UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

"Efectos comparados de las vacunas Agrippal® y Rotarix® sobre células mononucleadas humanas de sangre periférica."

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Químico Farmacobiología

PRESENTA

Jesica Figueroa Padilla

DIRECTOR DE TESIS

DC. Alain Raimundo Rodríguez Orozco

CO-ASESOR

DC. Sergio Gutiérrez Castellanos

CENTROS INVOLUCRADOS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLOGICAS "Dr. IGNACIO CHAVEZ" DE LA UMSNH

ICFAI

ENERO 2011

CONTENIDO

RESUMEN

1.-INTRODUCCIÓN…….. 1-2

1.1 LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA…….. 3-30

1.1.1 INMUNIDAD ADAPTATIVA…… 3-8

1.2. INMUNIZACIÓN ACTIVA Y PASIVA……... 9-10

1.3 MOLÉCULAS DE DIFERENCIACION (CD)..…….... 11-18

1.4 CITOMETRÍA DE FLUJO……..…… 19-20

1.5 VACUNACIÓN…….…. 21-23

1.6 INFLUENZA…….…… 24-27

1.7 ROTAVIRUS…….…… 28-30

2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA…… 31

3.-JUSTIFICACIÓN…… 32

4.-OBJETIVOS…….…… 33

5.-HIPÓTESIS…… 34

6.-MATERIALES Y MÉTODOS……..... 35-37

7.- VARIABLES…… 38

8.- PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO…….. 39

9.-RESULTADOS…… 39-47

10.-DISCUSIÓN…….. 48-54

11 .-CONCLUSIÓN…….. 55

BIBLIOGRAFÍA…….. 56-59

RESUMEN

Introducción: En la búsqueda de vacunas más eficaces que sean capaces de activar células inmunocompetentes y que induzcan un mínimo de efectos adversos.

Objetivo: Evaluar la respuesta celular inducida por Agrippal® y Rotarix®.

Materiales y Métodos: Se realizó por citometría de flujo una caracterización de la expresión de las moléculas CD3, CD19, CD45, CD16 y CD56 inducida por las vacunas Rotarix® y Agrippal® en células mononucleadas de humanos de sangre periférica de donantes sanos.

Resultados: Se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de CD45 cuando se uso una concentración de $6.66x10^3$ DICC de Rotarix® (p= 0.015) ó 0.3 µg/mL Agrippal® (p= 0.014). En las células estimuladas con Rotarix® se observó mayor IMF cuando estas fueron tratadas a una concentración de $6.66x10^3$ DICC, esta fue 4.3 veces mayor respecto a las células no tratadas. En cuanto a las células estimuladas con Agrippal® la MIF en células $CD45^+$ fue 5.1 veces mayor en células tratadas con 0.3 µg/mL que en células no tratadas. En las células estimuladas con Rotarix® se observó un aumento estadísticamente significativo (p=0.04), al incrementarse 4.4 veces el % de células que expresaron CD3/CD16+56 luego de ser tratadas con $1.33X10^4$ DICC/mL respecto a células no tratadas que incorporaron estos marcadores. En cuanto a las células estimuladas con Agrippal® el % de células CD3/CD16+56 fue 4.6 veces

mayor en células tratadas con 0.3 µg/mL que en células no tratadas. Aunque no fue estadísticamente significativo el aumento en el número de células $CD19^+$ y $CD16+56^+$ cuando las células mononucleadas se trataron con Agrippal® y Rotarix® si se encontró una tendencia a aumentar el número de células. Agrippal mostró un efecto mas potente sobre la inmunidad humoral que Rotarix® lo cual pudiera relacionarse con una respuesta más potente del huésped vacunado.

Conclusión: La proliferación de células $CD3^+$ $CD56^+$ debe analizarse en el contexto del perfil de eficacia y seguridad, al igual que las isoformas de CD45 que son inducidas luego de recibir ambas vacunas.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1 LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA

La capacidad de un individuo para mantenerse libre de infecciones depende tanto de su resistencia natural o inmunidad innata como de la resistencia que pueda desarrollar o adquirir durante su vida (inmunidad adquirida o adaptativa). (Rojas-Espinosa *et al*, 2001)

Al conjunto de células, tejidos y moléculas que median la resistencia a las infecciones se le denomina sistema inmune. Su función fisiológica es prevenir infecciones o erradicar las ya presentes. La importancia del sistema inmune para la salud es dramáticamente ilustrada en individuos con deficiencias en la respuesta inmune ya que son susceptibles a serias infecciones, las cuales pueden ser mortales. Las respuestas inmunitarias son producidas principalmente por los leucocitos, de los que existen varios tipos diferentes. Un importante grupo de leucocitos esta constituido por las células fagocitarias tales como los monocitos, los macrófagos y los neutrófilos polimorfonucleares, los cuales se unen a los microorganismos, los introducen en su interior y los destruyen, siendo estos la primera línea de defensa. (Roitt *et al*, 1994) (Abbas *et al*, 2009)

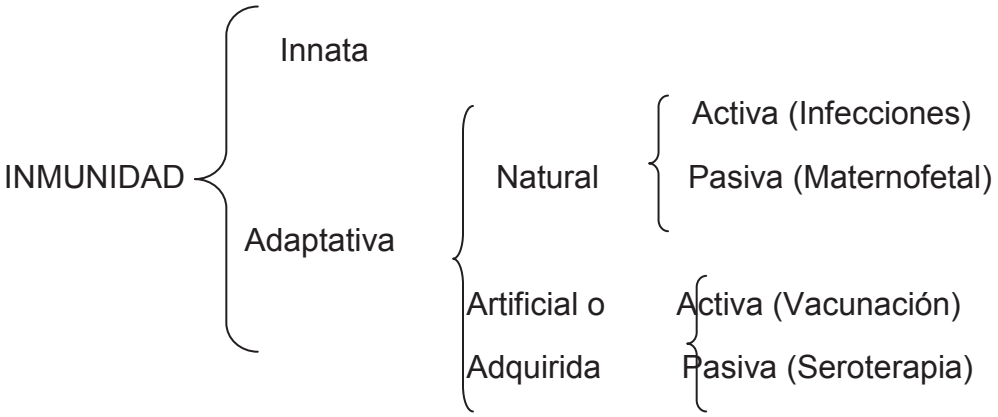

Fig. 1.- Tipos de inmunidad. (Rojas-Espinosa, 2001)

1.1.1 INMUNIDAD ADAPTATIVA

Los dos tipos de inmunidad adaptativa, la inmunidad humoral e inmunidad mediada por células, son reguladas por diferentes células y moléculas y están destinadas a proveer defensa en contra de microorganismos extracelulares e intracelulares respectivamente. La inmunidad humoral es mediada por proteínas llamadas anticuerpos, los cuales son producidos por los linfocitos B.

La inmunidad adaptativa se genera después del contacto con el agente infeccioso y es específica para el mismo. La respuesta no es inmediata, ya que requiere de algunos días para manifestarse e incluye la producción de anticuerpos y de linfocitos en un estado particular de activación como "linfocitos sensibilizados", que actúan por citotoxicidad directa o por la liberación de mediadores inespecíficos del antígeno. Las células y los anticuerpos resultantes tienen la propiedad de reaccionar específicamente con el antígeno inductor de su

producción, de aquí el término de inmunidad específica. La efectividad de la respuesta de un individuo a la estimulación antigénica depende de varios factores, entre ellos y de manera fundamental, del funcionamiento adecuado de su sistema inmunológico. (Rojas-Espinosa *et al*, 2001) (Stites *et al*, 1994)

Los anticuerpos son secretados a la circulación y mucosas, para neutralizar y eliminar microbios y toxinas microbianas presentes en el exterior de las células del huésped y en la sangre así como en las mucosas de los órganos y en los tractos gastrointestinal y respiratorio, lo anterior con el objetivo de impedir que los microbios que se encuentran en las mucosas y en la sangre tengan acceso y colonicen las células del huésped y el tejido conectivo (Enshell-seijffers *et al*, 2001).

Los anticuerpos no tienen acceso a los microbios que viven y se dividen dentro de las células infectadas. A la defensa en contra de microbios intracelulares se le denomina inmunidad mediada por linfocitos T. La inmunidad celular es esencial y se le considera la principal arma del sistema inmunológico para la eliminación de patógenos intracelulares como los virus. (Enshell-seijffers *et al*, 2001) Algunos linfocitos T activados fagocitan y destruyen microbios que están siendo ingeridos por los fagocitos dentro de vesículas intracelulares. Otros linfocitos T matan todo tipo de células hospederas que estén infectadas por microbios en el citoplasma. Los anticuerpos producidos por los linfocitos B reconocen los antígenos microbianos extracelulares, mientras que los linfocitos T reconocen antígenos producidos por los microbios intracelulares. Otra diferencia

importante entre los linfocitos T y B es que la mayoría de células T reconocen antígenos proteínicos, mientras que los anticuerpos son capaces de reconocer muchos diferentes tipos de moléculas, incluyendo proteínas, carbohidratos y lípidos. La inmunidad mediada por células es fácilmente transmisible por transferencia de células, pero no lo es por transferencia del suero. (Abbas *et al*, 2009) (Stites *et al*, 1994). Las dos características claves de respuesta este tipo de inmunidad son la especificidad y la memoria. (Roitt *et al*, 1994)

Los linfocitos tienen receptores específicos para antígenos y como se mencionó anteriormente, son los mediadores clave de la inmunidad adaptativa. Aunque todos los linfocitos son morfológicamente similares, son extremadamente heterogéneos en linaje, función y fenotipo. Son capaces de llevar a cabo actividades y respuestas biológicas complejas. Un adulto normal contiene aproximadamente 10^{12} linfocitos en la circulación y tejidos linfoides. (Abbas et al, 2009).

LINFOCITOS B: Las células B maduras pueden expresar inmunoglobulinas en dos formas diferentes y cada una sirve para funciones únicas en compartimientos de mucosas en las secreciones y en sangre. En los linfocitos B en reposo las inmunoglobulinas se expresan solo en la superficie de las células, donde sirven como receptores para antígenos específicos. En contraste las células B efectoras se especializan únicamente en secretar grandes cantidades de inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas secretadas tienen la habilidad de reconocer y unirse a sus ligandos específicos y son a menudo llamados "anticuerpos".

LINFOCITOS T: Estos linfocitos no expresan inmunoglobulinas sino que detectan la presencia de sustancias externas por medio de unas proteínas de superficie denominadas receptores de células T (TCR). Estos receptores al igual que las inmunoglobulinas tienen la capacidad de detectar antígenos. Los receptores de células T no son secretados, y por tanto ejercen sus efectos protectores a través del contacto directo con un blanco o por la influencia de la actividad de otras células inmunes. (Stites *et al*, 1994)

CELULAS NK (NATURAL KILLER): Estas células son una clase de linfocitos que reconocen células infectadas por virus o células tumorales y las eliminan a través de la secreción de citocinas que aumentan su actividad citotóxica como IFN-γ, la cual es una citocina activadora de macrófagos. Las células NK conforman aproximadamente 10% de los linfocitos en la sangre y órganos linfoides periféricos. Estas células participan en la defensa del huésped durante ciertas infecciones virales y lesiones malignas. Las células NK pueden ayudar a proteger en contra de un amplio número de agentes infecciosos, posiblemente actuando como defensa de primera línea que opera antes de que una respuesta específica pueda ser montada por las células T y B. Muchos anticuerpos monoclonales están disponibles para detectar receptores presentes en la superficie de células NK como Fc (CD16) o antígenos específicos de diferenciación (CD56 y CD57). Las células NK no expresan en su superficie el complejo TCR-CD3. (Stites *et al*, 1994) (Abbas *et al*, 2009)

1.2. INMUNIZACIÓN ACTIVA Y PASIVA

La inmunización activa implica la administración de todo un microorganismo o parte de él, o de un producto modificado de ese microorganismo (toxoide, antígeno purificado o antígeno producido por ingeniera genética) para provocar una respuesta inmunológica que simule la de la infección natural pero que, por lo general, conlleva escaso o ningún riesgo para el receptor, ya que solo se expone al mismo a formas no patogénicas de los microbios. La inmunización puede conferir actividad antitoxina, antiinvasora o neutralizante, u otros tipos de respuestas humorales o celulares protectoras en el receptor. Algunos agentes inmunizantes brindan protección casi completa contra la enfermedad durante toda la vida y otros se deben volver a administrar con intervalos regulares para mantener la protección. (Pickering *et al*, 2007) (Abbas *et al*, 2009)

La inmunización pasiva implica la administración de anticuerpos preformados a un receptor. Está indicada en las siguientes circunstancias generales para prevenir o tratar enfermedades infecciosas:

- Cuando los individuos presentan síntesis deficientes de anticuerpos debido a defectos congénitos o adquiridos de los linfocitos B, solos o en combinación con otras inmunodeficiencias.

- Con fines profilácticos, cuando una persona susceptible a una enfermedad está expuesta o tiene alta probabilidad de exposición a esa infección, sobre

todo si corre alto riesgo de complicaciones de la enfermedad o si el tiempo no permite una protección adecuada únicamente con inmunización activa .

- Con fines terapéuticos, cuando ya se presentó la enfermedad, los anticuerpos pueden mejorar o ayudar a suprimir los efectos de una toxina o suprimir la respuesta inflamatoria.

Se ha logrado la inmunización pasiva con varios tipos de productos. La elección depende de los tipos de productos existentes, el tipo de anticuerpo deseado, la vía de administración y otras consideraciones. Estos productos son inmunoglobulinas (IG) y preparados de inmunoglobulinas especificas ("hiperinmunes") para administración intramuscular (IM), inmunoglobulina intravenosa (IGIV), inmunoglobulina especifica (hiperinmune) administrada por vía intravenosa (IV) y anticuerpos de origen animal y monoclonales. (Pickering *et al*, 2007)

1.3 MOLÉCULAS DE DIFERENCIACION (CD)

Estas moléculas se encuentran en la superficie celular y ejercen diversas funciones, actúan como enzimas o como receptores para virus, para proteínas del complemento o para moléculas de adhesión, participan en las interacciones de las células del sistema inmune, definen poblaciones y subpoblaciones celulares, se comportan como receptores hormonales o se expresan en las diversas fases del ciclo de activación celular. (Stites *et al*, 1994)

Los linfocitos a menudo se identifican por estas proteínas de superficie, las cuales pueden ser detectadas usando paneles de anticuerpos monoclonales. La nomenclatura estándar para estas proteínas es la designación numérica de los CD's (Cluster of Differentiation) que son grupos de diferenciación, la cual se usa para reconocer las proteínas de superficie que definen un particular tipo de células o estado de diferenciación celular y son reconocidos por un grupo de anticuerpos. (Abbas et al, 2009) (Sampalo Lainz *et al*, 1992)

Tabla 1. Clasificación de los grupos de diferenciación (CD) antigénica de las células hematopoyéticas humanas (Sampola-Lainz *et al*, 1992)

ESPECIFICIDAD CELULAR	NÚMERO DE GRUPOS	CD-CORRESPONDIENTE

Linfocitos T	12 CD	CD1-CD8,CD27-CD29,CDw60
Linfocitos B	17 CD	CD19-CD24,CD37-CD40 CD72-CDw78
Células NK y linaje no especifico	20 CD	CD11a-CD11b-CD11c,CD16-CD18-CD32-CD43-CDw50-CDw52-CD59
Antígenos de activación	6 CD	CD25,CDw26,CD30,CD69-CD71
Plaquetas	10 CD	CD9,CD31,CD36,CD41a,CD41b CD42,CDw49a,b,c,d,e,f,CD51 CD61-CD63
Monocitos y Dendríticas	11 CD	CD13-CD15,CD33-CD35 CD64-CD68

Tabla 2. Algunos de los marcadores de activación y proliferación de células mononucleadas. (Kroese *et al*, 1998 y Abbas *et al*, 2009)

ANTIGENOS	ESTRUCTURA MOLECULAR / LIGANDOS	DISTRIBUCION DE ANTIGENO	FUNCIONES

CD3	Complejo molecular asociado a receptor heterodimero αβ o γδ de células T/ Superfamilia de la Ig	a)Expresión en la mayoría de células Marcador de desarrollo y de cambios en el nivel de expresión del antígeno durante diferenciación y maduración del linaje.	Transducción de señales; forma parte del complejo-receptor de células T (TCR)
CD16 (FcγRIII)	Isoformas múltiples; proteína transmembranal / IgG	a) En la mayoría de las NK. b) En subconjuntos de granulocitos. c) En subconjuntos de monocitos/macrófagos. Marcador de desarrollo (cambios en el nivel de expresión del antígeno durante diferenciación y maduración del linaje)	Fagocitosis y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.
CD19 (B4)	Superfamilia de las Ig.	Mayoría de las células B	Regula el desarrollo, activación y diferenciación de células B; forma un complejo co-receptor con CD21 y CD81 que comunica señales que sinergizan con las señales del complejo receptor de antígenos de las células B
CD25 (IL-2Rα; TAC)	Glucoproteína transmembranal tipo I.	a) En la mayoría de linfocitos B y T, NK, Monocitos/ Macrófagos. Dependiente de la activación (cambios de nivel de expresión en células activadas). b) Subconjuntos de	Receptor de IL-2, Activación y proliferación de células T

		células dendríticas.	
CD45 [Antigeno común de leucocitos (LCA), RT7]	Isoformas múltiples, proteína transmembranal ; familia de proteínas tirosina fosfatasas	En la mayoría de linfocitos B y T, NK, Monocitos/ Macrófagos, granulocitos y células dendríticas.	Transducción de señales; Diferenciación y activación de células; a través de su actividad de tirosina fosfatasa
CD56 (N-CAM)	Isoformas múltiples; Superfamilia Ig	NK no restringidas por MHC, células T	Adhesión; Desarrollo del SNC.

El antígeno CD3 está compuesto por al menos 5 cadenas polipeptidícas invariantes (γ, δ, ε, ζ, y η) y está asociado a cualquiera de los heterodímeros α/β o γ/δ como parte del complejo-receptor de células CD3-T (TCR). El CD3 lo expresan solo las células del linaje T tal como las células T maduras y subpoblaciones de timocitos. Aproximadamente del 65-75% de los linfocitos en sangre periférica son $CD3^+$ en adultos, aunque el porcentaje en niños es bajo y está relacionado a la edad. (BECKMAN COULTER).

El antígeno CD16 (FcγRIII) es un receptor de baja afinidad para la porción Fc de la IgG. Este receptor se expresa comúnmente en muchas células NK, así como en varias otras células inmunes, como los neutrófilos y monocitos. El antígeno CD16 se caracteriza por su papel en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La estimulación de las células NK a través de CD16 también da lugar a la producción de varias citocinas que incluyen al IFN-γ y al TNF-α. (Björkström *et al*, 2008)

El antígeno CD19 es una glucoproteína integral de membrana tipo I de cadena simple con un peso molecular de 95 kDa. El CD19 es indicativo de una expresión completa del linaje de las B, desde células tempranas pre-B hasta linfocitos B maduros. Esta expresión se pierde durante la maduración de estas células a células plasmáticas. El antígeno CD19 se expresa también en la membrana de células dendríticas foliculares. En contraste, la expresión de CD19 no se observa en linfocitos T, células NK, monocitos y granulocitos. CD19 es una molécula importante para la transducción de señales de activación en el linfocito B. Entre el 10 y el 15.5% de los linfocitos son CD19+. (BECKMAN COULTER)

El antígeno común leucocitario (CD45) es una proteína tirosina-fosfatasa transmembranal de la superficie celular específica de leucocitos.. Tiene un peso molecular de 180 a 220 kDa. El empalme diferencial de los exones 4, 5 y 6 del RNAm que codifica para esta proteína genera al menos 5 isoformas de CD45 las cuales se pueden identificar con anticuerpos específicos. Las proteínas de la familia CD45 se expresan en la superficie de todas las células hematopoyéticas nucleadas y desempeñan un importante papel regulatorio en la activación de células. La densidad de la expresión de CD45 en linfocitos es relativamente constante y excede la densidad encontrada en células mielo-monociíticas. La proteína CD45 es fundamental para una eficiente transducción de señales a través de los receptores de antígenos de células T y B. En las células T, CD45 desfosforila el sitio regulador negativo de la Lck (tirosina cinasa específica de leucocitos), la cual es un miembro de la familia Src de tirosina cinasas y que es

responsable de la fosforilación de CD3 y del inicio de la cascada de señalización del receptor de células T (TCR). Aunque CD45 es mejor conocido por su capacidad para regular cinasas específicas de la familia Src en los leucocitos, también ha sido implicado en la regulación de las proteínas cinasas Jak que median la señalización por citocinas. Los ratones y seres humanos que no expresan CD45 se ven gravemente inmunosuprimidos debido a que esto provoca que haya muy pocos linfocitos T periféricos y pobres respuestas de células B y T resultado del desarrollo de células T defectuosas atribuibles a señalización ineficiente pre-TCR y TCR. (Tchilian *et al*, 2004) (Cross et al, 2008)(BECKMAN COULTER)

El antígeno CD56 (NKH1) es una molécula de 200-220 kDa. que se expresa en una subpoblación de linfocitos de sangre periférica que muestra una citotoxicidad no restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad. CD56 reacciona con la mayoría de las NK y también con subpoblaciones de células T $CD3^+$ que representan menos del 5% de linfocitos de sangre periférica en individuos normales y sme relaciona con actividad citotoxica. El anticuerpo contra CD56 no reacciona con otras poblaciones de linfocitos B o T, monocitos, granulocitos o eritrocitos. Más del 95% de células capaces de mediar espontáneamente la citotoxicidad no restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad en sangre periférica está contenida en el 10-12% de linfocitos de sangre periférica que expresan NKH1 en individuos normales. El anticuerpo contra NKH1 reacciona unas 2 o 3 veces más con linfocitos de sangre periférica

en adultos jóvenes que en ancianos. (BECKMAN COULTER). Algunas células T $CD56^+$ poseen características adicionales claramente no encontradas en prototipos de células NK o células T, lo que ha sugerido un fenotipo intermedio entre estos dos linajes celulares. (Saikh et al, 2003)

Un pequeño pero significativo número de células T CD56 se convierten en células dendríticas en respuesta a la incubación con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Se ha reportado que los receptores del GM-CSF se expresan a niveles bajos o moderados en las células madre hematopoyéticas más primitivas pero están ausentes en las células progenitoras linfoides comunes, aunque no se dispone de datos equivalentes en humanos. (Kondo *et al*, 2000) (Saikh et al, 2003)

1.4 CITOMETRÍA DE FLUJO

Una de las técnicas que más se utiliza en el estudio de poblaciones de células de sangre periférica es la citometría de flujo. La citometría de flujo mide características ópticas y de fluorescencia de células individuales (o cualquier otra partícula, incluyendo núcleos, los microorganismos, preparaciones de cromosomas, y gotas de látex). Las propiedades físicas, tales como el tamaño (representado por la dispersión de la luz hacia adelante ángulo) y complejidad interna (Representado por la dispersión en ángulo recto) puede determinar ciertas poblaciones celulares. Además, los anticuerpos conjugados con colorantes fluorescentes pueden unirse a proteínas específicas en las membranas celulares o en el interior de las células.

Cuando las células marcadas se pasan por una fuente de luz, las moléculas fluorescentes se excitan y pasan a un estado de energía más alto. Al regresar a su estado de reposo, los fluorocromos emiten energía de luz en longitudes de onda mayores. Con el uso de fluorocromos múltiples, cada uno son excitados con similares longitudes de onda preestablecidas y diferentes longitudes de onda de emisión (o "colores"), es posible que varias propiedades de células se midan al mismo tiempo.

Dentro de un citómetro de flujo, las células en suspensión se dibujan en una corriente creada por una envoltura de un liquido isotónico que crea un flujo laminar, permitiendo que las células pasen individualmente a través de un punto de “interrogatorio”. En el punto interrogatorio, un haz de luz monocromática, por lo general de un láser, cruza las células. La luz emitida se desprende en todas las direcciones y se recoge a través de un sistema óptico que dirige la luz a una serie de filtros y espejos dicroicos que aislan particular, las bandas de longitud de onda. Las señales luminosas se detectan por los tubos fotomultiplicadores y son digitalizados por un análisis de computadora. (Bakke *et al*, 2000, Brown *et al*, 2000)

La combinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales con un sistema de detección óptica altamente sensible, aunado a la capacidad procesadora de las computadoras, ha brindado un impacto considerable a la citometría de flujo moderna en la medicina clínica. Esto ha sido particularmente importante en la fenotipificación de las subpoblaciones de linfocitos T durante diferentes

enfermedades, (Razo et al, 1996) y la medición de las respuestas a preparados biológicos como vacunas.

1.5 VACUNACIÓN

Las vacunas que incorporan un agente infeccioso intacto pueden incorporar microorganismos vivos (atenuados) o muertos (inactivados). Las vacunas contra algunos virus y la mayoría de las bacterias son preparados inactivados (muertos), hechos de subunidades (componentes purificados) o toxinas inactivadas o proteínas activas conjugadas en forma química o inmunológica. (Pickering *et al*, 2007)

Varios tipos de vacunas ya están en uso y otras están en desarrollo. Una de las vacunas más efectivas está compuesta por microorganismos atenuados, los cuales son tratados para abolir su infectividad y patogenicidad mientras mantienen su antigenicidad. La inmunización con microorganismos atenuados estimula la producción de anticuerpos neutralizantes en contra de antígenos microbianos que protege al individuo vacunado de infecciones posteriores. Las vacunas compuestas por proteínas microbianas y polisacáridos, llamadas vacunas de

subunidades, actúan de la misma manera. Algunos antígenos de polisacáridos microbianos, los cuales no pueden estimular células Th, se acoplan químicamente a proteínas. Estos conjugados estimulan la activación de células Th y la producción de anticuerpos de alta afinidad en contra de los polisacáridos. A estos preparados se les denomina vacunas conjugadas. La inmunización con toxinas microbianas inactivadas y con proteínas microbianas sintetizadas en el laboratorio, estimulan anticuerpos que se unen a y neutralizan a las toxinas y a los microorganismos.

Tabla 3. Mecanismos de protección de los diferentes tipos de vacunas. (Tomado de Abbas *et al*, 2009)

TIPO DE VACUNA	FORMA DE PROTECCION
Bacterias vivas atenuadas o muertas.	Respuesta de anticuerpos
Virus vivos atenuados.	Respuesta de anticuerpos; respuesta inmune mediada por células
Vacunas de subunidades (antígenos).	Respuesta de anticuerpos
Vacunas conjugadas	Respuesta de anticuerpos

	dependiente de células
Vacunas sintéticas	Respuesta de anticuerpos
Vectores virales	Respuesta inmune humoral y mediada por células
Vacunas de ADN	Respuesta inmune humoral y mediada por células

Un terreno en el que los estudios inmunológicos han encontrado aplicación inmediata con buenos resultados ha sido el de la vacunación. Los principios de la vacunación se basan en dos puntos clave de inmunidad adaptativa mencionados anteriormente: especificidad y memoria. Las células de memoria permiten al sistema inmunitario desarrollar una respuesta mucho más potente en el segundo encuentro con el mismo antígeno. El objetivo al desarrollar una vacuna es el de alterar al agente patógeno o sus toxinas, de tal modo que resultan inocuos, pero sin que pierdan su antigenicidad. Esto es posible debido a que los anticuerpos y las células T reconocen determinadas partes de los antígenos (epítopos) y no la totalidad del microorganismo o de la toxina. (Roitt *et al*, 1994)

La estrategia de vacunación actual, se enfoca principalmente en la prevención y el control de las enfermedades y esto tiene beneficios tanto a nivel comunidad como individual. Se calcula que la vacunación evita dos millones de

muertes infantiles cada año. Por ello se considera que es la medida que mas ha influido en la salud humana, quizás con la única excepción de la disponibilidad de agua potable, superando aun en importancia a la introducción de los antibióticos y a los progresos en las disciplinas quirúrgicas. (Pickering *et al*, 2007). (Durando *et al*, 2008)

1.6 INFLUENZA

Los virus de la influenza contienen ARN y pertenecen a la familia de los orthomyxoviridae. Existen tres serotipos: A, B y C. Estos virus son pleomórficos, de 80 a 120 nm, de simetría helicoidal, con genoma de ARN segmentado de cadena sencilla negativa, fragmentado (ocho fragmentos en A y B, y siete en C), empaquetado por la nucleoproteína (NP). Presentan una alta tasa de variación y todos los virus de influenza presentan una envoltura formada por una bicapa lipídica con composición similar a la membrana de las células que infectan. De la envoltura se proyectan proteínas transmembranales, con funciones importantes: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Las dos son glucoproteínas, cuyas diferencias antigénicas definen a los grupos virales. La tercera proteína de membrana es la proteína M, la cual estabiliza la envoltura durante la maduración del virus. La nucleocápside está constituida por el genoma viral (ARN), proteínas de empaquetamiento y nucleoproteínas. (Leal Quevedo *et al*, 2004) (Pérez *et al*, 2010)

Recientemente, el nuevo virus de la influenza A de origen-porcino (H1N1) fue identificado como la causa de un gran número de enfermedades febriles respiratorias en México y en Estados Unidos. La enfermedad se extendió rápidamente a muchos países en todo el mundo, provocando que la organización Mundial de la Salud (OMS) declarara una pandemia el 11 de junio de 2009. Un método importante de control de esta pandemia será la inmunización a gran escala. (Feng-Cai Zhu *et al*, 2009)

Además de los altos costos sociales de la influenza (ausentismo, la atención que requiere, etc), en algunos casos puede darse lugar a una neumonía secundaria bacteriana o viral y puede agravar condiciones médicas subyacentes, en última instancia, con consecuencias fatales. Las enfermedades relacionadas con la influenza causan unas 100,000 hospitalizaciones y decenas de miles de muertes en los Estados Unidos anualmente (Chua *et al*, 2009).

La vacunación es el principal medio de protección contra la enfermedad causada por la influenza y se recomienda para personas de edad avanzada, inmunosuprimidos, para las personas potencialmente expuestas (multitudes, transporte públicos, etc) o que puedan transmitir la influenza a un grupo de alto riesgo (trabajadores de salud, etc). Tres tipos de vacunas inactivadas se utilizados en todo el mundo para proteger contra la influenza: vacunas de virión completo, vacunas de virión fraccionado que contienen componentes internos y externos del virus, y las vacunas de sub-unidades, compuestas sólo de los componentes externos del virus (Hemaglutinina y Neuraminidasa). Se ha propuesto que la gran

pureza que posee este último tipo de vacunas debe conferirles menos reactogenicidad y mejor tolerancia. (Morales *et al*, 2003)

La efectividad de las vacunas inactivadas depende de la edad, la inmunocompetencia del receptor y el grado de similitud entre las cepas de los virus vacunales con los que están circulando en ese momento. Cuando existe un buen grado de similitud con los virus circulantes, la vacunación previene de las enfermedades a un alto número de individuos que pertenecen a grupos de alto riesgo. (Leal Quevedo *et al*, 2004)

Los resultados de un estudio reciente mostraron que las actuales vacunas disponibles de subunidades contra la influenza, con adyuvante MF59 y sin adyuvante como Agrippal® S1, no presentaron efectos adversos preocupantes durante todo el seguimiento del estudio, lo que confirma el excelente perfil de seguridad de Agrippal®, y su inmunogicidad tanto para adultos sanos, como infectados con el VIH-1. (Durando *et al*, 2008)

La vacuna Agrippal® S1 está constituida por los antígenos de superficie altamente purificados de mixovirus de la influenza de los tipos A y B, cultivados en embrión de pollo e inactivados mediante tratamiento con formaldehído. El virus de la influenza ese concentra y purifica a través de separación molecular diferenciada mediante centrifugación zonal en gradiente de sacarosa y ultrafiltración. Los antígenos inmunológicamente activos, hemaglutinina y neuraminidasa son extraídos del virus de la influenza o gripe mediante tratamiento con bromuro de

cetiltrimetilamonio. El contenido de antígeno se estandariza en mcg de hemaglutinina viral, de acuerdo con el material de referencia que distribuye cada año la OMS. Las cepas incluidas varían cada año de acuerdo con las recomendaciones dadas anualmente por la MS, (Tipo A: A/New Caledonia/20/99 [H1N1]-Like virus Tipo A: A/Moscow/10/99 [H3N2]-Like virus Tipo B: B/Hong Kong/330/2001 - a B Victoria-Like virus) (Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l.)

La respuesta inmune innata, es rápida pero no considera un antígeno específico, proporciona una primera línea de defensa contra las infecciones viral e influye en la respuesta posterior adaptativa de las células T.

Se cree que tanto la respuesta inmune celular, la respuesta innata de las células NK, así como la respuesta adaptativas de células T juegan un papel fundamental en la infección por virus de la influenza; sin embargo, estas conjeturas se basan principalmente en estudios realizados en modelos animales. Pocos estudios sistemáticos de la inmunidad celular contra el virus de la influenza se han realizado en el humano, especialmente en niños pequeños.

En un estudio realizado en voluntarios humanos con el virus de la influenza de tipo nativo, se encontró que la infección causa un aumento significativo de la actividad de las células NK. A pesar de la importancia de la inmunidad innata en la defensa del huésped contra la infección viral, la mayoría de los estudios inmunológicos previos de vacunas contra la influenza se han centrado en la inmunidad adaptativa, es decir, de células B y las respuestas de células T, y rara

vez en la inmunidad innata. Existen pocos estudios sobre la respuesta de las células NK para las vacunas inactivadas contra influenza. Una mayor citotoxicidad de células NK se ha relacionado con la vacunación en algunos estudios, pero en otros no. (Vogt *et al*, 2008)

1.7 ROTAVIRUS

El rotavirus es un virus icosaédrico en la familia Reoviridae. La cápside viral es de triple capa, la capa interna (núcleo) contiene el genoma del virus, un total de 11 segmentos de ARN de doble cadena, cada uno de codificación para los productos que son proteínas virales estructurales (VP) o proteínas no estructurales (NSP). Las principales propiedades antigénicas del grupo, subgrupo y serotipo del rotavirus están determinadas por las proteínas de la cápside viral. La mayoría de los rotavirus tiene siete grandes grupos (A-G); las cepas humanas pertenecen al grupo A, aunque los grupos B y C han sido asociados ocasionalmente con las enfermedades humanas. El producto del sexto gen del rotavirus del grupo A codifica a VP6, la proteína viral más abundante, que es de los principales factores determinantes de la reactividad del grupo, el objetivo de pruebas comunes de diagnóstico, y contiene al antígeno utilizado para además clasificar los rotavirus en los subgrupos I y II. Las proteínas de la cápside externa, VP7, (proteína G, codificada por los genes 7, 8, o 9, dependiendo de la cepa) y VP4 (la proteína P codificada por un segmento del gen 4), determinan la especificidad del serotipo y constituyen la base de la clasificación del sistema binario (Tipo G y P) del

rotavirus. Ambas proteínas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes y también pueden participar en la inmunidad protectora. (Parashar *et al*, 1998)

El rotavirus fue descubierto por Ruth Bishop en 1973 y tiene una naturaleza muy simple: 1) Todos los niños son infectados en su primer año de vida, 2) La infección primaria después de los primeros meses de vida causa diarrea que puede ser grave o algunas veces fatal, 3) La inmunidad natural se produce después de la infección inicial, y raramente en los niños produce graves diarreas más de una vez. El rotavirus ha sido llamado "el virus democrático" porque infecta a todos los niños, a ricos y pobres y no conoce límites geográficos. (Sugata *et al*, 2008) (Pan American Health Organization *et al*, 2003)

El rotavirus es la causa principal de gastroenteritis en niños pequeños en todo el mundo. La gastroenteritis puede causar deshidratación grave, diarrea y vómito que pueden ser mortales en los países en desarrollo. Asimismo, la gastroenteritis inducida por la infección por rotavirus constituye una gran carga económica en los países en desarrollo. Inicialmente se pensaba que la replicación del rotavirus se limitaba al tracto gastrointestinal en pacientes con gastroenteritis, sin embargo, se sabe que la gastroenteritis por rotavirus se complica a veces con fiebre alta, niveles elevados de transaminasas, convulsiones y encefalitis que puede ser causada por una infección viral sistémica. (Sugata, 2008) (Pan American Health Organization *et al*, 2003)

La carga global de la enfermedad por rotavirus es enorme. Cada año, el rotavirus se asocia con 25 millones de visitas médicas, 2 millones de hospitalizaciones y más de 600000 muertes en todo el mundo entre los niños menores de cinco años de edad. La inmunización contra el rotavirus reduce la necesidad de cualquier atención médica atribuible a gastroenteritis por rotavirus. (Committee on Infectious Diseases *et al*, 2009) (Ruiz-Palacios *et al*, 2006).

En cuanto a la inmunización contra la gastroenteritis por rotavirus se utiliza la vacuna Rotarix®, la cual está indicada para la prevención de la gastroenteritis causada por rotavirus de los serotipos G1 y los serotipos no G1 (como G2, G3, G4, G9). Está compuesta por rotavirus vivos atenuados humanos, cepa RIX4414, 10^6 $DICC_{50}$ (Dosis Infectante en Cultivo Celulares 50), producidas en células VERO. (GlaxoSmithKline Biologicals, S. A.)

Rotarix® protege contra serotipos comunes que circulan en América Latina y el Caribe. Un nivel elevado de protección (eficacia de vacuna, 91 %) se manifiesta en contra de G1P homóloga de rotavirus, que tienen dos proteínas de la cápside externa (VP4 y VP7) y una proteína interna de la cápside (VP6). Asimismo, protege bien frente a las cepas que comparten sólo el genotipo P (el antígeno VP4) y el antígeno VP6 (eficacia de vacuna, 87 %).

La importancia en salud pública de Rotarix® es el hecho de que confiere 42 % de protección contra la hospitalización por gastroenteritis de cualquier causa.

Esto representa una reducción significativa en la carga global de la gastroenteritis. (Ruiz-Palacios *et al*, 2006)

2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones son la principal causa de consulta en México, evitarlas significa un importante ahorro para el país en tiempo y recursos económicos e impacta de forma significativa en la salud poblacional.

Se requiere de la búsqueda de vacunas más eficaces (capaces de activar células inmunocompetentes y que induzcan un mínimo de efectos adversos [seguridad]); de forma que resulta importante la evaluación comparada del efecto de las vacunas que actualmente se comercializan sobre células mononucleadas; lo cual es importante para monitorear su inmunogenicidad y eficacia terapéutica.

3.-JUSTIFICACIÓN

Resulta importante desde el punto de vista clínico-farmacológico evaluar el impacto de distintos preparados vacunales sobre la proliferación y activación de células inmunocompetentes.

4.-OBJETIVO

Caracterizar la respuesta celular inducida por Agrippal® (Vacuna de subunidades virales contra la influenza) y Rotarix® (Vacuna de virus vivos atenuados humanos contra rotavirus).

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto de vacunas Agrippal® y Rotarix® sobre la expresión de las moléculas CD3, CD19, CD45, CD16 y CD56 en células mononucleadas humanas de sangre periférica.
- Evaluar el efecto de las vacunas Agrippal® y Rotarix® sobre la expresión de las moléculas $CD3^+$ $CD16+CD56^+$ en linfocitos humanos de sangre periférica.

5.-HIPÓTESIS

- **HIPÓTESIS NULA**

Expresión diferencial de en cuanto a la expresión de moléculas de diferenciación leucocitaria inducida por las vacunas Agrippal® y Rotarix® a concentraciones bioequivalentes.

- **HIPÓTESIS ALTERNA**

La expresión de moléculas de diferenciación leucocitaria inducida por las vacunas Agrippal® y Rotarix® es similar a concentraciones bioequivalentes de estas.

6.-MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 AISLAMIENTO DE CÉLULAS

Obtención y separación de células mononucleadas (Método: Ficoll-Paque™ PREMIUM)

La separación de células mononucleadas se realizó por el método de gradiente Ficoll-Paque™ PREMIUM. Se extrajeron 2 mL de sangre periférica de donadores sanos, se depositaron en tubos con anticoagulante (EDTA) y se mezclaron cuidadosamente con 2 mL de solución PBS (amortiguador de fosfato de potasio 0.015 M pH 7.4). En un tubo cónico de 10 mL se colocó 3 mL de Ficoll-Paque™ PREMIUM y se le añadió lentamente la sangre sin mezclar. Posteriormente, el tubo cónico se centrifugó 400 g durante 35 minutos a 18°C (centrifuga refrigerada Eppendorf 5804 R). Después de la centrifugación se retiró y desechó la primera banda y la segunda banda la cual contiene las células mononucleadas, se retiró con ayuda de una micropipeta de 1 mL y se pasó a otro tubo cónico donde se lavó dos veces para remover las plaquetas, se le añadió 15 mL de solución PBS) y se centrifugó a 100 g durante 10 minutos a 18° C. Por último, se resuspendió en 2 ml de medio RPMI 1640 + SFBI10% + Fluconazol + Gentamicina.

6.2 DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR

Este parámetro se determinó evaluando la exclusión del colorante azul de tripano, el cual no penetra a través de la membrana íntegra en las células vivas. Se determinó la viabilidad celular en un hemocitómetro por el porcentaje de células teñidas de azul (muertas) contra el porcentaje de células no teñidas (vivas).

En un vial se colocaron 20 μL de la suspensión celular y 20μL del colorante azul de tripano al 1%, se mezcló cuidadosamente y se tomó una alícuota de 15 μL que fue colocada en un hemocitómetro y se observó en un microscopio óptico a 10x. Se aceptó una viabilidad celular ≥95%. Las células se contaron y la solución celular se ajustó a una concentración final de $3x10^5$ células/100μL.

6.3 CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS

Las células mononucleadas se sembraron en cajas estériles de 96 pozos de fondo plano (Sarstedt, Inc. Newton, NC 28658, USA), a $3x10^5$ células/100μL por pozo. Las células se trataron con Agrippal® (10 μL = 0.3 μg/mL y 20 μL = 0.6 μg/mL) y Rotarix® (10 μL = $1.33x10^4$ $CCID_{50}$ μg/mL y 20 μL = $6.66x10^3$ $CCID_{50}$ μg/mL) y se ajustó a una concentración final de 200 μL con RPMI 1640 + SFBI 10%. El control negativo consistió de células mononucleadas no tratadas con las vacunas. Posteriormente, las células se incubaron durante 6 horas a 37 °C en una incubadora con atmósfera de CO_2 al 5%. (CO2 Incubator – SHEL LAB)

6.4 EVALUACION DE LA EXPRESIÓN DE CÉLULAS DE DIFERENCIACIÓN CD3, CD19, CD45, CD16 Y CD56.

Obtención del cultivo de células mononucleadas activadas por Agrippal® y Rotarix®.

Se recolectaron los sobrenadantes del cultivo celular a las 6 hrs en tubos de 10 mL y se les añadió 10 µL de los correspondientes anticuerpos monoclonales. La preparación se incubó durante 20 min en una cámara obscura. Posteriormente se realizaron dos lavados con solución PBS, centrifugándose a 180 g durante 5 minutos a 18°C. Posteriormente se fijó la reacción con formol al 1% y se analizó en un citómetro de flujo (Epics xcl). Para la determinación de los antígenos de diferenciación propuestos se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales obtenidos de Beckman Coulter (USA).

MOLECULA DE DIFERENCIACIÓN	**FLOROCROMO**
CD3 /CD16+CD56	FITC/PE
CD3 CD19 CD45	FITC PE PC5

(Beckman Coulter Inc., USA)

7.- VARIABLES

- **VARIABLES DEPENDIENTES**

Expresión de moléculas CD3, CD16, CD19, CD45 y CD56 en superficie de células mononucleadas de sangre periférica.

- **VARIABLES INDEPENDIENTES**

Tratamiento de células mononucleadas con Agrippal® y Rotarix®.

8.- PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO

Se analizaron los datos en el programa winMDI 2.8 para reportar valores de conteo celular e intensidad media de fluorescencia (IMF) y se organizaron en el programa Microsoft Excel y el programa estadístico SPSS versión 18.0. Los procedimientos estadísticos descriptivos e inferenciales que se emplearon incluyen porcentajes, medias y error estándar; se utilizó un una prueba t de Student para comparar las medias entre los fenotipos celulares activados por las vacunas Agrippal® y Rotarix®. El intervalo de confianza fue del 95% y se aceptó una significancia estadística < 0.05.

9.-RESULTADOS

Se determinó el porcentaje de células que expresan CD45 en membrana y intensidad de la expresión de dichos marcadores midiendo la intensidad medida como fluorescencia (IMF) después del tratamiento de los cultivos celulares con las vacunas Agrippal® y Rotarix® figuras 2 y 3.

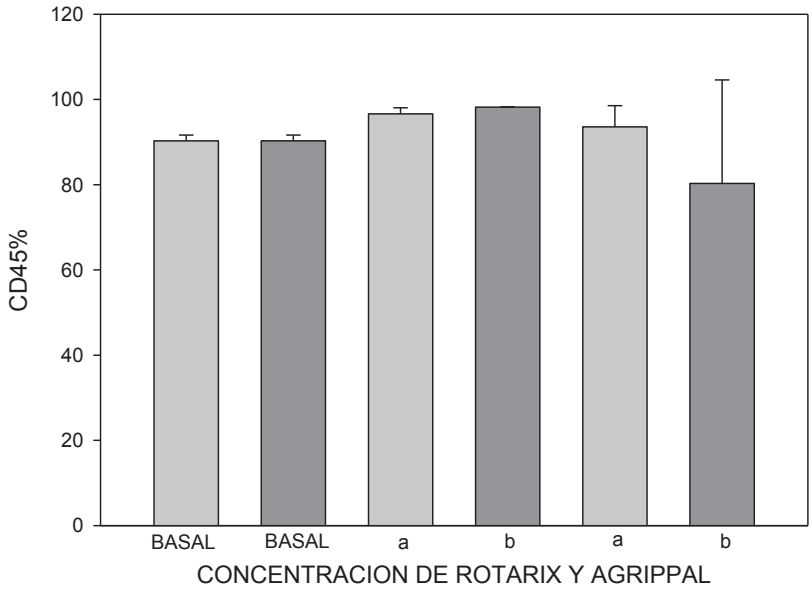

Fig. 2.- Efecto de Rotarix® y Agrippal® sobre la expresión de CD45 en membrana de células mononucleadas de sangre periférica proveniente de donantes sanos, y expresada como porcentaje de $CD45^{+}$. Las columnas claras representan los conteos absolutos de células tratadas con Rotarix® y las columnas obscuras los conteos absolutos de células tratadas con Agrippal®. Las barras representan el porciento de células $CD45^{+}$ determinadas por citometría de flujo. a=

$6.66x10^3$ DICC/mL (Rotarix®) ó 0.3 µg/mL (Agrippal®) y b= $1.33x10^4$ DICC/mL (Rotarix®) ó 0.6 µg/mL (Agrippal®).

En la Fig. 2 se muestra los resultados del porciento de células $CD45^+$ se observó un aumento significativo de la expresión de CD45 cuando se utilizó una concentración de $6.66x10^3$ DICC de Rotarix® (*p*=0.015) ó 0.3 µg/mL Agrippal ® (*p*=0.014), al utilizar el doble de la dosis no se observó un incremento significativo en la expresión de este marcador.

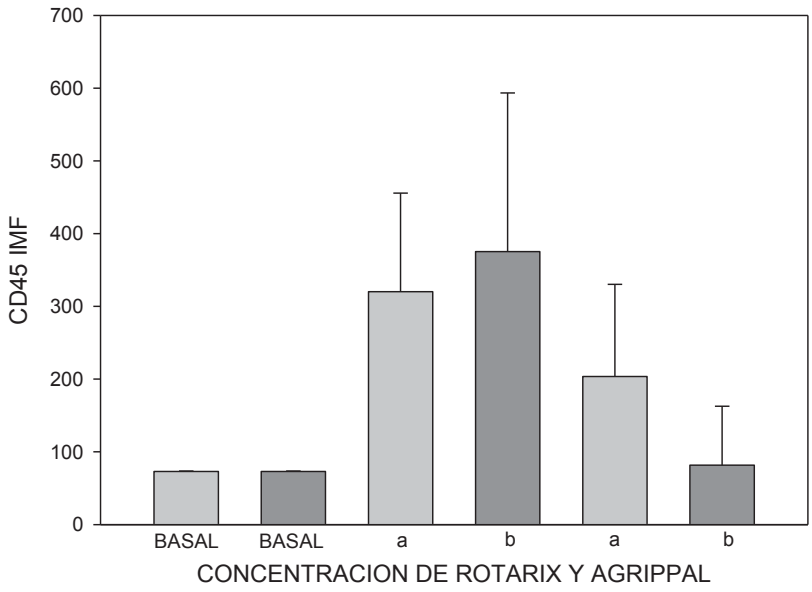

Fig. 3.-Efecto de Rotarix® y Agrippal® sobre la expresión en membrana de CD45 por células mononucleadas de sangre periférica proveniente de donadores sanos y determinados por medición de la IMF. Las columnas claras representan células tratadas con Rotarix® y las columnas obscuras de células tratadas con Agrippal. Las barras representan la IMF de células CD45 medidas por citometría

de flujo. a= $6.66x10^3$ DICC/mL (Rotarix®) ó 0.3 µg/mL (Agrippal®) y b= $1.33x10^4$ DICC/mL (Rotarix®) ó 0.6 µg/mL (Agrippal®).

En la Fig. 3 se muestra la IMF en células CD45 estimuladas con Rotarix® ó Agrippal®. En las células estimuladas con Rotarix® se observó una tendencia a expresar mayor IMF fueron tratadas con una concentración de $6.66x10^3$ DICC al ser 4.3 veces mayor respecto a las células no tratadas (p=0.09). En cambio el tratamiento de las células con el doble de esta concentración ofreció un aumento no mayor al que ofreció la primera dosis de $1.33x10^4$ DICC de Rotarix® sobre la expresión en el MIF en células CD45. En cuanto a las células estimuladas con Agrippal® el MIF en células $CD45^+$ fue 5.1 veces mayor en células tratadas con 0.3 µg/mL que en células no tratadas (p=0.18). El tratamiento con el doble de la concentración de Agrippal® provocó un descenso en IMF de células $CD45^+$ hasta un nivel próximo al basal.

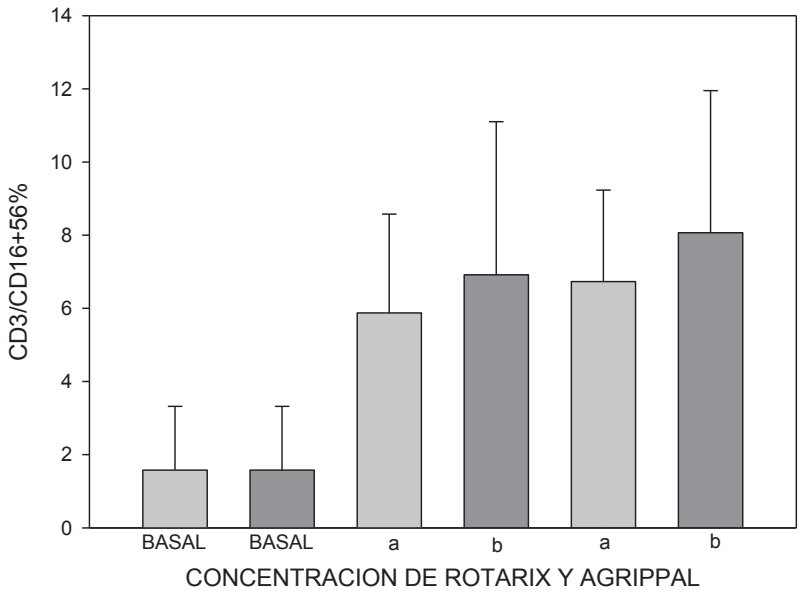

Fig. 4.-Efecto de Rotarix® y Agrippal® sobre la expresión de membrana de los marcadores de CD3, CD16 Y CD56 en células mononucleadas de sangre periférica proveniente de donadores sanos y expresada como porcentaje de células $CD3^{+}/CD16+56^{+}$. Las columnas claras representan células tratadas con Rotarix® y las columnas obscuras de células tratadas con Agrippal®. Las barras representan el porcentaje de células que expresaron CD3/CD16+56 medidas por citometría de flujo. a= $6.66x10^{3}$ DICC/mL (Rotarix®) ó 0.3 µg/mL (Agrippal®) y b= $1.33x10^{4}$ DICC/mL (Rotarix®) ó 0.6 µg/mL (Agrippal®).

En la Fig. 4 se muestra el porcentaje de células que expresaron CD3/CD16+56 estimuladas con Rotarix® ó Agrippal®. En las células estimuladas con Rotarix® donde aumento 4.4 veces el % de células que expresaron CD3/CD16+56 al ser tratadas con $1.33X10^{4}$ DICC/mL que en células no tratadas

(p=0.04). En cuanto a las células estimuladas con Agrippal® el porcentaje de células CD3/CD16+56 fue 4.6 veces mayor en células tratadas con 0.3 µg/mL que en células no tratadas (*p*=0.19), mientras que no se observó una diferencia estadísticamente significativa al utilizar el doble de la dosis.

En las Tablas de la 3-7 se muestran los porcentajes de células que expresaron CD19 y CD16+56, así como la IMF; los cuales fueron medidos por citometría de flujo. Aunque no fue estadísticamente significativo el aumento en el número de células $CD19^+$ y $CD16+56^+$ cuando las células mononucleadas se trataron con Agrippal® y Rotarix® si se encontró una tendencia a aumentar el número de células.

Tabla 3. Conteo absoluto de células estimuladas con Rotarix®

	Concentración de Rotarix® (DICC/ml)			***p***		
	0 **(a)**	$6.66x10^3$ **(b)**	$1.33x10^4$ **(c)**	a vs b	a vs c	b vs c
CD3	49.4±9.2	64±5.7	62.9±4.9	0.2350	0.2196	0.8959
CD19	0.07±0.07	3.8±1.5	3.8±1.4	0.2059	0.1915	0.9870
CD16+56	27.5±6	21.5±5.2	22.1±5.2	0.8781	0.9790	0.8706
CD45	90.2±0.9	96.6±0.8	93.5±2.8	**0.0155**	0.4466	0.3668

Tabla 4. IMF en células estimuladas con Rotarix®

	Concentración de Rotarix® (DICC/ml)			***p***		
	0 **(a)**	$6.66x10^3$ **(b)**	$1.33x10^4$ **(c)**	a vs b	a vs c	b vs c
CD3	22.5±0.7	91.2±19.9	88.1±17.1	0.0953	0.0711	0.9080
CD19	6.9±6.9	27.4±4.5	25.3±3.8	0.0601	0.0547	0.7352
CD16+56	31.2±0.5	117.2±35.4	117.6±32.3	0.1709	0.8127	0.9943
CD45	73.0±0.4	320.1±78.3	203.5±73.1	0.0921	0.2606	0.3378

Tabla 5. Conteo de células doble positivas estimuladas con Rotarix® y Agrippal®

	Concentración de Rotarix® (DICC/ml) y Agrippal® (µg/ml)			***p***		
	0 **(a)**	$6.66x10^3$ ó 0.3 **(b)**	$1.33x10^4$ ó 0.6 **(c)**	a vs b	a vs c	b vs c
Rotarix® CD3/CD16+56	1.5±1.2	5.8±1.2	6.7±1.1	0.3053	**0.0481**	0.3608
Agrippal® CD3/CD16+56	1.5±1.2	6.9±2.4	8.0±2.2	0.1993	0.1223	0.7448

Tabla 6. Conteo absoluto de células estimuladas con Agrippal®

	Concentración de Agrippal® (µg/ml)			***p***		
	0 **(a)**	0.3 **(b)**	0.6 **(c)**	a vs b	a vs c	b vs c
CD3	49.4±9.2	48.8±8.9	42.8±4.7	0.9665	0.5233	0.5849
CD19	0.07±0.07	2.3±0.4	3.1±1.1	0.0337	0.1360	0.5753
CD16+56	29.1±4.8	39.2±5.4	38.5±2.8	0.2923	0.1634	0.9136
CD45	90.2±0.9	98.1±0.0	80.2±17.1	**0.0140**	0.6195	0.4063

Tabla 7. IMF en células estimuladas con Agrippal®

	Concentración de Agrippal® (µg/ml)			***p***		
	0 **(a)**	0.3 **(b)**	0.6 **(c)**	a vs b	a vs c	b vs c
CD3	22.5±0.7	78.7±33.8	77.6±34.1	0.2885	0.2995	0.9838
CD19	6.9±6.9	16.5±6.3	14.7±5.7	0.3974	0.4531	0.8434
CD16+56	31.2±0.5	81.8±34.8	92.4±53.2	0.3426	0.4385	0.8748
CD45	73±0.4	375.3±154.2	81.7±57.3	0.1889	0.2162	0.2162

10.-DISCUSIÓN

La inducción de respuestas de células T se ha convertido en uno de los principales objetivos de la vacunación terapéutica contra las enfermedades virales y cáncer. Agrippal® y Rotarix® estimulan células linfopoyéticas (Linfocitos, monocitos, macrófagos y neutrófilos) en intensidad similar con las dosis evaluadas, esta estimulación fue máxima a las dosis $6.66X10^3$ DICC de Rotarix® ($p=0.015$) y 0.3 µg/mL de Agrippal® ($p=0.014$), en el hecho de no obtenerse una estimulación adicional con dosis mayores de ambas vacunas se relaciona con el hecho de alcanzar buena inmunogenicidad a dosis bajas. Este efecto fue medible tanto en términos de aumento de conteo absoluto de células que incorporaran CD45 a su superficie (% de $CD45^+$) como en términos de intensidad media de fluorescencia (IMF). La estimulación fue máxima a las dosis $6.66X10^3$ DICC de Rotarix® ($p=0.09$) siendo 4.3 veces mayor respecto a las células no tratadas y 0.3 µg/mL de Agrippal® ($p=0.18$) siendo 5.1 veces mayor respecto a las células no tratadas.

En el caso de de la estimulación con Agrippal® sucede que el tratamiento de las células con doble de la concentración de 0.6 µg/mL originó un descenso de la IMF de células $CD45^+$ hasta niveles basales lo cual pudiera relacionarse con el hecho que el efecto estimulante sobre linfocitos y fagocitos se obtiene con dosis más bajas. Fig. 2 y 3

En este trabajo determinamos una expansión de poblaciones de células $CD45^+$ y este efecto fue dependiente de la dosis de estimulación. Se obtuvo mayor respuesta de células $CD45^+$ cuando se usaron las dosis mas bajas de las vacunas Rotarix® y Agrippal® para estimular las células en cultivo, sería conveniente relacionar estos hallazgos con los títulos de anticuerpos que inducen estas dosis y caracterizar las subpoblaciones de células $CD45^+$ para caracterizar mejor la respuesta inmune a Rotarix® y Agrippal®.

Luego de la vacunación contra influenza se ha reportado una expansión de células $CD45^+$. (Goronzy *et al*, 2001) El incremento de células $CD4^+$ $CD45RO^+$ pudiera orientarnos a la expansión de una subpoblación de células T de memoria que no tiene efecto sobre la producción de anticuerpos específicos para influenza y que se ha sugerido pueda usarse como marcador biológico de inmunocompetencia disminuida para identificar individuos con alto riesgo de desarrollar pobre respuesta de anticuerpos. (Goronzy *et al*, 2001)

Se ha señalado también que la expansión de un fenotipo CD45 RA^- RO^- en individuos que han recibido vacuna trivalente contra influenza (A/Texas/16/89 (H1N1), A/Beijing/353/89 (H3N2), y B/Panama/45/9) puede identificar una población de células que sufren apoptosis, lo cual limita la duración de respuestas de células $CD4^+$ de memoria luego de la vacunación. (McElhaney *et al*, 1995)

Aunque no fue estadísticamente significativo el aumento en el número de células $CD19^+$ y $CD16+56^+$ cuando las células mononucleadas se trataron con

Agrippal® y Rotarix® si se encontró una tendencia a aumentar el número de células, lo cual apoya el hecho de que estas vacunas inducen un alto título de anticuerpos específicos lo cual apoya la eficacia de ambas vacunas. En un estudio realizado por Durado, se demostró la seguridad y eficacia de Agrippal® tanto en adultos sanos como en personas infectadas con VIH. Al mostrar un buen perfil de inmunogenicidad (producción de anticuerpos y inmunidad mediada por células). (Durando *et al*, 2008) de forma que aún en sujetos con inmunodeficiencias es posible obtener altos títulos de anticuerpos, lo cual se relaciona con la alta inmunogenicidad de esta vacuna. Agrippal® induce una fuerte respuesta de células Th1 CD4, Vogt reportó que Agrippal® vía transcutánea incrementa significativamente el número de células CD4 y CD8. (Vogt *et al*, 2008) La inmunoglobulina A y el titulo de anticuerpos específicos (IgA) o de anticuerpos IgG contra el antígeno VP6. Rotarix® a inducido una tasa de protección de 85% contra la gastroenteritis y el 100% de la deshidratación grave inducida por rotavirus. La vacuna también ha demostrado ser muy eficaz en la prevención de la gastroenteritis por rotavirus de cualquier gravedad causadas por el serotipo G1 predominante (92% de eficacia) y serotipos G3, G4 o G9 (88% de eficacia). (Dennehy *et al*, 2008) y en niños europeos la eficacia de Rotarix® frente a gastroenteritis por rotavirus de cualquier severidad fue del 87%. (Vesikari *et al*, 2007)

Al analizar el efecto de las concentraciones evaluadas de Rotarix y a Agrippal sobre la estimulación de subpoblaciones celulares especificas $CD3^+$, $CD19^+$,

$CD16+56^{+}$ cuando estas se midieron como conteos absolutos de células y como intensidad media de fluorescencia, no se obtuvieron cambios estadísticamente significativos pero si se observó una tendencia a aumentar el número de células que incorporaron CD19 (células B), CD16+56 (células NK y Tc) y CD45 (células B y T activadas) tanto con Agrippal® como con Rotarix®.

Cuando se analizó la expresión de subpoblaciones CD3/CD16+56 se observó una tendencia a aumentar la coexpresión de estos marcadores por células tratadas con Agrippal® a la dosis de 0.3 µg/mL (p= 0.19) que fue 4.6 veces mayor respecto a células no tratadas y para Rotarix® a la dosis de $6.66X10^{3}$ DICC que fue 4.4 veces mayor respecto a células no tratadas, este último cambio resultó estadísticamente significativo (*p*= 0.0481). Estos cambios implican la estimulación de de una subpoblación de células T que ejercen acción citotóxica y que suele aparecer en valores bajos en sangre periférica de individuos no estimulados.

Se ha propuesto que solo el 10% de células T $CD8^{+}$ en sangre periférica de individuos infectados por el virus de hepatitis C expresan CD16 a diferencia de un porcentaje mucho menor en donantes voluntarios sin enfermedad. Estas células reconocen antígenos a través del receptor de células T lo cual sugiere que sufran expansión clonal, y se ha señalado que estas células $CD8^{+}$ durante la infección crónica por virus de hepatitis C continúan diferenciándose hasta un estadio terminal de células efectoras en el que adquieren el marcador CD16 y propiedades citotóxicas de células NK. (Björkström *et al*, 2008)

Por otro lado se ha propuesto que la mayoría de las células $CD3^+$ $CD56^+$ en cultivos con citocinas que induzcan actividad citotóxica provienen de células $CD3^+$ $CD56^-$ y no de células NK $CD3^-$ $CD56^+$ y que la expresión de CD56 sobre estas células se correlaciona con su gran citotoxicidad contra distintos blancos celulares.

Se ha reportado que cerca del 5% de los linfocitos que circulan en sangre periférica son $CD3^+$ $CD56^+$ y este fenotipo de células altamente citotóxicas puede ser inducido cultivando linfocitos de sangre periférica en presencia de IL-2, IFNγ, IL-1 α y de un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD3, estas condiciones pueden aumentar hasta 1000 veces el número de células $CD3^+$ $CD56^+$ (Lu *et al*, 1994) y es posible que estas citocinas estén presentes en los co-cultivos de células mononucleadas con vacunas Agrippal® y Rotarix® desarrollados en este estudio.

La presencia de células $CD3^+$ $CD56^+$ se ha señalado como criterio de agresividad de la Leucemia Linfocítica Granular grande, que es rápidamente progresiva y resistente al tratamiento. Estos pacientes al examen histológico tienen infiltrados extensos de células leucémicas en los cordones de la pulpa roja esplénico y del seno esplénico y atrofia de pulpa blanca del bazo; estos hallazgos clínico-patológicos son similares a los descritos en pacientes con leucemia de células Natural Killer que son $CD56^+$, y se asocian en estos pacientes a un comportamiento mas agresivo, lo cual estaría apoyado por el hecho que CD56 es una molécula de adhesión relacionada con alta citotoxicidad. La expresión aumentada de moléculas de adhesión por células tumorales se ha relacionado con

la invasividad del cáncer pero resulta mas difícil explicar porque la aparición de células $CD3^+$ $CD56^+$ pueden promover un comportamiento más agresivo de la leucemia de células $CD3^+$ $CD56^+$; esta población parece ser activa en tumores y en infecciones por virus pero no se dispone de datos que correlacionen la actividad citotóxica con mecanismos de defensa contra tumores e infecciones por virus y con daño al huésped y mecanismos de escape del tumor.

En este trabajo la expansión de células $CD3^+$ CD16+$CD56^+$ puede relacionarse con eficacia de estas dos vacunas antivirales "Agrippal® y Rotarix®". La proliferación de células $CD3^+$ $CD56^+$ recuerda también lo que ocurre después de padecerse infecciones virales (Björkström *et al*, 2008) o padecerse tumores (Gentile *et al*, 1994) y pueden tomarse como modelos de inmunización activa natural a diferencia de las vacunas antes mencionadas que son modelos de inmunización activa "adquirida"; pero el efecto sobre la población de células T $CD3^+$ $CD56^+$ parece ser similar.

Es necesaria la cooperación celular para la maduración de respuestas tanto regulatorias como efectoras de las células T. Por ejemplo la generación de células citotóxicas $CD8^+$ aloantígeno-específicas en humanos requiere la participación de células $CD3^-$ CD16+$CD56^+$ y la depleción de células NK disminuye considerablemente el número de células T citotóxicas aloantígeno-específicas en cultivos mixtos de linfocitos. (Kos *et al*, 1995)

En este trabajo la presencia de células NK en los cultivos celulares pueden explicar parte de la cooperación necesaria para la aparición de células T con fenotipo altamente citotóxico.

Esta subpoblación es importante en la eliminación de células infectadas por virus y células senescentes autorreactivas este efecto resultó mas potente en células tratadas con Agrippal® que con Rotarix® Fig. 4

Existe una respuesta diferencial de Rotarix® y Agrippal® sobre la estimulación de células linfoides. Agrippal® mostró un efecto mas potente sobre la inmunidad humoral que Rotarix® lo cual pudiera relacionarse con una respuesta más potente en el individuo vacunado, una mayor población de células $CD3^+$ $CD56^+$ debe analizarse en el contexto del perfil de eficacia y seguridad inducido por ambas vacunas.

11.-CONCLUSIÓN

Se encontró una expresión diferencial de moléculas de diferenciación leucocitaria cuando células mononucleadas humanas de sangre periférica se estimularon con lass vacunas Agrippal® y Rotarix® a concentraciones bioequivalentes. La proliferación de células $CD3^+$ $CD56^+$ debe analizarse en el contexto del perfil de eficacia y seguridad, al igual que las isoformas de CD45 que son inducidas luego de recibir ambas vacunas.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Abbas A. K. y Lichtman A. H. (2009) Basic immunology: functions and disorders of the immune system. (3rd ed.). Philadelphia.: Saunders, pp. 273-278.

2. Bakke C.A. 2000. Clinical Applications of flow cytometry. *Laboratory medicine*, 31(2):94-104.

3. Björkström N. K., Gonzalez V. D., Malmberg Karl-Johan, Falconer K., Alaeus A., Nowak G., Jorns C., Ericzon Bo-Göran, Weiland O., Sandberg J. K., Ljunggren Hans-Gustaf. 2008. Elevated Numbers of FcγRIIIA^{+}(CD16^{+}) Effector CD8 T Cells with NK Cell-Like Function in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J. Immunol.*; 181:4219-4228.

4. Brown M., Wittwer C. 2000. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* 46:8(B) 1221–1229.

5. Chua Ch., Lugovtsevc V., Goldingc H., Betenbaugha M., Shiloachb J. 2009. Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human siat7e gene and its application for influenza virus production. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 106 (35): 14802–14807.

6. Committee on Infectious Diseases. 2009. Vaccine Prevention of Rotavirus Disease: Updated Guidelines for Use of Rotavirus. *Pediatrics*, 123:1412-1420.

7. Cross J. L., Kott K., Miletic T., Johnson P. 2008. CD45 Regulates TLR-Induced Proinflammatory Cytokine and IFN-² Secretion in Dendritic Cells. *J. Immunol,* 180:8020-8029.

8. Dennehy P. H. 2008. Rotavirus Vaccines: an Overview. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 21(1):198–208.

9. Durando P., Fenoglio D., Boschini A., Ansaldi F.Icardi G., Sticchi L. Renzoni A. Fabbri P., Ferrera A., Parodi A., Bruzzone B., Gabutti G., Podda A., Del Giudice G., Fragapane E., Indiveri F., Crovari P., Gasparini R. 2008. Safety and Immunogenicity of Two Influenza Virus Subunit Vaccines, with or without MF59 Adjuvant, Administered to Human Immunodeficiency Virus Type 1-Seropositive and -Seronegative Adults. *Clinical and Vaccine Immunology,* 15(2):253–259.

10. Enshell-seijffers D., Smelyanski L., Vardinon N., Yust I.,Gershoni J. M. 2001. Dissection of the humoral immune response toward an immunodominant epitope of HIV: a model for the analysis of antibody diversity in HIV1 individuals. *FASEB J.*, 15 (12): 2112-2120.

11. Gentile T. C., Uner A. H., Hutchison R. E., Wright J., Ben-Ezra J., Russell E. C. Loughran T.P. 1994. CD3+, CD56+ aggressive variant of large granular lymphocyte leukemia. *The American Society of Hematology ,* 84:2315-2321.

12. Goronzy J. J., Fulbright J. W., Crowson C. S., Poland G. A., O'Fallon W. M., Weyand C. M. 2001. Value of Immunological Markers in Predicting Responsiveness to Influenza Vaccination in Elderly Individuals. *Journal of Virology,* 75 (24): 12182-12187.

13. He X., Holmes T. H., Zhang C., Mahmood K., Kemble G. W., Lewis D. B., Dekker C. L., Greenberg H. B., Arvin A. M. 2006. Cellular Immune Responses in Children and Adults Receiving Inactivated or Live Attenuated Influenza Vaccines. *Journal of Virology*, 80(23): 11756–11766.

14. Kondo, M., D. C. Scherer, T. Miyamoto, A. G. King, K. Akashi, K. Sugamura,and I. L. Weissman. 2000. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. Nature 407:383–386.

15. Kos F. J. Engleman E. G. 1995. Requirement for natural killer cells in the induction of cytotoxic T cells. *The Journal of Immunology,* 155:578-584.

16. Kroese F. G. M. 1998. Immunology of the Rat. In handbook of vertebrate Immunology. P.-P. Pastoret P., Griebel H., Bazin A. Govaerts, eds. Academic Press, pp. 137-222.

17. Leal Q. F. J. 2004. Vacunas en pediatría. (2ª ed.). Bogotá Colombia.: Panamericana.

18. Lu P. H., Negrin R. S. 1994. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *The Journal of Immunology*, 153:1687-1696

19. McElhaney J. E., Pinkoski M. J., Meneilly G. S. *1995.* Changes in CD45 isoform expression vary according to the duration of T- cell memory after vaccination. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2 (1):73-81.*

20. Morales A., Arias S. J., Salazar Y., Garcia A., Arnoux S., Arancibia A., Deroche C., Rey E. 2003. A Randomized controlled trial comparing split and subunit influenza vaccines in adults in Colombia. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 63:197-204.

21. Pan American Health Organization. (2003) Vaccines: preventing disease and protecting health. Washington, D. C.: PAHO.

22. Parashar U. D., Bresee J. S., Gentsch J. R., Glass R. I. 1998. Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4):561-570.

23. Pérez P. R., Palomar L. A., Salas H. J., Vásquez G. J. C., 2010, Influenza por el nuevo virus A N1H1. Un panorama Integral. México.: Graphimedic. 28-29.

24. Pickering, Baker, Long, McMillan. (2007). RED BOOK enfermedades infecciosas en pediatría. (27 ed.). Buenos Aires, Argentina.: Panamericana.

25. *Razo M.D., García N. J., Llorente L.* 1996. Cuantificación de subpoblaciónes de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo determinación de intervalos de referencia en población adulta sana de la ciudad de México. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 43(1): 21-26.

26. Roitt I., Brostoff J., Male D. 1993. Inmunología. 3ra ed. España.: MASSON-SALVAT Medicina

27. Rojas E.O. 2001. Inmunología. (2a ed.). Mexico.: Panamericana, pp.10-12.

28. Ruiz-Palacios G. M., Pérez-Schael I., Velázquez F. R., Abate H., Breuer T., Costa C. S., Cheuvart B., Espinoza F., Gillard P., Innis B. L., Cervantes Y., Linhares A. C., López P., Macías-Parra M., Ortega-Barría E., Richardson V., Rivera-Medina D. M., Rivera L., Salinas B., Pavía-Ruz N., Salmerón J., Rüttimann R., Tinoco J. C., Rubio P., Nuñez E., Guerrero L., Yarzábal J. P., Damaso S., Tornieporth N., Sáez-Llorens X., VergaraR. F., Vesikari T., Bouckenooghe A., Clemens R., De Vos B., O'Ryan M. 2006. Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis. *Th e new england journal o f medicine*, 354 (1):11-22.

29. Saikh K. U., Dyas B., Kissner T., Ulrich R. G. 2003. CD56_-T-Cell Responses to Bacterial Superantigens and Immune Recognition of Attenuated Vaccines. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10 (6):1065–1073.

30. Sampola-Lainz A., López Gómez M. 1992. Anticuerpos monoclonales y grupos de diferenciación antigénico: métodos de estudio y aplicaciones al diagnóstico clínico. *Med clin (Barc)*; 99:30-36.

31. Stites D. P. Terr A. I., 1994. Basic & clinical Inmmunology. (8 ed). Norwalk, Connecticut.: Appleton & Lange.

32. Sugata K., Taniguchi K., Yui A., Miyake F., Suga S., Asano Y., Ohashi M., Suzuki K., Nishimura N., Ozaki T., Yoshikawa T. 2008. Analysis of Rotavirus Antigenemia and Extraintestinal Manifestations in Children. With Rotavirus Gastroenteritis. *Pediatrics*, 122:392–397.

33. Tchilian E. Z., Dawes R., Hyland L., Montoya M., Le Bon A., Borrow P., Hou S., Tough D. Beverley P. C. L. 2004. Altered CD45 isoform expression affects lymphocyte function in CD45 Tg mice. *International Immunology,* 16(9):1323–1332.

34. Vesikari T, Karvonen A, Prymula R. 2007. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, doubleblind controlled study. *Lancet,* 370(9601):1757–1763.

35. Vogt A., Mahe B., Costagliola D., Bonduelle O., Hadam S., Schaefer G., Schaefer, Katlama C., Sterry W., Autran B., Blume-Peytavi U., Combadiere B. 2008. Transcutaneous Anti-Influenza Vaccination Promotes Both CD4 and CD8 T Cell Immune Responses in Humans. *The Journal of Immunology,* 180: 1482–1489.

36. www.beckmancoulter.com

37. Zhu FC, Wang H, Fang HH, Yang JG, Lin XJ, Liang XF, Zhang XF, Pan HX, Meng FY, Hu YM, Liu WD, Li CG, Li W, Zhang X, Hu JM, Peng WB, Yang BP, Xi P, Wang HQ, Zheng JS. 2009. A Novel Influenza A (H1N1) Vaccine in Various Age Groups. *New England Journal of Medicine*, 361:2414-23.