ver, materiales y métodos), 47/75 (63%) pacientes mostraron una respuesta significativa contra al menos una proteína viral (N, G1 o G2) representada por péptidos, siendo la respuesta promedio de 1781 SFU/10⁶ PBMC. Dentro de este grupo de pacientes, 32/47 (68%) presentó respuesta

significativa contra epítomos de la proteína N, mientras que sólo 13/47 (28%) presentó PBMC específicas contra G2. Un total de 37/47 (79%) de los pacientes mostró reconocimiento de epítomos en la proteína G1. Con respecto a la magnitud de las respuestas, la respuesta predominante fue la obtenida contra G1 alcanzando un promedio de 907 SFU/10⁶ PBMC, representando 51% de la respuesta total promedio (1781 SFU/10⁶ PBMC) obtenida en los 47 pacientes frente a los tres antígenos virales. En cambio, la magnitud promedio para los epítomos en la proteína N y G2 fueron de 731 SFU/10⁶ PBMC y 148 SFU/10⁶ PBMC respectivamente (ver fig. 5). Por lo tanto, dentro de las proteínas virales los epítomos de G1 son inmunodominantes en la población estudiada.

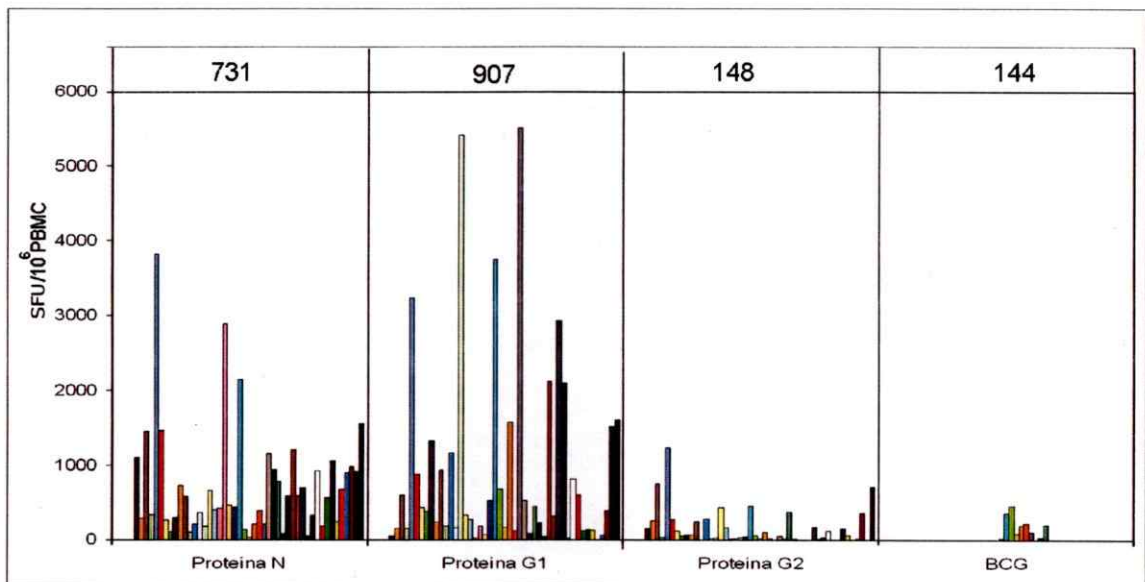


Figura 5: Respuesta inmune celular contra proteínas de ANDV en los 47 pacientes con respuesta significativa contra por lo menos un antígeno viral en ensayo de ELISPOT para IFN- γ . Cada barra indica la respuesta de un paciente. Los números sobre cada categoría indican el promedio de SFU/10⁶ PBMC para las proteínas N, G1 y G2 (n=47) y para BCG (n=11). Para cada región se estableció un umbral de significancia basado en 20 individuos sanos y los criterios de positividad (ver materiales y métodos, sección 8.10). Cada barra representa la suma de SFU/10⁶ PBMC contra cada una de las regiones de las proteínas virales indicadas. Se utilizó respuesta contra BCG en pacientes vacunados como referencia para la magnitud de la respuesta inmune. ANDV, Hantavirus Andes; BCG, Bacillus de Calmette y Guérin; SFU, unidades formadoras de spot; PBMC, células mononucleadas periféricas sanguíneas.

Las regiones inmunogénicas dentro de la proteína N de ANDV incluyeron aa 1-70 (26% de los pacientes reconocieron esta región), aa 121-190 y aa 181-250 (21% de los pacientes reconocieron estas regiones) (ver fig. 6), con una respuesta promedio de 120, 149 y 152 SFU/10⁶ PBMC respectivamente.

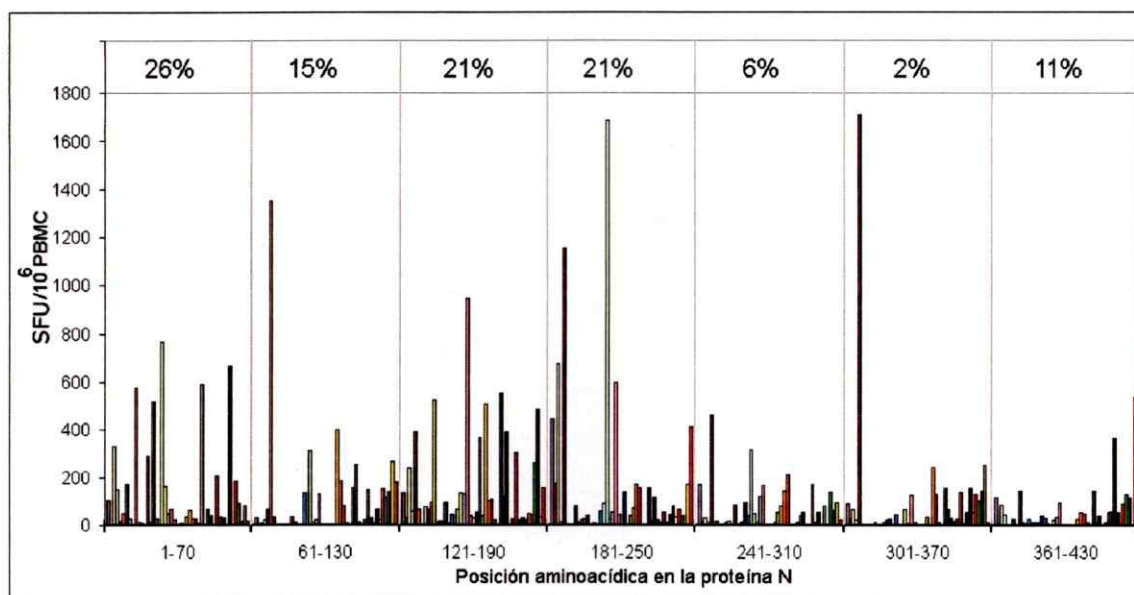


Figura 6: Respuesta inmune celular contra regiones aminoacídicas de la proteína N. Las PBMC de cada paciente fueron estimuladas en ensayos de ELISPOT para IFN- γ (38 hrs) con mezclas de péptidos representando las regiones mencionadas (separadas por líneas verticales). Los números sobre cada categoría representan el porcentaje del total de los pacientes positivos (n=47) que reconocieron significativamente epítomos en cada región. Cada barra indica la respuesta de un paciente. Para cada región se estableció un umbral de significancia basado en 20 individuos sanos y los criterios de positividad (ver materiales y métodos, sección 8.10). SFU, unidades formadoras de spot; PBMC, células sanguíneas mononucleadas periféricas.

En la región carboxilo terminal de la proteína G1, se detectó una respuesta de más de cuatro veces (promedio de 622 SFU/10⁶ PBMC y rango entre 0 y 5506 SFU/10⁶ PBMC) lo observado para las regiones inmunogénicas de la proteína N (promedio de 152 SFU/10⁶ PBMC) (ver fig. 7).

Estos datos indican que el extremo carboxilo terminal de G1 es altamente inmunogénico en sobrevivientes de la infección con ANDV.

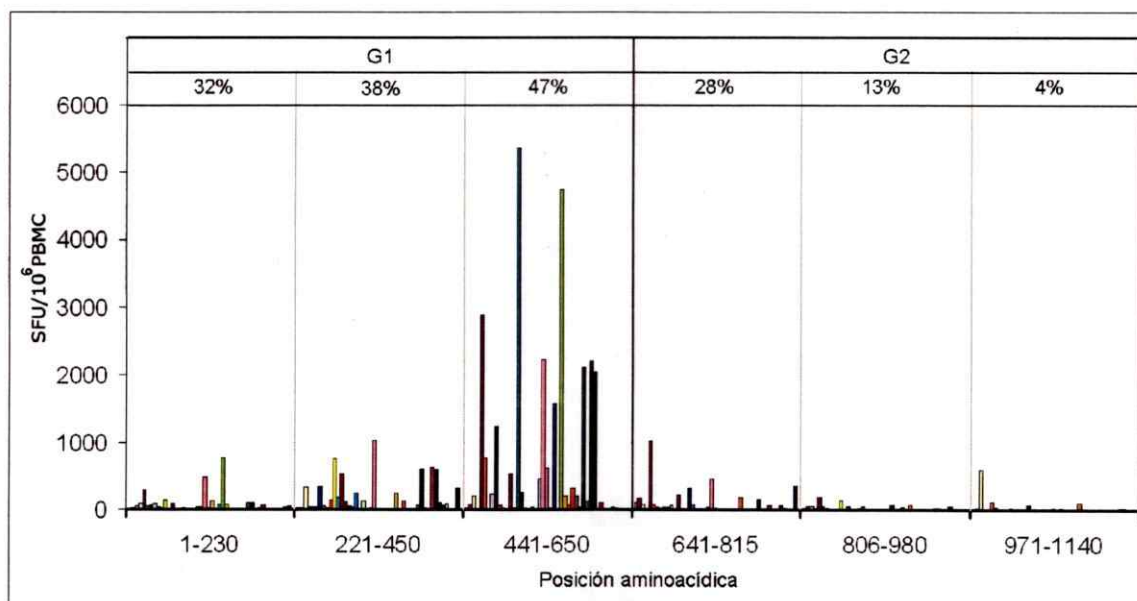


Figura 7: Respuesta inmune celular contra las regiones aminoacídicas del precursor de las proteínas G1 y G2 (G1 aa 1-641, G2 aa 642-1140). Las PBMC de cada paciente fueron estimuladas en ensayos de ELISPOT para IFN- γ (38 hrs) con mezclas de péptidos representando las regiones mencionadas (separadas por líneas verticales). Los números sobre cada categoría representan el porcentaje del total de los pacientes positivos ($n=47$) que reconocieron significativamente epítomos en cada región. Cada barra indica la respuesta de un paciente. Para cada región se estableció un umbral de significancia basado en 20 individuos sanos y los criterios de positividad (ver materiales y métodos, sección 8.10). SFU, unidades formadoras de spot; PBMC, células sanguíneas mononucleadas periféricas.

9.2 Longevidad de la respuesta inmune de linfocitos T específica contra G1

Para comparar la durabilidad de la respuesta inmune frente a los distintos antígenos virales decidimos analizar nuestra cohorte en forma croseccional y respecto a cada antígeno. Este análisis permite la comparación de la respuesta frente a los distintos antígenos de forma intrapoblacional. Sin embargo para determinar el desarrollo de la respuesta inmune en el tiempo, sería necesario analizar la respuesta inmune de pacientes en forma longitudinal, requiriendo varios años de estudio.

Por lo tanto se analizó el número de linfocitos T específicos contra ANDV de cada paciente con el tiempo transcurrido entre la admisión hospitalaria por infección con hantavirus ANDV (ver fig. 8).

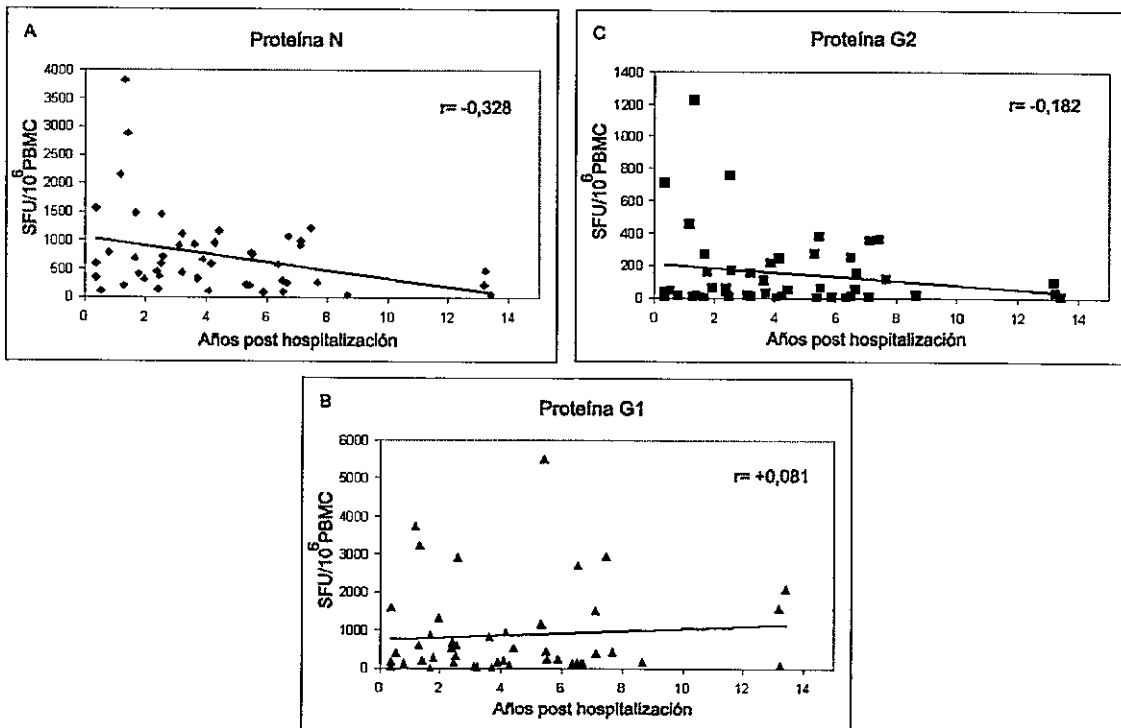


Figura 8: Longevidad de la respuesta inmune v/s años post hospitalización para las proteínas de ANDV. (A) Respuesta contra N, (B) respuesta contra G1, y (C) respuesta contra G2. (n=47). Cada símbolo representa la respuesta promedio de un paciente frente al antígeno indicado correspondiente y la respuesta de cada paciente está representada en figuras A, B, y C. SFU, unidades formadoras de spot; PBMC, células sanguíneas mononucleadas periféricas.

En este análisis se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las regresiones lineales de las respuestas contra N y G1. La respuesta de linfocitos T contra N y G2 (ver fig. 8A y 8C) presentó un decaimiento a través del tiempo ($r = -0,328$ y $r = -0,182$, respectivamente).

No obstante la respuesta contra los epítomos en G1 (ver fig. 8B) tuvo un leve incremento ($r = +0,081$). Más aun, la pendiente de la regresión lineal se mantuvo positiva al eliminar del análisis a los 3 pacientes que fueron investigados más de 13 años después de la fase aguda, así sugiriendo una larga durabilidad de la respuesta contra G1.

La longevidad de la respuesta G1-específica se ve reflejada también por el aumento en un 64% en la contribución relativa de la respuesta específica contra G1 respecto a la respuesta total. Esto es apreciable al comparar los pacientes estudiados hasta los 5 años post-admisión y los pacientes a más de 5 años posterior a la admisión hospitalaria (ver fig. 9).

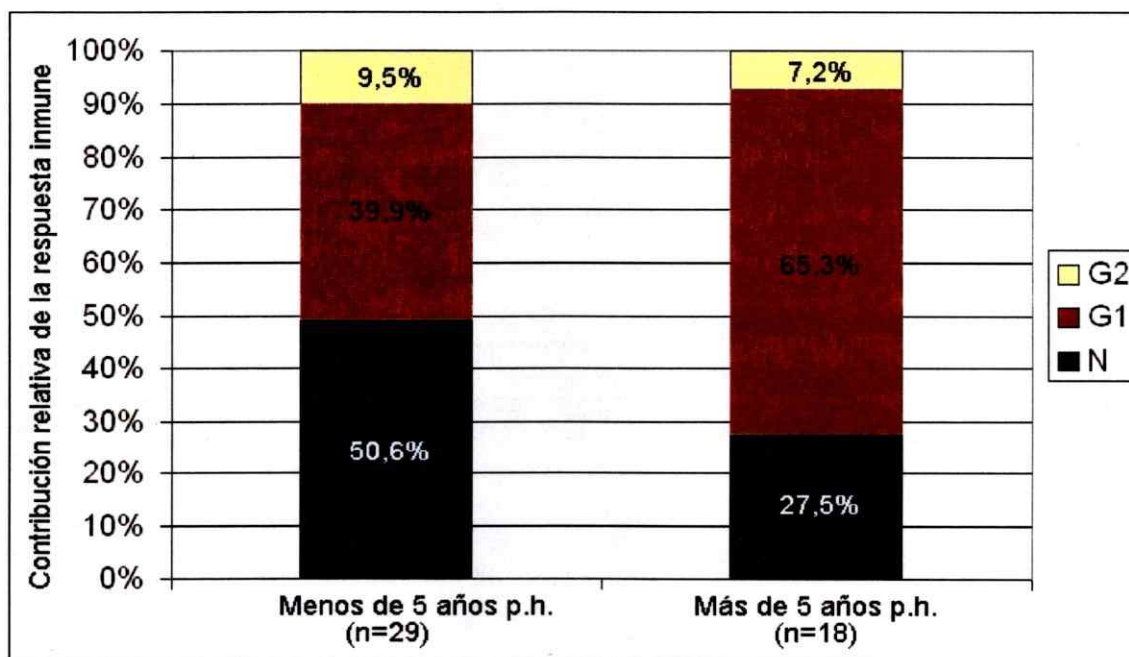


Figura 9: Contribución relativa de la respuesta inmune celular específica contra las proteínas N, G1, y G2 a la respuesta inmune celular con respecto al tiempo post hospitalización de los pacientes. Los porcentajes representan la contribución de la respuesta inmune promedio específica para cada antígeno, a la respuesta promedio total. p.h. post hospitalización.

A pesar de que no fue posible obtener datos longitudinales en pacientes individuales, la información obtenida sugiere que los linfocitos T de memoria específicos contra G1 se mantienen en circulación por más tiempo que los linfocitos T específicos para N y G2.

9.3 Epítomos en la proteína N

Considerando los resultados de los ensayos de ELISPOT para IFN- γ obtenidos al estimular con las mezclas de péptidos, se acotaron progresivamente las regiones que gatillaron la respuesta inmune. Una vez identificadas las mezclas responsables de la activación linfocitaria se identificaron los péptidos individuales responsables de la respuesta inmune. En base a los resultados de los ensayos de ELISPOT para IFN- γ obtenidos al estimular los péptidos individuales se encontraron distintos epítomos en N (ver fig. 10).

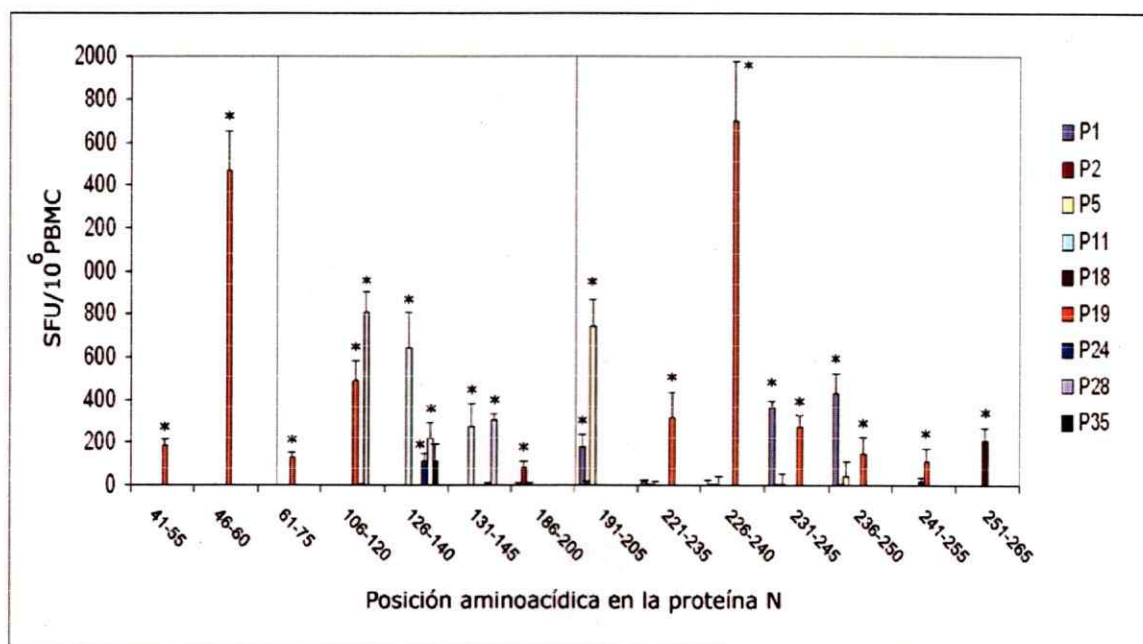


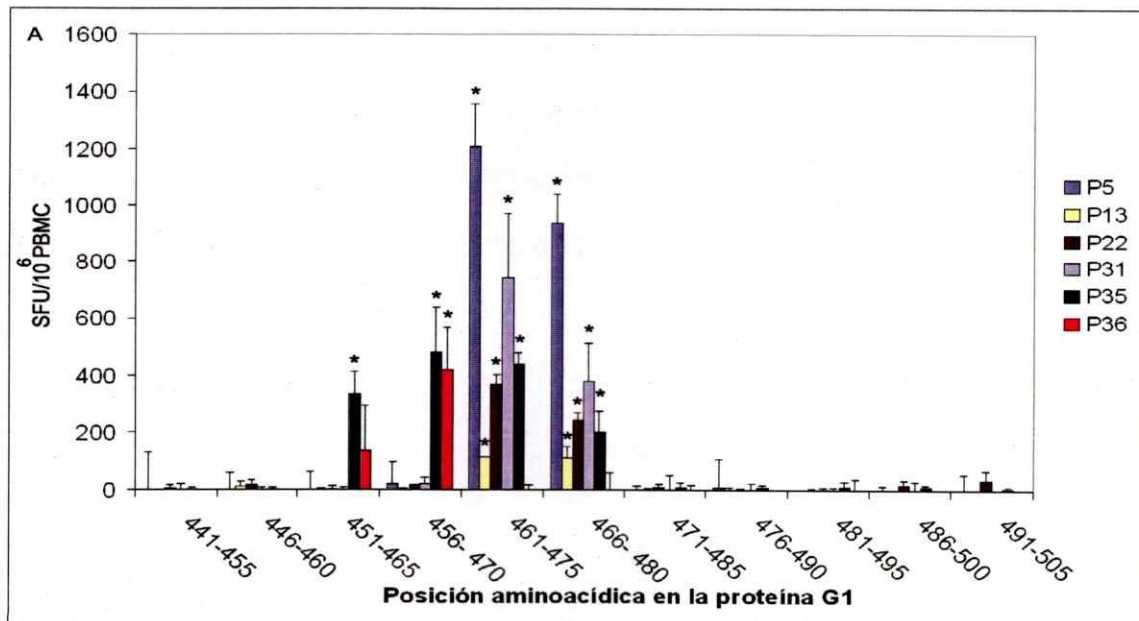
Figura 10: Epítomos de linfocitos T en diferentes regiones de la proteína N (separadas por líneas verticales). Las células de cada paciente fueron estimuladas en ensayos de ELISPOT para IFN- γ (38 hrs) con los péptidos individuales (10 μ g/mL) mencionados para cada región. Cada barra con asterisco (*) representa la respuesta promedio de un paciente (ver leyenda) con respuesta significativa ($p < 0,05$; $n=9$) respecto a su control negativo correspondiente, junto con la desviación estándar derivado de los ensayos en triplicado. SFU, unidades formadoras de spot; PBMC, células sanguíneas mononucleadas periféricas.

Para los epítomos encontrados en N, no se aprecia una región predominantemente reconocida. A diferencia del caso anterior, la respuesta frente a G2 no fue de gran magnitud (promedio de 89 SFU/10⁶ PBMC), por lo que no examinamos los epítomos a

nivel aminoacídico.

9.4 Inmunodominancia de G1₄₆₁₋₄₇₅ en el extremo carboxilo terminal de la proteína G1

Dada la inmunodominancia de G1 (ver fig. 5) y particularmente del extremo carboxilo terminal (G1₄₄₁₋₆₅₀) (ver fig. 7), se estimularon PBMC criopreservadas, de pacientes con respuesta a G1, con mezclas pequeñas de péptidos que comprendieron las secuencias G1₄₄₁₋₅₀₅, G1₄₉₆₋₅₆₀, G1₅₅₁₋₆₁₅ y G1₆₀₆₋₆₅₀, respectivamente. En contraposición a la respuesta contra N y G2, se encontró una respuesta concentrada y de gran magnitud contra G1₄₄₁₋₅₀₅ (datos no mostrados). Por lo tanto, se determinaron las secuencias peptídicas individuales, responsables de inducir la respuesta contra esta región de G1. Luego se estimularon PBMC criopreservadas con los 11 péptidos individuales representando la región G1₄₄₁₋₅₀₅. Como se ve en las figuras (ver fig. 11A y 11B), de diez pacientes investigados solamente dos pacientes (P36, fig. 11A) y (P27, fig. 11B) reconocieron exclusivamente el péptido G1₄₅₁₋₄₆₅ y/o el péptido G1₄₅₆₋₄₇₀, mientras que los pacientes (P35, fig. 11A) y (P15, fig. 11B) adicionalmente reconocieron los péptidos G1₄₆₁₋₄₇₅ y G1₄₆₆₋₄₈₀.



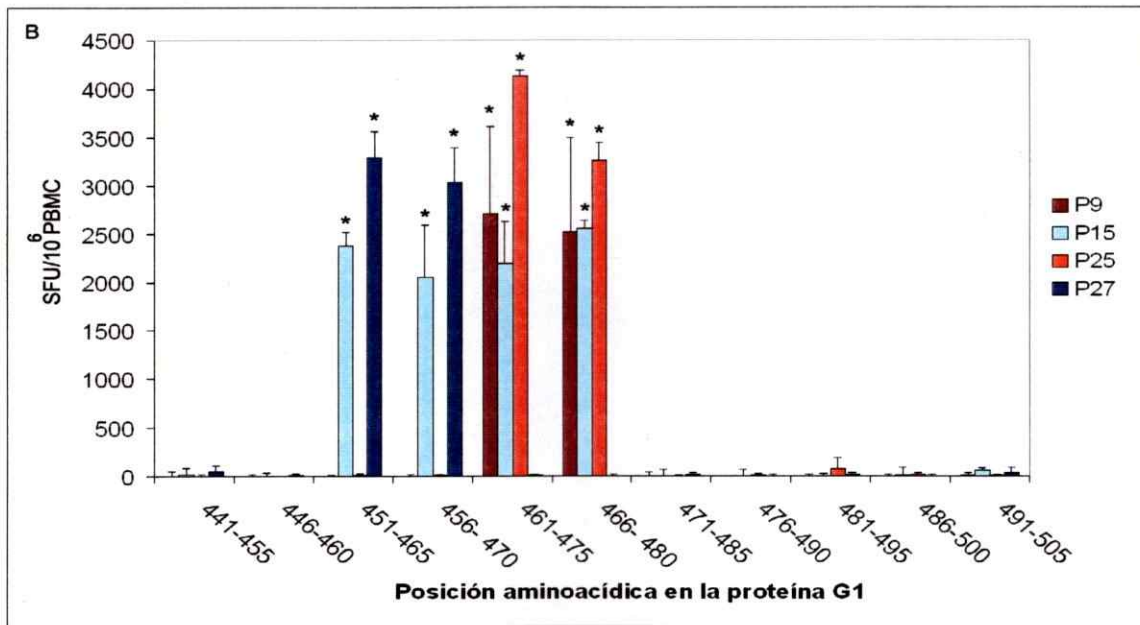


Figura 11: Epítomos de linfocitos T en la proteína G1. A) Respuesta inmune celular de linfocitos T menor intensidad. B) Respuesta inmune celular de linfocitos T de mayor intensidad. Las células de cada paciente fueron estimuladas en ensayos de ELISPOT para IFN- γ (38 hrs) con los 11 péptidos individuales (10 μ g/mL) indicados. Cada barra con asterisco (*) representa la respuesta promedio de un paciente (ver leyenda) con respuesta significativa ($p < 0,05$; $n=10$) respecto a su control negativo correspondiente, junto con la desviación estándar derivado de los ensayos en triplicado. SFU, unidades formadoras de spot; PBMC, células mononucleadas periféricas sanguíneas.

Por otra parte, seis pacientes (P5, P13, P22, P31: fig. 11A; P9 y P25: fig. 11B) mostraron reconocimiento exclusivo de los péptidos G1₄₆₁₋₄₇₅ y G1₄₆₆₋₄₈₀. En resumen 8/8 (100%) pacientes reconocieron el epítipo G1₄₆₁₋₄₇₅ y G1₄₆₆₋₄₈₀. Debido a que ambos pares de péptidos, G1₄₅₁₋₄₆₅/G1₄₅₆₋₄₇₀ y G1₄₆₁₋₄₇₅/G1₄₆₆₋₄₈₀ comparten 10 aminoácidos en su secuencia respectivamente, y dado que el tamaño típico de los epítomos presentados por MHC clase I es de 8 a 11 aa, se asumió que existían dos epítomos de linfocitos T CD8⁺ dentro de la secuencia traslapada (G1₄₅₆₋₄₆₅ y G1₄₆₆₋₄₇₅ respectivamente). Al estudiar los alelos de HLA-A y HLA-B (en colaboración con Dra. Elena Llop, Universidad de Chile), se observó que de los pacientes con respuesta a G1₄₅₁₋₄₆₅/G1₄₅₆₋₄₇₀, 4/4 compartían el alelo HLA-A*24 (P15, P27, P35 y P36; rango de respuesta 333-3293 SFU/10⁶ PBMC), mientras que 8/8 pacientes que presentaron reconocimiento de antígeno en G1₄₆₁₋₄₇₅/ G1₄₆₆₋₄₈₀ (P5, P9, P13, P15, P22, P25, P31, y

P35; rango de respuesta 110-4133 SFU/10⁶ PBMC) compartían solamente el alelo HLA-B*35. Nuevamente, esto sugiere la existencia de dos epítomos de linfocitos T CD8⁺ en la región carboxilo terminal de G1, restringidos a HLA-A*24 y HLA-B*35 respectivamente.

9.5 Restricción a HLA-B*35 de G1₄₆₁₋₄₇₅

Respecto a los datos anteriores hay que destacar varios hechos: Primero, la inmunodominancia del extremo carboxilo terminal de G1 se debe mayoritariamente a la respuesta contra G1₄₆₁₋₄₇₅/G1₄₆₆₋₄₈₀ en individuos HLA-B*35⁺; segundo, el alelo HLA-B*35 es sumamente frecuente en la población estudiada (ver discusión); y tercero, el epítipo fue reconocido varios años después de la infección (ej. P13: 5 años; P15: 7 años; P25: 13 años post hospitalización). Por estas razones el epítipo dentro de G1₄₆₁₋₄₇₅/G1₄₆₆₋₄₈₀ podría ser importante en la inducción de la inmunidad celular a largo plazo. Por lo tanto decidimos demostrar formalmente la restricción a HLA de los péptidos región inmunodominante G1₄₆₁₋₄₇₅/ G1₄₆₆₋₄₈₀.

Tomando en cuenta que la respuesta inmune contra el péptido G1₄₆₁₋₄₇₅ fue mayor que la respuesta contra G1₄₆₆₋₄₈₀ (comparar respuesta en figura 11), se generaron líneas celulares de linfocitos T CD8⁺ específicas contra el péptido G1₄₆₁₋₄₇₅, las que se emplearon junto con el péptido G1₄₆₁₋₄₇₅ y células presentadoras de antígeno irradiadas (ver materiales y métodos) tanto autólogas como heterólogas que compartían solamente HLA-B*35 con los linfocitos T CD8⁺ de la línea celular.

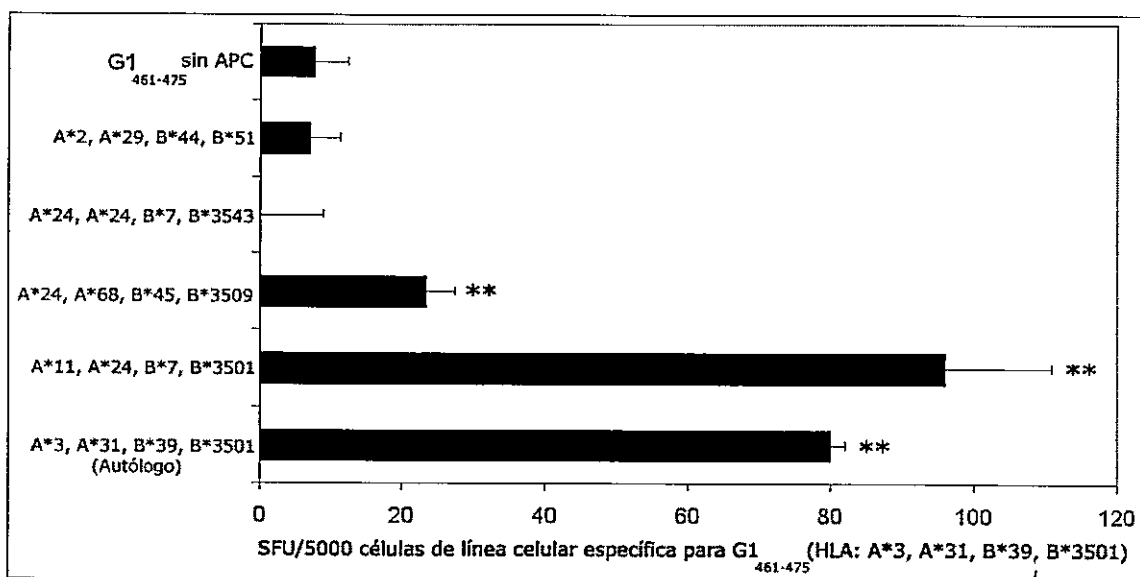


Figura 12: Restricción a HLA clase I del epítipo G1₄₆₁₋₄₇₅. Se realizaron ensayos de ELISPOT para IFN- γ (24 hrs) con una línea celular de linfocitos T CD8⁺ específica contra el péptido G1₄₆₁₋₄₇₅. Como APC se utilizaron B-LCL autólogas y heterólogas irradiadas con 100 Gy y preincubadas con G1₄₆₁₋₄₇₅ a una concentración de 10 μ g/ml. Se utilizaron células de la línea celular de linfocitos T CD8⁺ y APC en proporción 1:2,5. Cada barra con asteriscos (**) representa la respuesta promedio de un paciente con respuesta significativa ($p < 0,01$; $n = 2$), junto con la desviación estándar derivado de los ensayos en triplicado. Datos representativos de 2 experimentos independientes. APC, células presentadoras de antígeno; SFU, unidades formadoras de spot.

Como se aprecia en la figura 12, los linfocitos T CD8⁺ sólo se activaron en presencia de presentadoras de antígeno (autólogas o heterólogas) que expresaban ciertos subtipos del alelo HLA-B*35. Se observó la activación linfocitaria en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que expresan los subtipos HLA-B*3501 y HLA-B*3509, pero no HLA-B*3543; de la misma manera no se detecta activación linfocitaria con APC que carecen de la expresión de HLA-B*35. Esto demuestra que el epítipo de G1₄₆₁₋₄₇₅ está restringido a HLA-B*35. No obstante, un análisis de los 8 pacientes con respuesta significativa frente a G1₄₆₁₋₄₇₅/ G1₄₆₆₋₄₈₀ reveló un total de 6 subtipos distintos de HLA-B*35 (HLA-B*3501, HLA-B*3502, HLA-B*3505 HLA-B*3508, HLA-B*3509 y HLA-B*3543). Por lo tanto este epítipo estaría presentado por varios subtipos de HLA-B*35. Este hecho también podría explicar porque la línea de linfocitos

T CD8⁺ (con haplotipo HLA-B*3501), logró una activación significativa cuando G1₄₆₁₋₄₇₅ fue presentado por APC con el subtipo HLA-B*3509.

9.6 Epítipo mínimo de G1₄₆₁₋₄₇₅

Para determinar el epítipo mínimo dentro de la secuencia G1₄₆₁₋₄₇₅, necesario para gatillar la activación de linfocitos T CD8⁺ específicos, se generó una línea celular de linfocitos T específicos contra G1₄₆₁₋₄₇₅. Luego, estas células fueron estimuladas *in vitro* con cinco versiones del péptido G1₄₆₅₋₄₇₃, truncadas en el extremo carboxilo terminal y en el amino terminal. Como se ve en la figura 13 el residuo de metionina en posición 466 y la leucina en posición 473 determinaron en gran medida la intensidad de la respuesta inmune celular frente a G1₄₆₅₋₄₇₃.

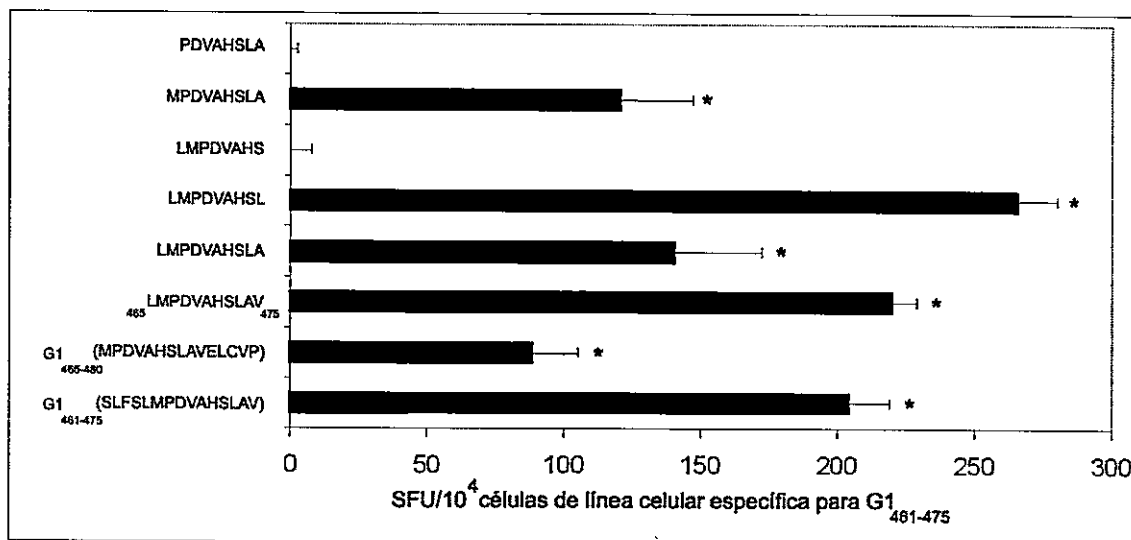


Figura 13: Determinación del epítipo mínimo en G1₄₆₁₋₄₇₅. Se realizaron ensayos de ELISPOT para IFN- γ (24 hrs) con células de una línea celular de linfocitos T CD8⁺ expandidas con el péptido G1₄₆₁₋₄₇₅ en el día 14. Péptidos utilizados a una concentración de 10 μ g/ml. Como APC se utilizaron PBMC autólogas irradiadas con 30 Gy. En el ensayo se usaron células de la línea celular y APC en proporción 1:2,5 respectivamente. Cada barra con asterisco (*) representa la respuesta promedio de un paciente con respuesta significativa ($p < 0,05$; $n=3$) respecto a su control negativo correspondiente, junto con la desviación estándar derivado de los ensayos en triplicado. Datos representativos de 3 experimentos independientes. APC, células presentadoras de antígeno; IFN- γ , interferón gama; SFU, unidades formadoras de spots

Específicamente, la secuencia 465-LMPDVAHSL-473 gatilló la respuesta de mayor magnitud. Al eliminar el residuo de leucina 473 (465-LMPDVAHS-472) la respuesta disminuyó en un 100%. Por otra parte, al truncar el residuo de metionina del péptido en posición 466 (467-PDVAHSLA-474) la respuesta disminuyó en un 100% comparado con la respuesta a 466-MPDVAHSLA-474. En el caso de la eliminación del residuo de leucina en posición 465 (466-MPDVAHSLA-474), si bien su presencia no es imprescindible para el reconocimiento, se observó una reducción de la respuesta en un 14% comparado con 465-LMPDVAHSLA-474.

Entonces, según lo observado en la figura (ver fig. 13) el epítipo mínimo tiene la siguiente secuencia aminoacídica 466-MPDVAHSL-473, estando en acuerdo con la necesidad de una prolina en la posición 2 para epítipos presentados por HLA-B*35, descrita en la literatura.

Bayou (AAA61690)	458	***F*****V*N*****L***V*	486] SCPH
El Moro Canyon (AAA87198)	456	***L*****L*G*****M***I*	484	
New York (AAC54560)	456	***F*****I*G*****L***L*	484	
Sin Nombre (AAA75530)	456	***F*****I*G*****L***L*	484	
Choclo (ABB90558)	455	***F*****A*S*****L***L*	483	
Andes (AAG22532)	455	IYFTSLFSLMPDVAHSLAVELCVPLH	483	
Laguna Negra (AAB87603)	455	***F*****L***L*	483	
Lechiguanas (AAB87908)	385	***F*****L***L*	413	
Oran (AAB87910)	385	***F*****L***L*	413	
Puumala (CAB43026)	462	*****I***I*G*****	490	
Seoul (ABB36801)	450	***I*****L*G***I*I*****F*	478] FHSR
Dobrava (AAY27875)	452	**SV*****I**G***I*I*****F*	480	
Hantaan (BAD04844)	452	***I*****L*G***I*****F*	480	

Figura 14: Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas del precursor de las glicoproteínas G1/G2 de distintas cepas de hantavirus causantes de SCPH y FHSR, número de acceso a Genbank entre paréntesis. En negritas secuencia de ANDV. Los números representan posición aminoacídica. Alineamiento generado por ClustalW v1.83; "*" indica residuos idénticos. Destacado en rojo, epítipo mínimo encontrado en G1₄₆₁₋₄₇₅ de ANDV. SCPH, Síndrome cardiopulmonar por hantavirus; FHSR, Fiebre hemorrágica con síndrome renal.

10. Discusión

El objetivo de una vacuna es inducir una respuesta inmune protectora, de larga durabilidad y eficiencia. Los parámetros que determinan una respuesta con estas características varían para los distintos patógenos (Kaufmann, 2007). En algunos casos la protección se ha basado principalmente en anticuerpos, ya sea en infecciones bacterianas (Siber y col, 1992), como en infecciones virales (Hankins y Rosekrans, 2004). Por otra parte, existen ejemplos de vacunas basadas principalmente en linfocitos T como se ha observado para BCG (Kaufmann y McMichael, 2005). Una revisión de la respuesta inmune gatillada por diversas vacunas exitosas sugiere que la protección a corto plazo estaría mediada por anticuerpos y que en contraposición la respuesta inmune celular sería probablemente responsable de conferir protección a largo plazo (Lambert y col, 2005). Por lo tanto, para inducir una respuesta inmune protectora, de larga durabilidad y eficiencia, es necesario inducir tanto una respuesta inmune humoral como una respuesta inmune celular (Welsh y Fujinami, 2007). Para lograr la eliminación de virus mediada por la respuesta inmune celular es necesario conocer los determinantes antigénicos que gatillan esta respuesta, para así inducir una respuesta inmune que pueda servir como un método preventivo contra la infección.

En el presente trabajo detectamos la presencia de una respuesta inmune celular específica contra ANDV, así confirmando nuestra hipótesis principal. Hay que destacar la elevada magnitud ($1781 \text{ SFU}/10^6 \text{ PBMC}$) de la respuesta inmune celular hasta varios años después de la infección comparado con lo observado en estudios con PUUV ($300 \text{ SFU}/10^6 \text{ PBMC}$; Van Epps, 2002). Esta diferencia podría deberse a varios factores. En primer lugar evaluamos la respuesta inmune celular mediante ELISPOT para IFN- γ usando péptidos traslapados que representan las proteínas N, G1, y G2 de ANDV. Mientras que Van Epps y otros utilizaron (Ennis y col, 1997; Van Epps y col, 1999; Lee

y col, 2002; Van Epps y col 2002; Kilpatrick y col 2002) péptidos individuales seleccionados o linfocitos T expandidos, en la presente tesis simulamos virtualmente todos los epítomos presentes en ANDV investigando linfocitos T *ex vivo*. En segundo lugar nuestra población estudiada no fue preseleccionada según sus alelos de HLA, así permitiendo la detección de una respuesta inmune de alta magnitud asociada a la restricción a un alelo de HLA específico no evaluada en el estudio de Van Epps (Van Epps y col, 2002). Finalmente, nuestro estudio involucró una población más de cuatro veces mayor que lo que se ha descrito en la literatura anteriormente. Estudiar una población de mayor tamaño permite detectar patrones de inmunodominancia con mayor exactitud.

Dentro de la población de pacientes enrolados en el estudio (n=75), 28 no presentaron respuesta significativa frente a ninguna de las proteínas estudiadas. Esto puede ser atribuido a varias razones, como la falta de expresión de alelos de HLA capaces de presentar epítomos inmunodominantes, la dosis del virus a la que los pacientes fueron inicialmente expuestos, o a la efectividad en la interrupción de la respuesta mediada por IFN- α (ver introducción) causada por la infección con ANDV.

Respecto a la inmunogenicidad de las distintas proteínas, existe un fuerte predominio de la respuesta inmune celular contra N y G1 en comparación con lo que ocurre con G2. A diferencia de las primeras, la respuesta en G2 es baja y en promedio no supera el valor obtenido con el antígeno de referencia BCG. En comparación con el estudio de la respuesta inmune frente a otros patógenos (ej. influenza), la respuesta frente a BCG es útil como referencia ya que todos los pacientes chilenos han sido vacunados con la misma dosis de BCG en dos ocasiones, con siete años de separación entre las dosis.

Adicionalmente los resultados de la respuesta inmune contra BCG obtenidos, son comparables en magnitud con lo observado en la literatura (Ota y col, 2007).

Mientras múltiples estudios han descrito la inmunogenicidad y diferentes epítomos dentro de la proteína N de distintos hantavirus (Ennis y col, 1997; Van Epps y col, 1999; Park y col, 2000; Van Epps y col, 2002; Lee y col, 2002; Kilpatrick y col, 2004; Maeda y col, 2004, y Taruishi y col, 2007), hay que destacar la inmunodominancia de los epítomos de G1 que fueron reconocidos en un 47% de los pacientes estudiados en la presente tesis

Dentro del género hantavirus, la proteína N presenta una estructura primaria altamente conservada (Kaukinen y col, 2005). En nuestro estudio, las regiones inmunogénicas encontradas dentro de la proteína N, corresponden al extremo amino terminal (aa 1-70) y a la región comprendida entre los aa 120-250. Estas regiones son las reconocidas con mayor frecuencia en la proteína N, específicamente por el 25% (aa 1-70) y el 21% (aa 120-250) de la población de pacientes estudiados. Si bien algunos epítomos encontrados en la proteína N habían sido previamente caracterizados en otros hantavirus (HTNV, PUUV y SNV), específicamente en las posiciones aminoácidas aa 127-141 (Ennis y col, 1997), aa 131-139 (Kilpatrick y col, 2004), aa 221-228 (Park y col 2000), aa 234-242 (Ennis y col, 1997), y aa 236-250 (Van Epps y col 2002), sólo se había identificado un epítomo, aa 7-21, (Van Epps y col, 1999) en los primeros 75 aminoácidos de la proteína N. En nuestro estudio se identificaron por primera vez tres epítomos en esta región aminoterminal ubicados en las posiciones aa 41-60 y aa 61-75. Algunos de estos autores han identificado epítomos en la zona carboxiterminal de la proteína N (HTNV, PUUV y SNV), particularmente aa 367-381 (Ennis y col, 1997), aa 416-429 (Van Epps y col, 1999), y aa 422-429 (Park y col, 2000), mientras que en nuestro estudio los epítomos encontrados en la proteína N se ubican entre la región

media (aa 106-120, aa 126-145, aa 186-200, aa 221-245 y aa 251-265) y el extremo amino terminal. Las diferencias entre los epítomos de la proteína N encontrados en la presente tesis y los hallados en estudios anteriores se deben probablemente a que en estudios anteriores (Ennis y col, 1997; Van Epps y col, 1999; Park y col, 2000) se utilizaron linfocitos T previamente expandidos y que, en nuestro estudio, los linfocitos T contra los epítomos carboxiterminales en la proteína N no presentan frecuencias detectables *ex vivo*

Notable es la elevada respuesta inmune promedio contra la proteína G1 (907 SFU/10⁶ PBMC) que llega a ser más de 6 veces superior a lo obtenido con BCG (144 SFU/10⁶) y 1,2 veces superior a lo obtenido con la proteína N (731 SFU/10⁶). La magnitud de la respuesta contra G1 muestra un amplio rango (entre 54 SFU/10⁶ PBMC y 5506 SFU/10⁶ PBMC), esto podría deberse a las condiciones de la infección inicial (dosis viral, interrupción de la respuesta mediada por interferones de tipo I, etc.), pero también a razones metodológicas. Por ejemplo, en nuestra experiencia la funcionalidad de los linfocitos T baja después de un período de criopreservación. No obstante, no observamos cambios considerables en el patrón de la respuesta de un individuo al comparar ensayos con PBMC frescas y PBMC previamente criopreservadas.

La elevada respuesta inmune contra G1 se concentra principalmente en el extremo carboxilo terminal (aa 441-650). Esta región de la glicoproteína G1 es de especial interés, ya que estaría involucrada en la interrupción de la respuesta antiviral mediada por interferones tipo I, y en la señalización hacia la degradación proteosómica de distintos hantavirus patogénicos (Alff y col, 2006; Sen y col, 2007). Sin embargo, analizando los tipos de HLA de los pacientes con respuesta frente a G1₄₅₁₋₄₆₅/G1₄₅₆₋₄₇₀ Y G1₄₆₁₋₄₇₅/G1₄₆₆₋₄₈₀ se puede notar que 4/4 (100%) y 8/8 (100%) de los pacientes con

respuesta contra estas regiones de G1 presentaban los alelos HLA-A*24 y/o HLA-B*35 respectivamente. El hecho que no se encontraran otros tipos de HLA sugiere que la presentación eficiente de epítomos de esta zona de G1 depende más del tipo de HLA que de la degradación proteosómica en si. Hay que tener presente que la señalización hacia la degradación proteosómica está estrechamente vinculada con la presentación de epítomos por moléculas de MHC clase I (Abbas y Lichtman, 2003). Esto no esclarece el rol de la región carboxilo terminal de G1 ya que por una parte es posible especular que una fuerte respuesta linfocitaria contra esta región lleva a la erradicación viral y protección del huésped. Por otra parte, también existe la posibilidad de que la misma respuesta contra el extremo carboxilo terminal de G1, participe en la patogénesis del SCPH. Por lo tanto sería de interés para estudios futuros si la respuesta frente a epítomos presentados por HLA-B*3501 está vinculada a la severidad del SCPH, como fue descrito en el caso de pacientes infectados con SNV (Kilpatrick y col, 2004)

La clara inmunodominancia del extremo carboxilo terminal de G1 es corroborada al revisar la ubicación de los distintos epítomos de linfocitos T encontrados. La respuesta contra G1 es sorprendentemente elevada y los epítomos encontrados se ubican dentro de la zona comprendida entre los aa 451 y 480. Esto no dista de ser novedoso ya que hasta la fecha no existe caracterización de epítomos de linfocitos T en la proteína G1 del género hantavirus en la literatura. Los dos epítomos de linfocitos T encontrados (aa 456-465 y aa 466-475) gatillan una respuesta inmune que involucra entre el 0,011% y el 0,41% de las PBMC circulantes. Estos valores son superiores a los encontrados para infecciones virales respiratorias como influenza A (0,006%-0,02%) (Jameson y col, 1998) Esto llama la atención ya que encontrar frecuencias similares a las observadas

en infecciones latentes como EBV (0,002%-0,087%) y CMV (0,015%-0,277%) (Currier y col, 2002) en la infección por ANDV es inesperado, debido a que hasta la fecha no existe evidencia de persistencia del virus en la infección por ANDV en humanos. Dada la persistencia de anticuerpos neutralizantes (Bharadwaj y col, 2000) y que hasta la fecha tampoco se han descrito reinfecciones de humanos por hantavirus, este mecanismo tampoco parece explicar la elevada frecuencia de linfocitos T en pacientes convalecientes.

La respuesta contra la zona carboxilo terminal de la proteína G1 nos llevó a caracterizar en detalle los epítomos contenidos en esta región. La determinación de los alelos de HLA a los cuales están restringidos los epítomos es información fundamental para el desarrollo de una vacuna, ya que la frecuencia de estos alelos en la población afectada determinará la potencial efectividad de una vacuna basada en linfocitos T. Se han podido establecer relaciones entre el desarrollo de distintas enfermedades infecciosas y en particular la presencia del alelo HLA-B*35. Entre algunos ejemplos se encuentra la asociación en pacientes HLA-B*35⁺ con el desarrollo de cardiomiopatía chagásica (Cruz-Robles y col, 2004); la asociación de pacientes HLA-B*35⁺ con infección crónica con HCV en la población coreana (Yoon y col, 2005); y la relación observada entre pacientes HLA-B*35⁺ infectados con HIV y la progresión a desarrollar SIDA(Síndrome de inmunodeficiencia adquirida) (Gao y col, 2001; Flores-Villanueva y col, 2003). En el caso de la infección con ANDV no existe asociación entre la evolución clínica hacia SCPH grave y la presencia del alelo HLA-B*35 (Ferrer y col, 2007). Sin embargo, solamente la presencia del alelo HLA-B*35 no significa que haya respuesta inmune frente a epítomos presentados por este alelo. En este contexto hay que mencionar que dentro de nuestros 75 pacientes estudiados 5 de ellos expresaban el alelo HLA-B*35 sin exhibir respuesta significativa contra ninguna de las proteínas

estudiadas (datos no mostrados). Por lo tanto, es posible que la combinación entre la presencia del alelo HLA-B*35 y la respuesta a epítomos restringidos por ella, pero no del alelo solamente, se asocie a la evolución clínica de la infección.

En general los epítomos restringidos a HLA-B*35 presentan una posición ancla en un residuo de prolina en la posición 2 y donde se encuentra un residuo aromático en la posición 8/9 (Abbas y Lichtman, 2003). De acuerdo con un estudio referente a la relación entre HLA y la progresión a desarrollar SIDA en pacientes HIV positivos, la restricción a HLA-B*35 de los epítomos puede ser separada en dos grandes subgrupos. Por una parte estarían los epítomos que presentan tirosina en la posición 8/9 restringidos por los denominados HLA-B*35 PY, que incluyen a los subtipos HLA-B*3501 y HLA-B*3508. Mientras que en otro grupo se encontrarían los que no presentan preferencia por algún aa en particular en la posición 8/9, denominados HLA-B*35 Px, que incluyen a los subtipos HLA-B*3502, HLA-B*3503, HLA-B*3504, y HLA-B*5301 (Gao y col, 2001). Este último alelo está incluido en los subgrupos de HLA-B*35 ya que presenta una relación filogenética con HLA-B*35 (McKenzie y col, 1999) y posee sitios de unión a péptido similares a los del subgrupo HLA-B*35 (Gao y col, 2001).

Las correlaciones entre enfermedades infecciosas y presencia de alelos específicos de HLA no son muy informativas en ausencia de la caracterización de la respuesta inmune asociada a la presencia de un alelo en particular. En un estudio del grupo que propone la subdivisión de HLA-B*35 Px y HLA-B*35 PY se encontró que altos niveles de linfocitos T CD8⁺ específicos contra la proteína gag de HIV contribuyen a la protección contra la progresión a desarrollar SIDA en pacientes con alelos HLA-B*35 PY, y no en pacientes con alelos HLA-B*35 Px (Jin y col, 2002). Este trabajo es uno de los pocos

disponibles donde se muestra el impacto de la respuesta de linfocitos T en la evolución clínica en pacientes HLA-B*35⁺.

A pesar de la importancia de esta clasificación de subtipos, en estudios en otras infecciones virales como CMV se han descrito que a diferencia de lo observado en individuos HLA-B*3501⁺, individuos HLA-B*3508⁺ pueden responder a epítomos que no presentan tirosina en posición 8/9 (Burrows y col, 2007). De hecho, en nuestro estudio el epítomo mínimo 466-MPDVAHSL-473 fue reconocido por subtipos de HLA-B*35 (ver resultados), pertenecientes a ambos grupos PY y Px. Esto sugiere que el epítomo 466-MPDVAHSL-473 actuaría como un epítomo "pan-HLA-B*35" y por lo tanto podría ser de importancia para una vacuna.

Uno de los aspectos cruciales a tener en consideración para el desarrollo de una vacuna, es la durabilidad de la respuesta inmune. Para poder estudiar la durabilidad de la respuesta inmune contra una infección viral es necesario que se cumplan dos condiciones. Primero, que la infección viral sea de carácter transiente, para que así no haya una reactivación de la respuesta inmune antiviral provocada por antígeno persistente. Luego el virus estudiado no debe llevar a infecciones repetitivas en la población afectada, ya que la re-infección intermitente con el virus a lo largo del tiempo, dificultaría la determinación de la longevidad real de la respuesta antiviral. Estas condiciones se cumplen en la infección con ANDV, dado que hasta la fecha no se ha descrito persistencia o re-infección en humanos.

En este estudio la durabilidad de la respuesta inmune específica contra G1 no deja de ser llamativa. Entre las tres proteínas estudiadas la proteína G1 es la única que muestra una tendencia a mantener una respuesta inmune elevada en el tiempo, mientras que en las respuestas inmunes para las proteínas N y G2 se observa un

decaimiento de la respuesta en el tiempo. Debido a que la respuesta contra estas dos últimas disminuye con el transcurso del tiempo, esto hace poco probable que la respuesta inmune elevada contra G1 sea producto de una reexposición al virus. Por otra parte la comparación de las secuencias G1 mediante BLASTp (Altschul y col, 1997), no determinó la existencia de algún antígeno que pudiera dar cuenta de una respuesta inmune cruzada de linfocitos T específicos contra G1₄₆₁₋₄₇₅ y que podría explicar la durabilidad selectiva de la respuesta en esta población. En nuestro estudio se lograron detectar linfocitos T específicos contra ANDV hasta 13 años post hospitalización. De la misma forma Van Epps y col encontraron respuesta inmune hasta 15 años post infección con PUUV (Van Epps y col, 2002). Aunque nuestro análisis croseccional sugiere una durabilidad de la respuesta contra G1, sería necesario realizar estudios longitudinales para evaluar al nivel individual la longevidad de la respuesta contra G1.

En términos del desarrollo de una vacuna, siempre hay que considerar la frecuencia de mutación del virus a combatir. Si bien es conocido que los virus de RNA presentan mutaciones con mayor frecuencia que los de DNA, las proteínas en hantavirus son conservadas entre las distintas cepas y presentan frecuencias de mutación dentro del rango de 10^{-3} a 10^{-4} mutaciones por par de bases nucleotídicas (Jonsson y col, 2005). Esto es comparable con otros virus de RNA como el bacteriófago Q β , el Poliovirus, y el virus de la estomatitis vesicular (Drake, 1993). Ahora en el caso particular de una vacuna basada en los epítomos altamente inmunogénicos descrito en el presente trabajo es importante conocer el grado de conservación que presenta el epítomo 466-MPDVAHSL-473 entre distintos hantavirus, porque deja estimar la utilidad de este epítomo para una vacuna que busca conferir inmunidad no solamente contra ANDV, pero contra varias cepas de hantavirus. Como se ve en la figura 14, el epítomo

detectado en ANDV es idéntico al presente en los virus Laguna Negra, Lechiguanas y Oran. En comparación con el resto de los hantavirus en la figura, la secuencia de ANDV presenta sólo dos posiciones no idénticas (posiciones 1 y 3), manteniendo la identidad de las posiciones ancla (posiciones 2 y 8) en las 13 secuencias alineadas. Incluso en cepas filogenéticamente distintas y causantes de FHSR, las diferencias entre las secuencias aminoacídicas no superan los 2 aa. Las diferencias en la secuencia puede influenciar la afinidad a la molécula de MHC, y por lo tanto el reconocimiento por linfocitos T de un epítipo, como fue descrito para EBV (Tynan y col, 2005). Esta influencia depende de si la sustitución es conservativa (residuos de aa del mismo tipo) o semiconservativa (residuos de aa de tipos distintos) (Chenna y col, 2003). Respecto a las posiciones no idénticas encontradas en el alineamiento del epítipo 466-MPDVAHSL-473 de ANDV (ver fig. 14), las diferencias se encuentran en las posiciones 1 y 3 y son de carácter semiconservativo (sustituciones de residuos de aminoácidos ácidos por residuos apolares). En contraparte las sustituciones en posición 8 son conservativas (sustituciones por residuos de aminoácidos del mismo tipo, en este caso apolares), por lo que estas sustituciones no tendrían mayor influencia en la afinidad del epítipo al unirse a la molécula de MHC. Estudios adicionales deberían enfocarse en detectar una respuesta inmune cruzada frente al epítipo 466-MPDVAHSL-473 en pacientes infectados con otras cepas de hantavirus causantes de SCPH. En caso de que exista reconocimiento de este epítipo y considerando la baja tasa de mutación del genero hantavirus, se sustentaría la importancia de este péptido en una vacuna.

Otra consideración que habría que tener en mente para el desarrollo de una vacuna basada en linfocitos T, es la frecuencia con la que se encuentra el alelo HLA-B*35 en la

población objetivo. En un estudio realizado sobre la población chilena que habita las zonas afectadas por ANDV, se encontró que la incidencia del alelo HLA-B*35 era en promedio un 25% (Ferrer y col, 2007; Llop, Comunicaciones personales 2007). La prevalencia promedio de este alelo de HLA es del 10,3% para individuos caucásicos (Marsh y col, 2000). En comparación el alelo más frecuente en la población caucásica es el HLA-A*2 con una frecuencia de 25,01% (Marsh y col, 2000). Debido a esto la mayoría de los estudios sobre la inmunidad celular frente a virus se enfocan en epítopos restringidos a HLA-A*2. Con esto en consideración podemos afirmar que el alelo HLA-B*35 en la población chilena que vive en la zona endémica de la infección por ANDV tiene la misma significancia que el alelo HLA-A*2 en la población caucásica general. Esto en conjunto con el alto grado de conservación del epítipo 466-MPDVAHSL-473 es un punto más a favor de que este péptido sea un buen candidato para formar parte de una vacuna de linfocitos T contra ANDV.

Este estudio no ofrece una revisión completa respecto a la respuesta inmune celular contra ANDV. Ensayos futuros podrían contemplar una caracterización fenotípica (CD27, CD28, CCR7) y funcional (IFN- γ , TNF- α y granzima B) acabada de los linfocitos T específicos para G1 mediante citometría de flujo. Esto ofrecería determinar las bases moleculares de la supervivencia de los linfocitos T CD8⁺ específicos y también determinar el potencial antiviral de aquellos linfocitos T en el tiempo.

En resumen, la determinación de regiones inmunodominantes y de epítopos de linfocitos T específicos contra ANDV en sobrevivientes de la infección, es un importante avance hacia el desarrollo de una vacuna contra la infección con ANDV.

11. Conclusiones

En resumen los datos expuestos en esta tesis confirman la existencia de regiones y epítomos inmunodominantes en las proteínas N y G1 de pacientes convalecientes a la infección con ANDV. Las frecuencias de linfocitos T que reconocen estos epítomos (entre el 0,011% y el 0,41% de las PBMC) son sorprendentemente altas comparadas con otras infecciones respiratorias virales como con virus de la influenza. Dentro de las respuestas estudiadas, las que presentaron las mayores frecuencias de linfocitos T específicos estaban limitadas a epítomos dentro de regiones acotadas de las proteínas N y G1. Sin embargo, la inmunodominancia de la región carboxilo terminal de G1 fue destacada y caracterizada con mayor detalle. En particular fue posible determinar el epítomo G1₄₆₁₋₄₇₅ como el epítomo inmunodominante, su restricción a HLA-B*35 y definir el epítomo mínimo 466-MPDVAHSL-473. A pesar de que no se realizaron estudios longitudinales para los distintos pacientes, el sólo hecho de detectar respuesta inmune contra G1 después de más de 13 años después de la infección sugiere que la respuesta inmune celular específica contra G1 es de larga duración. Al estudiar la durabilidad de la respuesta inmune específica contra cada proteína, se ve que la respuesta contra N y G2 tiende a decaer en el tiempo, mientras que la respuesta específica contra G1 se mantiene.

La restricción a HLA-B*35 del epítomo inmunodominante encontrado en G1 junto con la frecuencia elevada (25%) de este alelo en la población habitante de la región endémica de ANDV dan especial importancia al epítomo encontrado. Para determinar la significancia clínica y el potencial preventivo del epítomo G1₄₆₆₋₄₇₃ futuros estudios deberían evaluar la relación entre la respuesta de linfocitos T y la evolución clínica de los pacientes.

12. Bibliografía

- Abbas, A. K. y Lichtman, A. H. 2003. *Antigen Processing and Presentation to T Lymphocytes. En Cellular and Molecular Immunology.* p 98. Saunders, Philadelphia.
- Abbas, A. K. y Lichtman, A. H. 2003. *The Major Histocompatibility Complex. En Cellular and Molecular Immunology.* p 75. Saunders, Philadelphia.
- Abbas, A. K. y Lichtman, A. H. 2003. *Cytokines. En Cellular and Molecular Immunology.* p. 261 Saunders, Philadelphia.
- Alff, P. J., I. N. Gavrilovskaya, E. Gorbunova, K. Endriss, Y. Chong, E. Geimonen, N. Sen, N. C. Reich, and E. R. Mackow. 2006. The pathogenic NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail inhibits RIG-I- and TBK-1-directed interferon responses. *J Virol* 80:9676.
- Allen, S., S. Khan, F. Al-Mohanna, P. Batten, and M. Yacoub. 1998. Native low density lipoprotein-induced calcium transients trigger VCAM-1 and E-selectin expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 101:1064.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389.
- Araki, K., K. Yoshimatsu, B. H. Lee, H. Kariwa, I. Takashima, and J. Arikawa. 2003. Hantavirus-specific CD8(+)-T-cell responses in newborn mice persistently infected with Hantaan virus. *J Virol* 77:8408.
- Arikawa, J., A. L. Schmaljohn, J. M. Dalrymple, and C. S. Schmaljohn. 1989. Characterization of Hantaan virus envelope glycoprotein antigenic determinants defined by monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 70 (Pt 3):615.
- Asada, H., K. Balachandra, M. Tamura, K. Kondo, and K. Yamanishi. 1989. Cross-reactive immunity among different serotypes of virus causing haemorrhagic fever with renal syndrome. *J Gen Virol* 70 (Pt 4):819.
- Asada, H., M. Tamura, K. Kondo, Y. Okuno, Y. Takahashi, Y. Dohi, T. Nagai, T. Kurata, and K. Yamanishi. 1987. Role of T lymphocyte subsets in protection and recovery from Hantaan virus infection in mice. *J Gen Virol* 68 (Pt 7):1961.
- Bharadwaj, M., R. Nofchissey, D. Goade, F. Koster, and B. Hjelle. 2000. Humoral immune responses in the hantavirus cardiopulmonary syndrome. *J Infect Dis* 182:43.
- Bhattacharya, S., X. Ying, C. Fu, R. Patel, W. Kuebler, S. Greenberg, and J. Bhattacharya. 2000. alpha(v)beta(3) integrin induces tyrosine phosphorylation-dependent Ca(2+) influx in pulmonary endothelial cells. *Circ Res* 86:456.

- Borges, E., Y. Jan, and E. Ruoslahti. 2000. Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J Biol Chem* 275:39867.
- Burrows, J. M., K. K. Wynn, F. E. Tynan, J. Archbold, J. J. Miles, M. J. Bell, R. M. Brennan, S. Walker, J. McCluskey, J. Rossjohn, R. Khanna, and S. R. Burrows. 2007. The impact of HLA-B micropolymorphism outside primary peptide anchor pockets on the CTL response to CMV. *Eur J Immunol* 37:946.
- Burt, F. J., R. Swanepoel, W. J. Shieh, J. F. Smith, P. A. Leman, P. W. Greer, L. M. Coffield, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, C. J. Peters, and S. R. Zaki. 1997. Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 121:839.
- Center for Disease Control (CDC). 2006. Hantavirus pulmonary syndrome--five states, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 55:627.
- Chen, M., K. F. Hu, B. Rozell, C. Orvell, B. Morein, and P. Liljestrom. 2002. Vaccination with recombinant alphavirus or immune-stimulating complex antigen against respiratory syncytial virus. *J Immunol* 169:3208.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, and J. D. Thompson. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497.
- Cho, H. W., C. R. Howard, and H. W. Lee. 2002. Review of an inactivated vaccine against hantaviruses. *Intervirology* 45:328.
- Chu, Y. K., G. B. Jennings, and C. S. Schmaljohn. 1995. A vaccinia virus-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus. *J Virol* 69:6417.
- Clement, J., McKenna, P., y Van der Groen, G. 1998. *Hantaviruses. En Zoonoses: Biology, Clinical Practice, and Public Health Control*. Oxford University Press, Oxford.
- Conboy, I. M., D. Manoli, V. Mhaiskar, and P. P. Jones. 1999. Calcineurin and vacuolar-type H⁺-ATPase modulate macrophage effector functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6324.
- Crance, J. M., D. Gratier, J. Guimet, and A. Jouan. 1997. Inhibition of sandfly fever Sicilian virus (Phlebovirus) replication in vitro by antiviral compounds. *Res Virol* 148:353.
- Cruz-Robles, D., P. A. Reyes, V. M. Monteon-Padilla, A. R. Ortiz-Muniz, and G. Vargas-Alarcon. 2004. MHC class I and class II genes in Mexican patients with Chagas disease. *Hum Immunol* 65:60.

- Currier, J. R., E. G. Kuta, E. Turk, L. B. Earhart, L. Loomis-Price, S. Janetzki, G. Ferrari, D. L. Birx, and J. H. Cox. 2002. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 260:157.
- Custer, D. M., E. Thompson, C. S. Schmaljohn, T. G. Ksiazek, and J. W. Hooper. 2003. Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine. *J Virol* 77:9894.
- de Carvalho Nicacio, C., M. Gonzalez Della Valle, P. Padula, E. Bjorling, A. Plyusnin, and A. Lundkvist. 2002. Cross-protection against challenge with Puumala virus after immunization with nucleocapsid proteins from different hantaviruses. *J Virol* 76:6669.
- Drake, J. W. 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4171.
- Ennis, F. A., J. Cruz, C. F. Spiropoulou, D. Waite, C. J. Peters, S. T. Nichol, H. Kariwa, and F. T. Koster. 1997. Hantavirus pulmonary syndrome: CD8+ and CD4+ cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin Nombre virus nucleocapsid protein isolated during acute illness. *Virology* 238:380.
- Ferrer, P., Vial, P., Ferrés, M., Godoy, P., Cuiza, A., Marco, C., Castillo, C., Umaña, M., Rothhammer, F., Llop, E. 2007. Susceptibilidad genética a hantavirus Andes: Asociación entre la expresión clínica de la infección y alelos del sistema HLA en pacientes chilenos. *Rev Chil Infect* 24:351.
- Ferres, M., P. Vial, C. Marco, L. Yanez, P. Godoy, C. Castillo, B. Hjelle, I. Delgado, S. J. Lee, and G. J. Mertz. 2007. Prospective evaluation of household contacts of persons with hantavirus cardiopulmonary syndrome in Chile. *J Infect Dis* 195:1563.
- Flores-Villanueva, P. O., H. Hendel, S. Caillat-Zucman, J. Rappaport, A. Burgos-Tiburcio, S. Bertin-Maghit, J. A. Ruiz-Morales, M. E. Teran, J. Rodriguez-Tafur, and J. F. Zagury. 2003. Associations of MHC ancestral haplotypes with resistance/susceptibility to AIDS disease development. *J Immunol* 170:1925.
- Fournillier, A., E. Gerossier, A. Evlashev, D. Schmitt, B. Simon, L. Chatel, P. Martin, N. Silvestre, J. M. Balloul, R. Barry, and G. Inchauspe. 2007. An accelerated vaccine schedule with a poly-antigenic hepatitis C virus MVA-based candidate vaccine induces potent, long lasting and in vivo cross-reactive T cell responses. *Vaccine* 25:7339.
- Frahm, N., P. Kiepiela, S. Adams, C. H. Linde, H. S. Hewitt, K. Sango, M. E. Feeney, M. M. Addo, M. Lichterfeld, M. P. Lahaie, E. Pae, A. G. Wurcel, T. Roach, M. A. St John, M. Altfeld, F. M. Marincola, C. Moore, S. Mallal, M. Carrington, D. Heckerman, T. M. Allen, J. I. Mullins, B. T. Korber, P. J. Goulder, B. D. Walker, and C. Brander. 2006. Control of human immunodeficiency virus

- replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nat Immunol* 7:173.
- Gao, X., G. W. Nelson, P. Karacki, M. P. Martin, J. Phair, R. Kaslow, J. J. Goedert, S. Buchbinder, K. Hoots, D. Vlahov, S. J. O'Brien, and M. Carrington. 2001. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med* 344:1668.
- Gavrilovskaya, I. N., M. Shepley, R. Shaw, M. H. Ginsberg, and E. R. Mackow. 1998. beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7074.
- Hankins, D. G., and J. A. Rosekrans. 2004. Overview, prevention, and treatment of rabies. *Mayo Clin Proc* 79:671.
- Hayasaka, D., K. Maeda, F. A. Ennis, and M. Terajima. 2007. Increased permeability of human endothelial cell line EA.hy926 induced by hantavirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res* 123:120.
- Hooper, J. W., A. M. Ferro, and V. Wahl-Jensen. 2008. Immune serum produced by DNA vaccination protects hamsters against lethal respiratory challenge with Andes virus. *J Virol* 82:1332.
- Hooper, J. W., T. Larsen, D. M. Custer, and C. S. Schmaljohn. 2001. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 289:6.
- Jameson, J., J. Cruz, and F. A. Ennis. 1998. Human cytotoxic T-lymphocyte repertoire to influenza A viruses. *J Virol* 72:8682.
- Jin, X., X. Gao, M. Ramanathan, Jr., G. R. Deschenes, G. W. Nelson, S. J. O'Brien, J. J. Goedert, D. D. Ho, T. R. O'Brien, and M. Carrington. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8⁺-T-cell responses for groups of HIV-1-infected individuals with different HLA-B*35 genotypes. *J Virol* 76:12603.
- Jonsson, C. B., B. G. Milligan, and J. B. Arterburn. 2005. Potential importance of error catastrophe to the development of antiviral strategies for hantaviruses. *Virus Res* 107:195.
- Kaufmann, S. H. 2007. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat Rev Microbiol* 5:491.
- Kaufmann, S. H., and A. J. McMichael. 2005. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med* 11:S33.
- Kaukinen, P., A. Vaheri, and A. Plyusnin. 2005. Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambassadorial duties. *Arch Virol* 150:1693.

- Kilpatrick, E. D., M. Terajima, F. T. Koster, M. D. Catalina, J. Cruz, and F. A. Ennis. 2004. Role of specific CD8+ T cells in the severity of a fulminant zoonotic viral hemorrhagic fever, hantavirus pulmonary syndrome. *J Immunol* 172:3297.
- Kukkonen, S. K., A. Vaheri, and A. Plyusnin. 2005. L protein, the RNA-dependent RNA polymerase of hantaviruses. *Arch Virol* 150:533.
- Kuzushima, K., M. Yamamoto, H. Kimura, Y. Ando, T. Kudo, I. Tsuge, and T. Morishima. 1996. Establishment of anti-Epstein-Barr virus (EBV) cellular immunity by adoptive transfer of virus-specific cytotoxic T lymphocytes from an HLA-matched sibling to a patient with severe chronic active EBV infection. *Clin Exp Immunol* 103:192.
- La Rosa, C., R. Krishnan, S. Markel, J. P. Schneck, R. Houghten, C. Pinilla, and D. J. Diamond. 2001. Enhanced immune activity of cytotoxic T-lymphocyte epitope analogs derived from positional scanning synthetic combinatorial libraries. *Blood* 97:1776.
- Lambert, P. H., M. Liu, and C. A. Siegrist. 2005. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? *Nat Med* 11:S54.
- Lee, K. Y., E. Chun, N. Y. Kim, and B. L. Seong. 2002. Characterization of HLA-A2.1-restricted epitopes, conserved in both Hantaan and Sin Nombre viruses, in Hantaan virus-infected patients. *J Gen Virol* 83:1131.
- Lober, C., B. Anheier, S. Lindow, H. D. Klenk, and H. Feldmann. 2001. The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. *Virology* 289:224.
- Lum, H., J. L. Aschner, P. G. Phillips, P. W. Fletcher, and A. B. Malik. 1992. Time course of thrombin-induced increase in endothelial permeability: relationship to Ca²⁺ and inositol polyphosphates. *Am J Physiol* 263:L219.
- Mackow, E. R., and I. N. Gavrillovskaya. 2001. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 256:91.
- Maeda, K., K. West, T. Toyosaki-Maeda, A. L. Rothman, F. A. Ennis, and M. Terajima. 2004. Identification and analysis for cross-reactivity among hantaviruses of H-2b-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes in Sin Nombre virus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 85:1909.
- Maes, P., J. Clement, I. Gavrillovskaya, and M. Van Ranst. 2004. Hantaviruses: immunology, treatment, and prevention. *Viral Immunol* 17:481.
- Marsh, S., Parham, P., Barber, L.D. 2000. HLA-B. *En The HLA FactsBook*. Academic Press, San Diego.

- McClain, D. J., P. L. Summers, S. A. Harrison, A. L. Schmaljohn, and C. S. Schmaljohn. 2000. Clinical evaluation of a vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine. *J Med Virol* 60:77.
- McElroy, A. K., J. M. Smith, J. W. Hooper, and C. S. Schmaljohn. 2004. Andes virus M genome segment is not sufficient to confer the virulence associated with Andes virus in Syrian hamsters. *Virology* 326:130.
- McKenzie, L. M., J. Pecon-Slattery, M. Carrington, and S. J. O'Brien. 1999. Taxonomic hierarchy of HLA class I allele sequences. *Genes Immun* 1:120.
- Meissner, J. D., J. E. Rowe, M. K. Borucki, and S. C. St Jeor. 2002. Complete nucleotide sequence of a Chilean hantavirus. *Virus Res* 89:131.
- Ministerio de Salud de Chile. 2007. Boletín Epidemiológico de hantavirus 12/12/07. <http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Hantavirus/Hantavirus.pdf>. visitado 15/12/07
- Mori, M., A. L. Rothman, I. Kurane, J. M. Montoya, K. B. Nolte, J. E. Norman, D. C. Waite, F. T. Koster, and F. A. Ennis. 1999. High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis* 179:295.
- Muranyi, W., U. Bahr, M. Zeier, and F. J. van der Woude. 2005. Hantavirus infection. *J Am Soc Nephrol* 16:3669.
- Nakamura, T., R. Yanagihara, C. J. Gibbs, Jr., H. L. Amyx, and D. C. Gajdusek. 1985. Differential susceptibility and resistance of immunocompetent and immunodeficient mice to fatal Hantaan virus infection. *Arch Virol* 86:109.
- Organización panamericana de la salud (PAHO). 2004. Número de casos y defunciones por síndrome pulmonar por hantavirus, región de las américas 1993-2004. <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/hantavirus-1993-2004.htm>. visitado el 20/09/07
- Ota, M. O., R. H., Brookes, P. C., Hill, P. K., Owiafe, H. B., Ibanga, S., Donkor, T., Awine, H., McShane and R.A. Adegbola. 2007. The effect of tuberculin skin test and BCG vaccination on the expansion of PPD-specific IFN-gamma producing cells ex vivo. *Vaccine*, 25(52), 8861-7.
- Padula, P. J., A. Edelstein, S. D. Miguel, N. M. Lopez, C. M. Rossi, and R. D. Rabinovich. 1998. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* 241:323.

- Park, J. M., S. Y. Cho, Y. K. Hwang, S. H. Um, W. J. Kim, H. S. Cheong, and S. M. Byun. 2000. Identification of H-2K(b)-restricted T-cell epitopes within the nucleocapsid protein of Hantaan virus and establishment of cytotoxic T-cell clones. *J Med Virol* 60:189.
- Pekosz, A., J. Phillips, D. Pleasure, D. Merry, and F. Gonzalez-Scarano. 1996. Induction of apoptosis by La Crosse virus infection and role of neuronal differentiation and human bcl-2 expression in its prevention. *J Virol* 70:5329.
- Peters, C. J., G. L. Simpson, and H. Levy. 1999. Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annu Rev Med* 50:531.
- Plyusnin, A., O. Vapalahti, and A. Vaheri. 1996. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 77 (Pt 11):2677.
- Rafferty, M. J., A. A. Kraus, R. Ulrich, D. H. Kruger, and G. Schonrich. 2002. Hantavirus infection of dendritic cells. *J Virol* 76:10724.
- Raymond, T., E. Gorbunova, I. N. Gavrilovskaya, and E. R. Mackow. 2005. Pathogenic hantaviruses bind plexin-semaphorin-integrin domains present at the apex of inactive, bent alphavbeta3 integrin conformers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1163.
- Ruusala, A., R. Persson, C. S. Schmaljohn, and R. F. Pettersson. 1992. Coexpression of the membrane glycoproteins G1 and G2 of Hantaan virus is required for targeting to the Golgi complex. *Virology* 186:53.
- Schmaljohn, C. S., Y. K. Chu, A. L. Schmaljohn, and J. M. Dalrymple. 1990. Antigenic subunits of Hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants. *J Virol* 64:3162.
- Schmaljohn, C. S., S. E. Hasty, and J. M. Dalrymple. 1992. Preparation of candidate vaccinia-vectored vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome. *Vaccine* 10:10.
- Schmaljohn, C. S. N., S. T. 2006. *Bunyaviridae. En Field's Virology*. Lippincott, Williams & Wilkins, Boston.
- Sen, N., A. Sen, and E. R. Mackow. 2007. Degrons at the C terminus of the pathogenic but not the nonpathogenic hantavirus G1 tail direct proteasomal degradation. *J Virol* 81:4323.
- Siber, G. R., C. Thompson, G. R. Reid, J. Almeida-Hill, B. Zacher, M. Wolff, and M. Santosham. 1992. Evaluation of bacterial polysaccharide immune globulin for the treatment or prevention of Haemophilus influenzae type b and pneumococcal disease. *J Infect Dis* 165 Suppl 1:S129.

- Spiropoulou, C. F., C. G. Albarino, T. G. Ksiazek, and P. E. Rollin. 2007. Andes and Prospect Hill hantaviruses differ in early induction of interferon although both can downregulate interferon signaling. *J Virol* 81:2769.
- St Jeor, S. C. 2004. Three-week incubation period for hantavirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 23:974.
- Taruishi, M., K. Yoshimatsu, K. Araki, M. Okumura, I. Nakamura, K. Kajino, and J. Arikawa. 2007. Analysis of the immune response of Hantaan virus nucleocapsid protein-specific CD8+ T cells in mice. *Virology* 365:292.
- Tuuminen, T., E. Kekalainen, S. Makela, I. Ala-Houhala, F. A. Ennis, K. Hedman, J. Mustonen, A. Vaehri, and T. P. Arstila. 2007. Human CD8+ T cell memory generation in Puumala hantavirus infection occurs after the acute phase and is associated with boosting of EBV-specific CD8+ memory T cells. *J Immunol* 179:1988.
- Tynan, F. E., D. Elhassen, A. W. Purcell, J. M. Burrows, N. A. Borg, J. J. Miles, N. A. Williamson, K. J. Green, J. Tellam, L. Kjer-Nielsen, J. McCluskey, J. Rossjohn, and S. R. Burrows. 2005. The immunogenicity of a viral cytotoxic T cell epitope is controlled by its MHC-bound conformation. *J Exp Med* 202:1249.
- Valdivieso, F., P. Vial, M. Ferres, C. Ye, D. Goade, A. Cuiza, and B. Hjelle. 2006. Neutralizing antibodies in survivors of Sin Nombre and Andes hantavirus infection. *Emerg Infect Dis* 12:166.
- Van Epps, H. L., C. S. Schmaljohn, and F. A. Ennis. 1999. Human memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses to Hantaan virus infection: identification of virus-specific and cross-reactive CD8(+) CTL epitopes on nucleocapsid protein. *J Virol* 73:5301.
- Van Epps, H. L., M. Terajima, J. Mustonen, T. P. Arstila, E. A. Corey, A. Vaehri, and F. A. Ennis. 2002. Long-lived memory T lymphocyte responses after hantavirus infection. *J Exp Med* 196:579.
- Wahl-Jensen, V., J. Chapman, L. Asher, R. Fisher, M. Zimmerman, T. Larsen, and J. W. Hooper. 2007. Temporal analysis of Andes virus and Sin Nombre virus infections of Syrian hamsters. *J Virol* 81:7449.
- Welsh, R. M., and R. S. Fujinami. 2007. Pathogenic epitopes, heterologous immunity and vaccine design. *Nat Rev Microbiol* 5:555.
- Woo, G. J., E. Y. Chun, K. H. Kim, and W. Kim. 2005. Analysis of immune responses against nucleocapsid protein of the Hantaan virus elicited by virus infection or DNA vaccination. *J Microbiol* 43:537.
- Yewdell, J. W. 2006. Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. *Immunity* 25:533.

Yoon, S. K., J. Y. Han, C. W. Pyo, J. M. Yang, J. W. Jang, C. W. Kim, U. I. Chang, S. H. Bae, J. Y. Choi, K. W. Chung, H. S. Sun, H. B. Choi, and T. G. Kim. 2005. Association between human leukocytes antigen alleles and chronic hepatitis C virus infection in the Korean population. *Liver Int* 25:1122.

Zaki, S. R., P. W. Greer, L. M. Coffield, C. S. Goldsmith, K. B. Nolte, K. Foucar, R. M. Feddersen, R. E. Zumwalt, G. L. Miller, A. S. Khan, and et al. 1995. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol* 146:552.

Zeier, M., M. Handermann, U. Bahr, B. Rensch, S. Muller, R. Kehm, W. Muranyi, and G. Darai. 2005. New ecological aspects of hantavirus infection: a change of a paradigm and a challenge of prevention--a review. *Virus Genes* 30:157.