



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Importancia de la estabilidad cinética de complejos HLA clase II/péptido formados en presencia de HLA-DM en la inmuno-dominancia de un epítipo universal candidata a vacuna contra la malaria.

Carolina Pulido Calixto

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogotá D.C, Colombia
2012**

Importancia de la estabilidad cinética de complejos HLA clase II/péptido formados en presencia de HLA-DM en la inmuno-dominancia de un epítipo universal candidata a vacuna contra la malaria.

Carolina Pulido Calixto

**Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Magíster en Bioquímica**

**Director
M. D., Ph. D. Carlos A. Parra-López**

**Grupo de Investigación:
Grupo de Inmunología y medicina traslacional**

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogotá D.C, Colombia
2012**

RESUMEN

Introducción: La proteína de circumsporozoito (CS) de *Plasmodium falciparum* (parásito causante de la mayor morbi-mortalidad por malaria en el mundo) posee un péptido de 20 aminoácidos (₃₂₆EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT₃₄₅) denominado T*. Por presentarse en múltiples haplotipos HLA-DR y estimular eficientemente a los linfocitos T CD4+ (LT-CD4+) para que produzcan interferón gama (IFN- γ), una citoquina importante en la respuesta inmune protectora contra el parásito, T* ha sido evaluado con éxito como candidato a vacuna contra la malaria en varios estudios clínicos en humanos. T* posee dos epítopes: T*-1 ubicada en el extremo amino terminal que es altamente variable y QNT-6 una secuencia ubicada en el extremo carboxi-terminal altamente conservada en cepas de *P. falciparum* aisladas de diferentes partes del mundo. Por ser altamente conservado QNT-6 es un importante candidato a vacuna contra la malaria, sin embargo, evidencias experimentales recientes en nuestro laboratorio sugieren, que la asociación de QNT-6 con moléculas HLA-DR genera complejos MHC clase II/péptido altamente inestables en presencia de HLA-DM, una molécula presente en las células que presentan el antígeno in vivo. Recientemente en la búsqueda de alternativas para mejorar la estabilidad de la secuencia QNT-6, hemos encontrado un análogo de QNT-6 altamente estable en presencia de HLA-DM (péptido QNT-Y), en el que se sustituyó en QNT-6 el aminoácido Leucina (L) en la posición 335 con el cual este péptido se ancla al bolsillo P-1 de la molécula HLA-DR4 por tirosina (Y).

Objetivo: Comprobar la importancia de la estabilidad cinética de complejos HLA-DR4/péptido formados en presencia de HLA-DM en la inmunogenicidad para LT-CD4+.

Metodología: Para analizar las diferencias en la inmunogenicidad para los LT-CD4+ de péptidos con diferente estabilidad cinética a HLA-DM (QNT-6 y QNT-Y), se realizaron ensayos in vitro utilizando células de donantes HLA-DR β 1*0401 (DR4) para la generación de líneas específicas contra T1BT* y tras su estimulación con DCs pulsadas con péptido se determinó mediante citometría de flujo la expresión de CD27 y CD69, la capacidad de producción de citoquinas mediante CBA, los niveles de proliferación de LT-CD4+ y el porcentaje de células

tetrámero positivas para QNT-6, QNT-Y y T*-1. Adicionalmente se realizaron ensayos in vivo utilizando ratones transgénicos DR4, los cuales fueron inmunizados con T1BT* o T1BT*-Y para determinar la capacidad de producción de anticuerpos mediante ELISA y la capacidad de producción de IFN- γ mediante ELISPOT. **Resultados:** Mediante ensayos in vitro e in vivo se obtuvieron evidencias que sugieren que el péptido QNT-Y es menos inmunogénico que el péptido QNT-6. Estas evidencias se basan en experimentos in vitro que mostraron que las líneas celulares generadas con el péptido T1BT*-Y generaban un menor número de células de memoria y efectoras, al igual que una baja diferenciación medida por la expresión de CD27, menor capacidad de producción de IFN- γ y menor porcentaje de células tetrámero positivas para los diferentes péptidos, cuando se comparan con las líneas generadas con el péptido T1BT*. De igual forma mediante ensayos in vivo utilizando ratones transgénicos se encontró que los ratones vacunados con el péptido T1BT* generaron un mayor título de anticuerpos contra NANP al igual que los esplenocitos de estos ratones fueron capaces de producir IFN- γ tras su re-estimulación in vitro con los péptidos QNT-6 y QNT-Y. **Conclusiones:** Los resultados sugieren que el cambio de la leucina en la posición 335 por tirosina, generó un péptido QNT-Y que tiene una alta estabilidad y que probablemente genera interacciones de alta afinidad TCR-pMHC lo cual probablemente hace que se supere el nivel intermedio de afinidad que parece ser el óptimo para la estimulación de los linfocitos T específicos.

Palabras Claves

Epítotope T*, QNT-6, QNT-Y, LT-CD4+, HLA-DR β 1*0401, HLA-DM.

ABSTRACT

Introduction: The circumsporozoite protein (CS) of *Plasmodium falciparum* (the parasite that causes increased morbidity and mortality from malaria in the world) has a 20 amino acid peptide (326EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT345) called T*. As presented in multiple haplotypes HLA-DR and stimulate efficiently to CD4 + T cells (LT-CD4 +) to produce interferon gamma (IFN- γ), an important cytokine in the protective immune response against the parasite, T* has been evaluated success as a candidate malaria vaccine in human clinical studies. T* has two epitopes: T*-1 located at the amino terminus that is highly variable and QNT-6 sequence located at the carboxy-terminal highly conserved among strains of *P. falciparum* isolated from different parts of the world. Being highly conserved QNT-6 is a major candidate malaria vaccine, however, recent experimental evidence in our laboratory suggest that the QNT-6 association with HLA-DR class II MHC complex generates peptide highly unstable presence of HLA-DM, a molecule present in the antigen presenting cells in vivo. Recently in the search for ways to improve the stability of the QNT-6 sequence, we found a QNT-6 analog highly stable in the presence of HLA-DM (QNT-Y peptide), which was replaced in the QNT-6 Leucine (L) at position 335 with which the peptide is anchored to the pocket P-1 of the HLA-DR4 by tyrosine (Y). Purpose: To determine the importance of kinetic stability HLA-DR4/peptide complexes formed in the presence of HLA-DM in immunogenicity for LT-CD4+. Methods: To analyze the differences in immunogenicity for the LT-CD4 + peptides with different kinetic stability of HLA-DM (QNT-6 and QNT-Y), tests were conducted in vitro using donor cells HLA-DR β 1*0401 (DR4) for the generation of specific T cell anti T1BT* and after stimulation with peptide-pulsed DCs was determined by flow cytometry the expression of CD27 and CD69, the ability of cytokine production by CBA, proliferation levels of LT- CD4 + cells and the percentage of tetramer-positive QNT-6, QNT-Y and T* -1. Additionally vivo tests were performed using DR4 transgenic mice, which were immunized with T1BT* or T1BT*-Y to determine the ability of antibody production by ELISA and the production capacity of IFN- γ by ELISPOT. Results: Using in vitro

and in vivo test were obtained evidence to suggest that the peptide QNT-Y is less immunogenic than QNT-6 peptide. These evidences are based on in vitro experiments that showed that the cell lines generated with peptide T1BT*-Y generated fewer effector memory cells, as measured by a low differentiation of CD27 expression, decreased production IFN- γ and lower percentage of tetramer positive cells for different peptides when compared with the lines generated with peptide T1BT*. Similarly by tests in vivo using transgenic mice was found that mice immunized with the peptide T1BT * generated a higher antibody titer against NANP as splenocytes of these mice were able to produce IFN- γ after re-stimulation in vitro with peptides QNT-6 and QNT-Y. Conclusions: The results suggest that the change of the Leucine at position 335 by tyrosine, generated a peptide QNT-Y which has a high stability and probably generates high affinity interactions TCR-pMHC which probably exceeded the intermediate level affinity which appears to be optimal for stimulation of specific T lymphocytes.

Keywords: Epitope T *, QNT-6, QNT-Y, LT-CD4 +, HLA-DR β 1*0401, HLA-DM.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

ABREVIATURAS

1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
2	JUSTIFICACIÓN	2
3	MARCO TEÓRICO.....	5
3.1	ASPECTOS GENERALES DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS PÉPTIDOS CON MOLÉCULAS MHC... 5	
3.2	IMPORTANCIA DE LA ESTABILIDAD CINÉTICA DE COMPLEJOS MHC CLASE II/PÉPTIDO EN LA INMUNOGENICIDAD DE ANTÍGENOS PEPTÍDICOS. 10	
3.3	USO DE LA EPÍTOPE T* DE LA PROTEÍNA DE CIRCUMSPOROZOITO (CS) DE P. FALCIPARUM COMO CANDIDATO A VACUNA CONTRA LA MALARIA..... 12	
3.4	ESTUDIOS DE LA INMUNOGENICIDAD DEL PÉPTIDO QNT-6 (REGIÓN C-TERMINAL DE T*). 15	
4	OBJETIVOS	18
4.1	OBJETIVO GENERAL..... 18	
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
5	RACIONAL.....	19
6	METODOLOGÍA	21
6.1	SÍNTESIS DE PÉPTIDOS. 21	
6.2	DEFINICIÓN DEL REGISTRO DE UNIÓN DE QNT-6 A HLA-DR4 21	
6.3	AISLAMIENTO DE DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA..... 24	
6.4	TIPIFICACIÓN HLA..... 24	
6.4.1	<i>Tipificación de baja resolución. 25</i>	
6.4.2	<i>Tipificación de alta resolución 26</i>	
6.5	DETERMINACIÓN DE DIFERENCIAS EN LA SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LOS ALELOS DR4 EXPRESADOS POR VOLUNTARIOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO. 27	
6.6	CRIOPRESERVACIÓN DE PBMCS. 28	
6.7	PURIFICACIÓN DE MONOCITOS. 28	
6.8	GENERACIÓN DE LÍNEA DE LT-CD4+ ESPECÍFICOS PARA EL PÉPTIDO T*. 29	
6.8.1	<i>Generación de línea T1BT* a partir de PBMCS 29</i>	
6.8.2	<i>Primera re-estimulación de la línea T1BT* con distintas concentraciones de péptido 30</i>	
6.8.3	<i>Producción de células dendríticas (DCs) maduras pulsadas con péptido 31</i>	
6.8.4	<i>Segunda re-estimulación de la línea T1BT*/péptido con DCs pulsadas con los péptidos T*-1; QNT-6 y QNT-Y. 31</i>	
6.8.5	<i>Medición del grado de linfoproliferación con CFSE de la línea T1BT*/péptido luego de la segunda re-estimulación con DCs pulsadas con T*-1; QNT-6 y QNT-Y. 32</i>	
6.8.6	<i>Determinación de marcadores de activación en LT-CD4+ por citometría de flujo multicolor. 33</i>	
6.9	DETERMINACIÓN DE LA REACTIVIDAD CRUZADA DE LT-CD4+ ESPECÍFICOS PARA LA EPÍTOPE QNT-6 (CONTENIDA EN T*) CUANDO SON RE-ESTIMULADOS CON DCs PULSADAS CON QNT-Y..... 33	
6.10	DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTES MEDIANTE CBA. 34	
6.11	RESPUESTA DE LINFOCITOS T PRESENTES EN PBMCS A LA ESTIMULACIÓN CON CÉLULAS DENDRÍTICAS “ACELERADAS” PULSADAS CON PÉPTIDO..... 34	
6.12	DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE MEMORIA DE LÍNEAS GENERADAS A PARTIR DE LINFOCITOS CD4 VÍRGENES ESTIMULADOS CON DCs PULSADAS CON PÉPTIDO. 35	
6.13	CUANTIFICACIÓN DE LT-CD4+ ESPECÍFICOS PARA T*-1; QNT-6 Y QNT-Y GENERADOS DE LT VÍRGENES ESTIMULADOS CON DCs QUE PROCESAN Y PRESENTAN NATURALMENTE LOS PÉPTIDOS T1BT* Y T1BT*-Y..... 37	

6.14	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA IN VIVO DE RATONES TRANSGÉNICOS DR4 TRAS LA INMUNIZACIÓN CON T1BT* Y T1BT*Y.....	39
6.14.1	<i>Determinación de la expresión de moléculas HLA-DR en ratones transgénicos.</i> ..	39
6.14.2	<i>Inmunización de ratones</i>	40
6.14.3	<i>Determinación del título de anticuerpos por ELISA en suero de ratones DR4 transgénicos</i>	41
6.14.4	<i>Determinación de producción de IFN-γ por ELISPOT a partir de esplenocitos de ratones transgénicos inmunizados con T1BT* o T1BT*-Y</i>	42
7	RESULTADOS	45
7.1	DEFINICIÓN DEL REGISTRO DE UNIÓN DE QNT-6 A HLA-DR4	45
7.2	TIPIFICACIÓN HLA.....	48
7.2.1	<i>Tipificación de baja resolución.</i>	48
7.2.2	<i>Tipificación de alta resolución</i>	50
7.3	ALINEAMIENTO MÚLTIPLE PARA LOS DIFERENTES HAPLOTIPOS	54
7.4	RESULTADO ENSAYOS CELULARES	57
7.4.1	<i>Expresión de CD27 y CD69</i>	58
7.4.2	<i>Proliferación celular</i>	59
7.5	DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTES MEDIANTE CBA.	61
7.6	ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS T PRESENTES PBMCS CON CÉLULAS DENDRÍTICAS ACELERADAS.....	63
7.7	DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE MEMORIA DE LÍNEAS GENERADAS A PARTIR DE LINFOCITOS CD4 VÍRGENES ESTIMULADOS CON DCs PULSADAS CON PÉPTIDO.	64
7.8	CUANTIFICACIÓN DE LT-CD4+ ESPECÍFICOS PARA T*-1; QNT-6 Y QNT-Y GENERADOS DE LT VÍRGENES ESTIMULADOS CON DCs QUE PROCESAN Y PRESENTAN NATURALMENTE LOS PÉPTIDOS T1BT* Y T1BT*-Y.....	69
7.9	DETERMINACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA-DR β 1*04:01 EN RATONES TRANSGÉNICOS.	77
7.10	DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS EN SUERO DE RATONES POR ELISA	78
7.11	DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN DE IFN- γ POR ELISPOT A PARTIR DE ESPLENOCITOS DE RATONES TRANSGÉNICOS INMUNIZADOS CON T1BT* O T1BT*-Y	80
8	DISCUSIÓN	83
9	BIBLIOGRAFÍA	95
10	ANEXOS	99
10.1	SÍNTESIS DE PÉPTIDOS	99
10.2	PREPARACIÓN DE REACTIVOS ENSAYOS DE UNIÓN	100
10.2.1	<i>Buffer de unión pH 5,5 5X</i>	100
10.2.2	<i>Diluciones utilizadas para la evaluación de la competición de los diferentes análogos de QNT-6 y péptidos truncados</i>	100
10.2.3	<i>Solución de revelado KPL</i>	101
10.3	AISLAMIENTO DE DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.....	101
10.4	PLANTILLA PARA EL ANÁLISIS DE LOS AMPLIFICADOS EN LA TIPIFICACIÓN DE BAJA RESOLUCIÓN	103
10.5	PLANTILLA PARA EL ANÁLISIS DE LOS AMPLIFICADOS EN LA TIPIFICACIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN	104
10.6	DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS UTILIZADAS EN LA ESTIMULACIÓN.	105
10.7	DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE CLASE II EN RATONES TRANSGÉNICOS DR4.	105
10.8	DISTRIBUCIÓN DE LAS DILUCIONES DE SUERO EN EL PLATO DE 96 POZOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS.....	106
10.9	DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS EN LOS PLATOS DE ELISPOT PARA LA RE-ESTIMULACIÓN	107
10.9.1	<i>Preparación sustrato AEC para ELISPOT</i>	107

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de procesamiento y presentación del antígeno.....	6
Figura 2. Presentación del antígeno vía MHC clase II.	7
Figura 3. Función de la cadena invariante asociada a MCH II y HLA-DM.....	8
Figura 4. Estructura de la proteína de circumsporozoito de <i>P. falciparum</i>	13
Figura 5. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50) de los análogos de Alanina de QNT-6.....	46
Figura 6. IC 50 promedio de los diferentes análogos de Alanina de QNT-6..	47
Figura 7. Gel de agarosa al 2% para la determinación de la tipificación de baja resolución.....	49
Figura 8. Gel de agarosa al 2% para la determinación de la tipificación de alta resolución.....	53
Figura 9. Determinación de la expresión de CD27 y CD69 en las líneas celulares HLA-DRβ1*0401 tras la doble estimulación con DCs pulsadas con péptido.....	59
Figura 10. Proliferación por CFSE de líneas celulares HLA-DRβ1*0401 tras la estimulación con péptidos..	60
Figura 11. Determinación de citoquinas en sobrenadantes mediante CBA..	62
Figura 12. Cuantificación de IL-10 y TNF-α en sobrenadantes de la línea T1BT* tras su re-estimulación con los péptidos T*-1; QNT-6 o QNT-Y.....	64
Figura 13. Distribución de las subpoblaciones vírgenes y de memoria mediante el uso de los marcadores CD62L y CD45RO.....	66
Figura 14. Determinación del perfil de memoria de las líneas generadas a partir de linfocitos T CD4 vírgenes tras su estimulación con DCs pulsadas con péptidos.....	67
Figura 15. Porcentaje de células tetrámero positivas en las líneas generadas a partir de LT-CD4+ vírgenes pulsados inicialmente con T1BT* y T1BT*-Y tras dos re-estimulaciones con QNT-Y, QNT-6 y sin péptido como control.	68
Figura 16. Pérdida de la expresión de CD27 en células tetrámero positiva luego del re-estimulo con diferentes péptidos.....	69
Figura 17. Subpoblaciones de memoria generadas en las líneas para T1BT* y T1BT*-Y..	71
Figura 18. Porcentaje de células CD4+, tetrámero QNT-6 positivas.....	71
Figura 19. Células Tetrámero positivas para QNT-6 en células vírgenes y en las sub-poblaciones de memoria central y efectora.	74
Figura 20. Expresión de CD27 en las subpoblaciones de memoria central (TCM) y memoria efectora (TEM) de las líneas generadas con T1BT* y T1BT*-Y.	76
Figura 21. Producción de IFN-γ en los sobrenadantes de las líneas generadas con T1BT* y T1BT*-Y.....	77
Figura 22. Curvas que muestran los títulos de anticuerpos contra la epítotope B (NANP) presentes en el suero de los ratones inmunizados..	79
Figura 23. Determinación por ELISPOT del número de células productoras de IFN-γ en los bazo de diferentes ratones inmunizados..	81

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de análogos de Alanina de QNT-6 utilizados para la definición del registro de unión de QNT-6 a HLA-DR4.....	22
Tabla 2. Listado de péptidos truncados utilizados para confirmar la importancia del residuo de anclaje en P1 y aminoácidos cercanos.....	23
Tabla 3. Resultado de la tipificación de baja resolución DR4 en los diferentes voluntarios.....	50
Tabla 4. Resultado de la tipificación de alta resolución de los voluntarios DR4. . .	54
Tabla 5. Resultado del alineamiento múltiple de los diferentes haplotipos encontrados en los voluntarios utilizando el programa ClustalW..	55
Tabla 6. Comparación del resultado de los alineamientos de los diferentes alelos DR4.....	56
Tabla 7. Resultado de la predicción de unión de los diferentes péptidos a los diferentes haplotipos..	57
Tabla 8. Porcentaje de células CD4+ para cada uno de los tetrámeros utilizados.	72
Tabla 9. Porcentaje de células tetrámero positivas para los diferentes péptidos en las diferentes sub-poblaciones de LT.....	75
Tabla 10. Título de anticuerpos contra NANP presentes en los sueros de los ratones inmunizados.	79

ABREVIATURAS

APC: alofococyanina.

CBA: Cytometric Bead Array

CLIP: Péptido de la cadena invariable residuos 90 a 103

CPA: Células Presentadoras del Antígeno

CS: Proteína del circumsporozoito del esporozoito de *P. falciparum* (NF 54, África)

CFSE: Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (ester carboxifluorescein succinimidil diacetato)

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DCs: Células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica.

DR4: Alelo HLA-DR β 1*0401

ELISPOT: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent SPOT* (ensayo de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas)

HLA: *Human Leukocyte Antigens* (Antígenos Leucocitarios Humanos)

DM: Molécula chaperona del procesamiento en clase II HLA-DM

HA: péptido de hemaglutinina

Ii: cadena invariable

IFN- γ : Interferón gama

LT-CD4+: Linfocito T CD4+ ayudador o helper

MHC: *Major Histocompatibility Complex* (Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad)

pMHC: *Complejo MHC péptido*

PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Célulass* (leucocitos de sangre periférica)

P. falciparum: *Plasmodium falciparum*

QNT-6: Péptido 332 QNSLSTEWSPCSVT345

QNT-Y: Péptido análogo L335Y del péptido QNT-6: 332 QNSYSTEMWSPCSVT345

T*: Péptido 326EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT345 de la proteína CS de *P. falciparum* variante NF54 del África

T*-1: Péptido 327YLNKIQNSLSTE338

T1BT*: contienen la epítotope T1 (DPNANPNVDPNANPNV) tres copias de la epítotope B de la proteína CS (repeat NANP) seguidas de la epítotope T* (DPNANPNVDPNANPNV(NANP)₃EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT).

T1BT*-Y: contiene la secuencia T1B seguida de la secuencia T*-Y (DPNANPNVDPNANPNV(NANP)₃EYLNKIQNSYTEWSPCSVT) conteniendo QNT-Y.

TCR: *T Cell Receptor* (Receptor de la Célula T para el antígeno).

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Definir parámetros que determinen inmunodominancia de epítopes para LT-CD4+ es fundamental para el diseño de vacunas. Evidencias recientes sugieren que la estabilidad cinética de complejos MHC clase II/péptido formados en presencia de DM y su inmunodominancia están relacionados; sin embargo, hasta ahora estas evidencias han sido comprobadas con antígenos modelo en ratón pero no en candidatos a vacunas para uso humano. T* (₃₂₆EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT₃₄₅) es un péptido de 20 aminoácidos de la proteína de circumsporozoito (CS) de *P. falciparum*, que en distintos estudios clínicos ha demostrado estimular LT-CD4+ contra el parásito en individuos vacunados HLA-DR1, -DR4, -DR7 y -DR11 (75% de la población) por lo cual es un excelente candidato a vacuna contra la malaria. T* posee 2 epítopes DR4: T*-1 (₃₂₇YLNKIQNSLSTE₃₃₈) estable en presencia de DM/inmuno-dominante y QNT-6 (₃₃₂QNSLSTEWSPCSV₃₄₅) inestable/críptica. En este trabajo, utilizando el análogo L335Y de QNT-6 (péptido QNT-Y) que se une establemente a DR4 en presencia de HLA-DM, perseguimos demostrar por primera vez que en este candidato a vacuna contra la malaria existe una relación entre la estabilidad cinética a HLA-DM de complejos MHC clase II/péptido y su inmunogenicidad. Además, el demostrar que un cambio puntual en la secuencia QNT-6 le confiere a esta secuencia alta inmunogenicidad validaría la estrategia de identificar cambios puntuales en epítopes inestables que mejoren su estabilidad cinética como principio importante a tener en cuenta en el diseño de nuevas y mejores vacunas.

2 JUSTIFICACIÓN

Por la simplicidad para su síntesis, bajo costo y su capacidad para generar respuesta inmune contra micro-organismos complejos, las vacunas basadas en péptidos químicamente hechos (vacunas sintéticas) son una importante alternativa para la inmuno-profilaxis de las enfermedades infecciosas en un futuro. Una vacuna ideal contra malaria debe promover una óptima activación de LT-CD4+ que estimulen no sólo a los Linfocitos B a producir anticuerpos contra el parásito sino que a su vez produzcan altos niveles de IFN- γ , una citoquina importante para controlar las formas del parásito que infectan el hígado. Para que los LT-CD4+ se activen es necesario que pequeños fragmentos del parásito de 10 a 30 aminoácidos llamados comúnmente epítopes CD4, sean presentados en moléculas MHC clase II sobre la superficie de las células infectadas. Un epítope CD4 ideal debería ser “universal”, es decir que pueda ser presentada por un amplio número de individuos con haplotipos MHC clase II distintos. Por su capacidad para unirse a múltiples haplotipos HLA clase II en el humano, el péptido T*, el cual es un fragmento de la proteína CS de *P. falciparum* (aislamiento NF54 de África) es considerado un epítope universal firme candidato a vacuna contra la malaria.

La caracterización de la epítope T* como candidato a vacuna contra la malaria ha sido un tema de interés en nuestra investigación no sólo por ser universal sino debido a que es uno de los pocos epítopes que han alcanzado su evaluación como vacuna en ensayos clínicos en voluntarios humanos. Nuestros resultados de la caracterización de la respuesta inmune en individuos vacunados con T* nos han demostrado que T* está conformado por dos epítopes, una localizada hacia la parte N-terminal de T* (epítope T*-1) que es altamente variable y la otra localizada hacia la parte C-terminal (epítope QNT-6) que es altamente conservada en numerosas cepas de *P. falciparum* aisladas de distintas partes del mundo. Si bien

el alto grado de conservación de la secuencia QNT-6 la hacen un excelente candidato a vacuna contra la malaria, distintos tipos de evidencia en nuestros trabajos sugieren que en individuos vacunados con T*, la epítotope conservada QNT-6 es un epítotope que estimula pobremente a los LT-CD4+ (es menos inmunogénica) cuando se le compara con la epítotope T*-1.

Teniendo en cuenta que la relación entre estabilidad cinética e inmunodominancia de epítotope aún no se ha demostrado en candidatos a vacunas para uso humano, aprovecharemos la existencia en T* de estos 2 epítotope (uno estable y otro inestable a HLA-DM), como modelo ideal para comprobar la importancia de la estabilidad cinética de epítotope y su capacidad para generar inmunidad.

Resultados recientes de un estudio adelantado por nuestro grupo con el fin de evaluar el papel que pudiese tener la estabilidad de complejos MHC clase II/QNT-6 en presencia de HLA-DM en la menor inmunogenicidad de este péptido, sugieren que la alta inestabilidad de los complejos MHC clase II/QNT-6 en presencia de HLA-DM in vitro podría ser en parte responsable de la poca inmunogenicidad de la epítotope QNT-6 en individuos humanos. En nuestra búsqueda de modificaciones de esta secuencia que mejoren la estabilidad de los complejos MHC clase II/QNT-6 formados en presencia de HLA-DM, recientemente hemos tenido éxito en identificar sustituciones en el residuo de anclaje de este péptido al bolsillo P-1 de la molécula MHC clase II (péptido QNT-Y) que le confiere a los complejos MHC clase II/QNT-Y una alta estabilidad a HLA-DM in vitro. Si bien se espera que por generar complejos más estables en presencia de HLA-DM la epítotope QNT-Y sea mejor inmunógeno que la epítotope QNT-6 y por ende una mejor vacuna contra la malaria, los experimentos que demuestren la mejor inmunogenicidad de QNT-Y para los LT-CD4+ aún no han sido realizados.

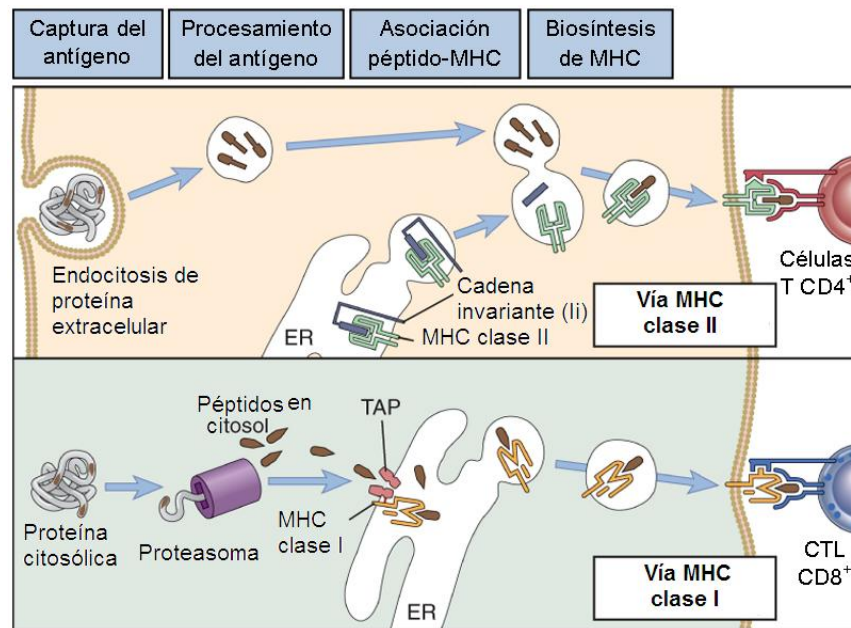
Por lo anterior, los experimentos propuestos en el presente trabajo persiguen demostrar que en presencia de HLA-DM la epítotope QNT-Y es mejor epítotope que

QNT-6, ya que estimula mucho más eficientemente a LT-CD4+ a producir IFN- γ , una citoquina necesaria para el control de las formas hepáticas del parásito. Si logramos demostrar lo anterior, esto sugeriría que sí existe una relación directa entre la estabilidad cinética de complejos MHC clase II/péptido y la capacidad de un antígeno para inducir una respuesta inmune protectora contra un patógeno, lo cual tendría importantes implicaciones para el diseño de vacunas basadas en péptidos no sólo contra la malaria sino en general contra cualquier agente infeccioso.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Aspectos generales de la formación de complejos péptidos con moléculas MHC.

Un paso crucial en la generación de respuesta inmune adaptativa es la presentación sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA) de fragmentos proteolíticos unidos a las moléculas MHC, formando complejos MHC/péptido que interactúan con el receptor de antígeno de la célula T (TCR), que permite la generación y proliferación de poblaciones de células T péptido específicas. La presentación de fragmentos peptídicos en el contexto de moléculas MHC clase I o II está determinado por el compartimiento intracelular en donde se forman los complejos MHC/péptido dentro de la CPA. Mientras los complejos de péptidos con moléculas clase II (HLA-DR, -DP y -DQ del humano) se forman luego de la proteólisis de antígenos extracelulares en la vía endocítica (endosomas y lisosomas), los complejos de péptido con moléculas clase I (HLA-A, -B, -C los mejor estudiados en el humano) se forman a expensas de péptidos generados en el citosol luego de la degradación de proteínas por el proteosoma (Figura 1) [1].

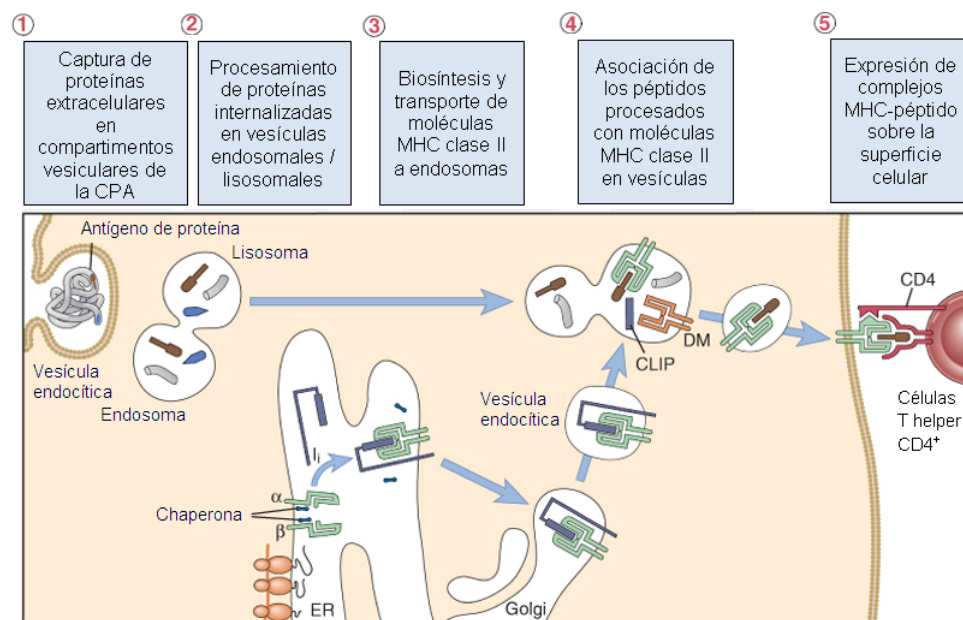


Modificado de Abbas et al. Inmunología Celular y Molecular. 6 Edición.

Figura 1. Vías de procesamiento y presentación del antígeno. En la vía MHC clase II (panel superior), antígenos de proteínas extracelulares son endocitados en vesículas, donde los antígenos son procesados y los péptidos son unidos a moléculas de MHC clase II. En la vía de clase I (panel inferior), los antígenos de proteínas en el citosol son procesados por proteosomas y los péptidos son transportados al retículo endoplasmático donde se unen a las moléculas MHC de clase I.

El paso inicial en la presentación de antígenos proteínicos en moléculas MHC clase II se da por la internalización del antígeno por una CPA. Esta internalización se puede dar por receptores específicos para el antígeno (ejemplo: Ig de superficie sobre los Linfocitos B), o por mecanismos como micro-pinocitosis, fagocitosis o por endocitosis mediada por receptores (receptores Fc o receptores CR1, CR2 o CR3 que internalizan antígenos opsonizados por anticuerpos o fracciones del complemento respectivamente), o en vesículas cubiertas por clatrina. Los antígenos son internalizados en vesículas llamadas endosomas. El tráfico endosomal de los antígenos endocitados continúa hasta que el endosoma se fusiona con el lisosoma, un organelo con características estructurales y contenido enzimático bien definidos. El siguiente paso en la presentación de antígenos en la ruta endocítica es el procesamiento del antígeno el cual es dependiente del tiempo, en un pH ácido (pH 4.5 a 5.0) propio de los lisosomas, requerido para la

acción proteolítica de proteasas tipo catepsinas [2]. El procesamiento de un antígeno proteínico genera péptidos por lo general entre 12 y 30 residuos de longitud capaces de unirse al bolsillo de la molécula MHC clase II. Después que el antígeno proteico ha sido procesado, este se une dentro de compartimentos endosomales y lisosomales a las moléculas MHC clase II presentes en estas vesículas y estos complejos viajan en vesículas para ser presentados sobre la superficie celular (Figura 2).

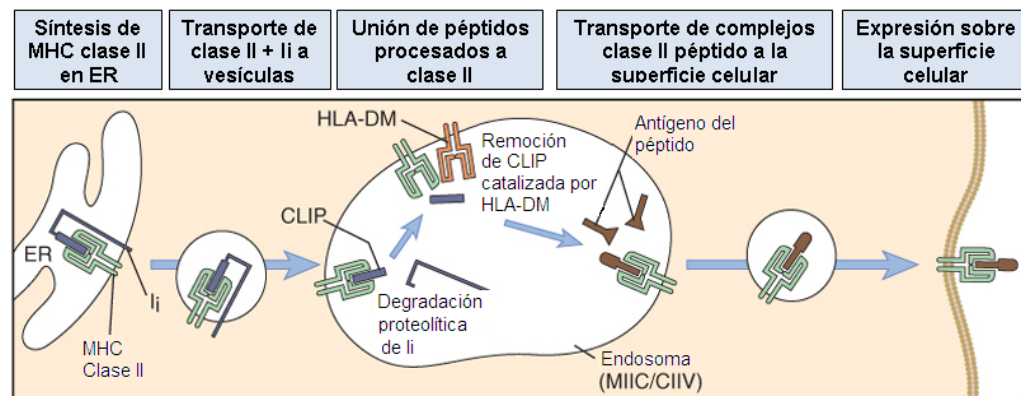


Modificado de Abbas et al. Inmunología Celular y Molecular. 6 Edición.

Figura 2. Presentación del antígeno vía MHC clase II. Estados numerados en el procesamiento de antígenos extracelulares corresponde a los estados descritos en el texto.

In vivo, el cargado de los péptidos en las moléculas MHC clase II es regulado por moléculas accesorias. En el retículo endoplasmático los nuevos dímeros MHC clase II rápidamente se asocian con la cadena Invariante (Ii) para formar un complejo $(\alpha/\beta)_3Ii_3$. Los residuos 90 a 103 de Ii ocupan completamente el bolsillo de las MHC clase II, inhibiendo la unión prematura de péptidos, a su vez el tallo citoplasmático de Ii sirve de señal para que el complejo formado migre a los

compartimentos endosomales. Después del transporte del complejo (alfa/beta)₃Ii₃, en el endosoma tardío las proteasas degradan la cadena invariante (Ii), dejando en el bolsillo de las moléculas clase II, una familia de péptidos llamada CLIP [3]. La liberación de estos péptidos es requerida para el cargado de otros péptidos y generalmente se necesita que la molécula HLA-DM promueva la disociación de péptidos similares a CLIP (péptidos con una alta tasa de disociación) en un proceso que es dependiente del pH ácido. De esta manera DM es una molécula que cataliza el intercambio de péptidos en el bolsillo de las moléculas MHC clase II (Figura 3).



Modificado de Abbas et al. Inmunología Celular y Molecular. 6 Edición.

Figura 3. Función de la cadena invariante asociada a MCH II y HLA-DM. Moléculas de clase II con la cadena invariante unida, o CLIP, son transportadas en vesículas, donde CLIP es removido por la acción de DM. Péptidos antigénicos generados en las vesículas son luego capaces de unirse a moléculas de clase II. Otras proteínas semejantes a clase II, llamadas HLA-DO, pueden regular la remoción de CLIP catalizada por DM. CIIV, vesículas de clase II.

Estudios preliminares muestran que células deficientes en DM, acumulan en la superficie celular moléculas MHC clase II cargadas con CLIP [4]. In vitro DM promueve la liberación de CLIP y de otros péptidos endógenos unidos al bolsillo de las MHC clase II, favoreciendo la formación de complejos MHC clase II/péptido altamente estables. La regulación de este mecanismo de edición de unión de péptidos a moléculas MHC clase II por HLA-DM, se da posiblemente gracias a la

asociación de HLA-DM con la cara lateral del complejo MHC clase II/péptido hacia el bolsillo P1 (aquella que da hacia el extremo amino terminal del péptido antigénico acomodado en la hendidura de unión de péptidos de la molécula de clase II) [5]. El péptido es enlazado al heterodímero clase II en una conformación extendida, sobre una hendidura que tiene varios bolsillos que pueden acomodar las cadenas laterales de los residuos del péptido que permiten su anclaje sobre la molécula MHC clase II [6]. Por estudios estructurales hechos mediante cristalografía se han identificado cuatro bolsillos principales conocidos como P1, P2, P4 y P9, cuyas características han sido bien descritas [7]. Estos estudios también muestran que la formación del complejo MHC clase II/péptido implica que se establezca una red de puentes de hidrógeno que contribuyen a su estabilidad, esta se da entre residuos conservados de la molécula clase II y átomos de la cadena principal del péptido [8]. Análisis cinéticos del complejo molécula MHC clase II/péptido, revelan que en general estos complejos presentan una tasa de asociación lenta y una tasa de disociación variable dependiente de la estabilidad del complejo, que puede abarcar desde perfiles monofásicos hasta multifásicos atribuibles a la formación de complejos cinéticos intermediarios [9, 10]. Estudios recientes han demostrado que la estabilidad cinética intrínseca de los complejos MHC clase II/péptido, se correlaciona de manera importante con los efectos de la función editora de la molécula DM dentro de la célula presentadora de antígeno (CPA), y a su vez parece existir una relación directa entre la estabilidad, inmunogenicidad e inmuno-dominancia de estos complejos durante la respuesta inmune in vivo [11].

Una vez formado el complejo MHC clase II/péptido, éste sale a la superficie de la membrana en la CPA, donde queda disponible para que interactúe con el receptor de antígeno de la célula T (TCR). Esta interacción sirve de señal para desencadenar una serie de reacciones en las que participan moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 [12], que van a favorecer la generación de clones de células T específicos del antígeno presentado por la CPA a la célula T.

Hoy se sabe que para generar una adecuada respuesta de LT-CD4+ es necesario la formación de complejos MHC clase II/péptido con alta estabilidad cinética [13]. Resultados nuestros y de otros laboratorios indican que es posible diseñar péptidos que tengan una mejor capacidad de unión respecto a la secuencia nativa [14], haciendo modificaciones de los residuos de anclaje del péptido a la molécula MHC clase II, basándose en el conocimiento que se tiene de la estructura de los bolsillos de unión de las molécula MHC, o en el uso de algoritmos de predicción de unión de péptidos los cuales se fundamentan en la consideración de varios parámetros que evalúan experimentalmente la estabilidad de complejos MHC/péptido [15]. Por lo anterior hoy en día se considera que es posible modular la estabilidad de los complejos MHC clase II/péptido favoreciendo el aumento o disminución de la inmunogenicidad e inmuno-dominancia de las epítopes [13].

3.2 Importancia de la estabilidad cinética de complejos MHC clase II/péptido en la inmunogenicidad de antígenos peptídicos.

La respuesta inmune de LT-CD4+ a un antígeno está determinada por múltiples factores. La estructura del antígeno, el número de copias presentes, el procesamiento proteolítico, el cargado del péptido en las moléculas MHC clase II, los factores relacionados con la activación de la célula T, la frecuencia de precursores y la avidéz del receptor de la célula T por los complejos MHC/péptido son factores que han sido postulados como importantes en la inmuno-dominancia de los antígenos. HLA-DM interactúa directamente con el complejo MHC clase II/péptido dando como resultado una conformación que permite el intercambio de péptidos, esto ha sido explicado por algunos como un papel de HLA-DM en la edición de los péptidos que se unen a una molécula MHC clase II. La función original de HLA-DM se estableció en líneas celulares deficientes en HLA-DM las cuales se caracterizaban por expresar sobre la superficie moléculas MHC-clase II

Importancia de la estabilidad cinética de complejos HLA clase II/péptido formados en presencia de HLA-DM en la inmuno-dominancia de un epítope universal candidata a vacuna contra la malaria.

cargadas con CLIP. Posteriormente el trabajo de varios investigadores estableció que HLA-DM tenía la función de catalizar la remoción de CLIP de la hendidura de unión de la molécula MHC clase II, favoreciendo el cargado de estas moléculas con péptidos generados por proteólisis en los compartimentos de la vía endocítica (endosomas y lisosomas). Recientemente se ha sugerido una mayor estabilidad cinética de complejos MHC con epítopes inmuno-dominantes con respecto a aquella de complejos formados con epítopes no dominantes (también llamados epítopes crípticos) en la presencia de HLA-DM [16]. Estos resultados han llevado a los investigadores a sugerir un importante papel de HLA-DM en la modulación de la inmuno-dominancia e inmunogenicidad de epítopes debido a su acción en el cargado de las moléculas MHC clase II con péptidos. En tal sentido, además de la importancia de DM en modular el reconocimiento de epítopes crípticas, el estudio de las bases de la crípticidad de las epítopes ha demostrado que la estabilidad de los complejos MHC/péptido de epítopes inmunodominantes y crípticos es distinta. Mientras la disociación de las primeras toma varias horas, la vida media de las segundas es de unos pocos minutos [17]. Lo anterior demuestra una dicotomía clara entre la estabilidad cinética de los complejos inmuno-dominantes (favorecida por HLA-DM) y los crípticos (antagonizada por HLA-DM). De esta manera estas evidencias sugieren un efecto de HLA-DM en la inmuno-dominancia de complejos MHC clase II/péptido para LT-CD4+ atribuible a la estabilidad cinética del complejo.

Experimentos dirigidos a tratar de establecer el papel de HLA-DM en la inmuno-dominancia e inmunogenicidad de epítopes reconocidos por LT-CD4+, demuestran que cambios en los residuos de anclaje de los péptidos a las moléculas MHC clase II son importantes en esta inmuno-dominancia. Los datos experimentales demuestran claramente que la inmunogenicidad de un péptido puede ser modulada positiva o negativamente por cambios puntuales en el péptido que modulan su interacción con la molécula MHC clase II (cambios en los aminoácidos del péptido que se anclan en los bolsillos de unión P1, P4, P6 y P9

de la molécula MHC clase II) [17]. Para que un epítipo inmuno-dominante exitosamente estimule LT-CD4+ esta debe superar cuatro procesos: el cargado sobre la molécula de MHC clase II, el transporte a la superficie de la célula presentadora de antígeno, ser estable en el complejo durante la migración de la célula que presenta el antígeno (célula dendrítica) al nódulo linfático y finalmente tener la capacidad para alcanzar un umbral de señalización del TCR del LT-CD4+ que lo reconoce. Por todo lo anterior la estabilidad del complejo favorecido por HLA-DM quizás garantice la formación de complejos lo suficientemente estables para que superen estos cuatro niveles de dificultad que tienen que remontar las epítopes que van a ser presentadas a los LT-CD4+. La inmuno-dominancia e inmunogenicidad de epítopes estaría explicada en parte por el ensamblaje de complejos MHC clase II/péptido altamente estables, formados en presencia de HLA-DM, los cuales viajan desde la vía endocítica a la superficie de la CPA asegurando una alta densidad de complejos sobre la superficie que permanecen por largos periodos de tiempo aumentando la posibilidad de su reconocimiento por TCRs de LT-CD4+ que los reconocen. Estos resultados tienen importantes implicaciones en el diseño de vacunas, debido a que sugieren que la manipulación de las propiedades cinéticas de la interacción de péptidos con moléculas MHC de clase II pueden ser traducidos directamente en ganancia de inmuno-dominancia.

3.3 Uso de la epítipo T* de la proteína de Circumsporozoito (CS) de P. falciparum como candidato a vacuna contra la malaria.

La proteína CS de *P. falciparum* presente tanto en esporozoitos como en estadios hepáticos del parásito, es blanco de la respuesta inmune celular y humoral protectora contra este parásito [18]. Esta proteína está compuesta por aproximadamente 500 aminoácidos de los cuales cerca del 30% está representado por secuencias de 4 a 8 aminoácidos (NANP y NANPNVDP) que se

Importancia de la estabilidad cinética de complejos HLA clase II/péptido formados en presencia de HLA-DM en la inmuno-dominancia de un epítipo universal candidata a vacuna contra la malaria.

repiten en el centro de la proteína (Figura 4) conformando epítopes B lineales (péptidos reconocidos por linfocitos B) que son blanco de la respuesta de anticuerpos. Los primeros estudios con vacunas sintéticas utilizando péptidos de esta proteína demostraron que su uso en animales inmunizados generaba anticuerpos contra la región repetitiva que neutralizaban la infectividad del esporozoito a los hepatocitos.

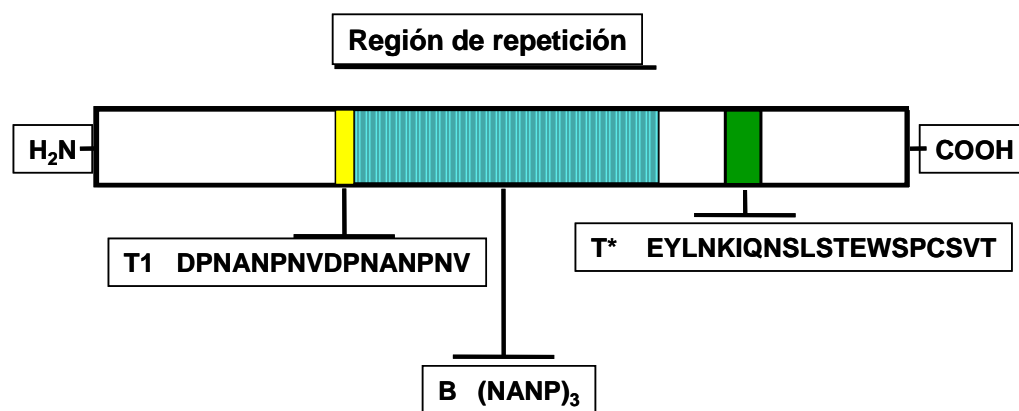


Figura 4. Estructura de la proteína de circumsporozoito de *P. falciparum*

El primer ensayo clínico utilizando el tetra-péptido NANP de la proteína CS conjugado a Toxoide-Tetánico demostró que la vacuna generaba anticuerpos neutralizantes contra el esporozoito en humanos [19]. Esta epítope B combinada con un epítope T (un epítope reconocida por linfocitos T) denominada T1 (DPNANPNVDPNANPNV) originalmente definido utilizando CD4 de voluntarios inmunizados con esporozoitos irradiados de *P. falciparum* [20] fue sintetizado químicamente en forma de MAP (Múltiple Antigenic Peptide) [21] de forma que los epítopes T y B fueron sintetizados anclados a un núcleo de lisinas. Esta vacuna indujo altos títulos de anticuerpos contra el esporozoito e inmunidad protectora en modelos murinos de malaria [22].

Posteriormente, Nardin y colaboradores [23] adelantaron un ensayo Fase I en voluntarios con la vacuna (T1B)4-MAP que generó títulos de anticuerpos anti-esporozoitos más altos comparados con los inducidos en voluntarios expuestos a la picadura de cientos de mosquitos infectados con esporozoitos de *P. falciparum* [24]. No obstante este resultado, el fenotipo de respuesta fue genéticamente restringido a fenotipos MHC clase II encontrados en el 25-35% de la población dependiendo del background genético. Con el fin de identificar un epítotope T en la proteína CS reconocida por un número más amplio de haplotipos HLA, Moreno y colaboradores utilizaron clones CD4+ derivados de varios voluntarios inmunizados con esporozoitos irradiados de *P. falciparum* quienes se protegieron contra el reto con esporozoitos [20]. Estos clones reconocieron un epítotope en el extremo C-terminal de la proteína CS cuya respuesta estaba dada por un amplio rango de moléculas de clase II. Los péptidos representativos de este epítotope designado T* (Figura 4), también se unían con alta afinidad a múltiples moléculas MHC clase II del humano in vitro (haplotipos HLA-DR y HLA-DQ), por lo cual se ha considerado la epítotope T* como universal [25].

Un ensayo Fase I fue realizado por Nardin y colaboradores para investigar la seguridad e inmunogenicidad de las 3 epítotopes (T1BT*) en 10 voluntarios con diferentes tipos de HLA. La polioxima designada (T1BT*)4-P3C, incluyó una polioxima sintética que sirvió como adyuvante [26]. En éste estudio, 7 de los 10 voluntarios inmunizados con la polioxima desarrollaron LT-CD4+ específicos para el epítotope T* y altos títulos de anticuerpos contra el epítotope B que neutralizó eficazmente la invasión al hepatocito de esporozoitos de *P. falciparum*. La excelente correlación entre la respuesta celular contra el epítotope T* por LT-CD4+ (medida como producción de IFN- γ) y la inducción de altos títulos de anticuerpos contra la epítotope B (NANP) facilitados por estos linfocitos que fue evidente en individuos con haplotipos HLA muy distintos, confirmó que esta es un epítotope universal, lo cual había sido sugerido previamente por ensayos in vitro que demostraron la capacidad de T* para unirse con alta afinidad a haplotipos HLA

expresados por el 75% de la población [25]. Una vez caracterizada la epítope T* por Moreno y colaboradores [20], la inmunogenicidad de esta epítope ha sido comprobada no sólo en individuos que viven en áreas endémicas de malaria [27], sino además en individuos vacunados con RTS,S, un polipéptido recombinante que contiene T* y que expresado en viriones del virus de Hepatitis B se ha utilizado como vacuna en numerosos individuos [28].

Siendo T* un péptido de 20 aminoácidos cabe la posibilidad de que dentro de él exista más de un epítope. En dos estudios recientes hechos por nuestro grupo utilizando clones de LT-CD4+ aislados de individuos vacunados con T* en el ensayo clínico fase I de vacunación con la polioxima [26], se estudió la especificidad fina de LT-CD4+ específicos para T*. Esto permitió demostrar la existencia de dos epítopes dentro de T* que desde entonces hemos denominado T*-1 (N-terminal de T*) y QNT-6 (C-terminal de T*) ([29] y Parra-López y colaboradores, manuscrito en preparación). El análisis de la especificidad de LT-CD4+ específicos para T* permitió evidenciar que LT-CD4+ específicos para las dos epítopes pueden ser aislados de un número amplio de individuos vacunados con T* [29, 30].

3.4 Estudios de la inmunogenicidad del péptido QNT-6 (región C-terminal de T*).

Durante el estudio de la especificidad por el antígeno de linfocitos de memoria específicos para el péptido T* en voluntarios humanos vacunados con tres dosis de T*, recientemente se pudieron evidenciar dos epítopes en T*, una ubicada hacia el extremo amino terminal altamente variable (epítope T*-1 (₃₂₇YLNKIQNSLSTE₃₃₈)) y la otra en el extremo carboxi-terminal altamente conservada (epítope QNT-6 (₃₃₂QNSLSTEWSPCSV₃₄₄)), que se unen al alelo

Importancia de la estabilidad cinética de complejos HLA clase II/péptido formados en presencia de HLA-DM en la inmunodominancia de un epítope universal candidata a vacuna contra la malaria.

HLA-DR β 1*0401 (DR4). La caracterización por Calvo-Calle y colaboradores [30], de un número amplio de clones de linfocitos T específicos para estas dos epítopes en voluntarios DR4 vacunados con tres dosis de una vacuna que contenía T*, evidenciaron que mientras los LT-CD4+ que reconocen la epítope T*-1 son detectados en sangre dos semanas después de la tercera dosis (día 98), los clones que reconocen la epítope QNT-6 son detectados preferentemente hacia el día 373 (10 meses) luego de la tercera dosis de vacuna [29, 30]. Además de la diferencia en el tiempo de aparición en sangre de los dos tipos de clones, su tinción con complejos DR4/péptido fluorescentes sugieren que la avidéz de los TCRs de LT-CD4+ específicos por complejos DR4/QNT-6 es menor que aquella de los TCRs específicos para los complejos DR4/T*-1 (Parra-López y colaboradores en preparación) (avidéz es un término comúnmente utilizado para medir la fuerza con la que interactúa el TCR de un linfocito T con complejos MHC clase II/péptido reconocidos por este). En conjunto, estos dos tipos de evidencia sugieren una menor inmunogenicidad in vivo de la secuencia QNT-6 cuando se compara con la secuencia T*-1.

La secuencia del péptido QNT-6 que representa la parte C-terminal del péptido T* es altamente conservada en cepas de *P. falciparum* aisladas de diferentes partes del mundo [29, 30], lo cual la hace importante candidato para hacer parte de una vacuna contra la malaria basada en péptidos; sin embargo, evidencias experimentales recientes en nuestro laboratorio sugieren que la asociación de QNT-6 con moléculas HLA-DR genera complejos MHC clase II/péptido altamente inestables en presencia de HLA-DM in vitro (Parra-López y colaboradores., manuscrito en preparación). Esta inestabilidad probablemente explica la baja inmunogenicidad para LT-CD4+ de esta parte del péptido T* evidenciada recientemente en nuestros estudios en individuos vacunados con T* (Parra-López y colaboradores, manuscrito en preparación). No obstante el alto grado de conservación de esta secuencia en *P. falciparum*, la poca inmunogenicidad de QNT-6 para los LT-CD4+ pone en duda su utilidad como vacuna. En nuestra

Importancia de la estabilidad cinética de complejos HLA clase II/péptido formados en presencia de HLA-DM en la inmunodominancia de un epítope universal candidata a vacuna contra la malaria.

búsqueda de alternativas para rescatar esta epítope altamente conservada como candidato a vacuna contra la malaria, nuestro grupo realizó un tamizaje de modificaciones de esta secuencia para tratar de mejorar la estabilidad de los complejos formados por QNT-6 con la molécula DR4 en presencia de HLA-DM. Estos experimentos nos permitieron identificar con éxito sustituciones en el residuo de anclaje de este péptido al bolsillo P-1 de la molécula DR4 (cambio de L335Y: péptido QNT-Y), que le confiere a los complejos formados por este péptido una alta estabilidad en presencia de HLA-DM. Siguiendo una línea de pensamiento acorde con lo publicado por Lazarsky y otros [11, 17], en este proyecto nosotros proponemos un sistema de cultivo in vitro que esperamos nos permita demostrar que el péptido QNT-Y estimula más eficientemente a los LT-CD4+ y por lo tanto es un mejor candidato a vacuna contra malaria que la versión nativa inestable de esta secuencia (péptido QNT-6).

4 OBJETIVOS

4.1 *Objetivo general*

Comprobar la importancia de la estabilidad cinética de complejos HLA-DR4/péptido formados en presencia de HLA-DM en la inmunogenicidad para LT-CD4+ de péptidos sintéticos candidatos a vacuna.

4.2 *Objetivos específicos*

- Cuantificar la capacidad individual de las epítopes, T*-1/QNT-Y (estables) y QNT-6 (inestable en presencia de DM) para estimular LT-CD4+ específicos para T*.
- Comparar la sensibilidad de respuesta de LT-CD4+ específicos para T* cuando son re-estimados con diferentes concentraciones de los péptidos T*-1, QNT-6 y QNT-Y.
- Establecer si LT-CD4+ específicos para la epítope inestable QNT-6 (contenida en T*) reconocen la epítope QNT-Y (epítope análoga estable) con el fin de comprobar que existe reactividad cruzada entre estas dos epítopes.

5 RACIONAL

En modelos animales, el uso como vacuna de péptidos modificados con el fin de mejorar la estabilidad de complejos MHC clase II/péptido inestables en presencia de HLA-DM, ha mostrado ser una estrategia útil para aumentar la inmunogenicidad de epítopes inestables que son poco inmunogénicas para los LT-CD4+. En trabajos previos, hemos utilizado moléculas DR4 y HLA-DM purificadas y péptidos sintéticos con el fin de evaluar distintos parámetros que influyen en la estabilidad cinética de complejos formados entre la molécula DR4 y el péptido QNT-6. El estudio de la estabilidad cinética de los complejos DR4/QNT-6 ensamblados in vitro, nos ha permitido demostrar una alta inestabilidad del complejo debido a una rápida disociación de estos complejos en la presencia de la molécula HLA-DM. El haber encontrado que los complejos DR4/QNT-Y tienen una alta estabilidad en presencia de HLA-DM, nos ayudará en este trabajo para tratar de demostrar que el péptido análogo QNT-Y es mejor inmunógeno y por ende mejor candidato a vacuna contra la malaria que la secuencia QNT-6 no modificada. Utilizaremos un sistema de cultivo in vitro que permitirá comparar la capacidad de los péptidos QNT-Y y QNT-6 para activar eficientemente a los LT-CD4+. Este sistema in vitro aprovecha la capacidad excepcional de las células presentadoras de antígeno pulsadas con el péptido T1BT* para favorecer la generación in vitro de líneas celulares de LT-CD4+ específicas contra el péptido. Esperamos que las líneas celulares específicas para T* obtenidas, nos permitan demostrar dos cosas importantes para el futuro del péptido QNT-Y como candidato a vacuna contra la malaria: (i) que la mayor estabilidad de los complejos formados por el péptido QNT-Y con la molécula DR4 se ve reflejada en una mayor inmunogenicidad de la secuencia QNT-Y para los LT-CD4+ cuando se compara con la secuencia QNT-6 y (ii) que la secuencia modificada QNT-Y es eficientemente reconocida por LT-CD4+ específicos contra la secuencia nativa QNT-6 evidenciando que existe reactividad cruzada entre estas dos epítopes.

Todo esto nos llevaría a concluir sobre la importancia que tiene la estabilidad cinética de los péptidos con la inmunogenicidad generada para los LT-CD4+.

6 METODOLOGÍA

6.1 Síntesis de péptidos.

Diferentes análogos de alanina de QNT-6 fueron sintetizados con la metodología t-Boc, con el fin de realizar los ensayos de definición del registro de unión.

Péptidos T1BT* y T1BT*-Y fueron utilizados para forzar el procesamiento intracelular por células presentadoras profesionales de antígeno de las epítopes DR4 (T*-1; QNT-6 y QNT-Y), necesarias para generar complejos DR4/péptido requeridos para la expansión de LT-CD4+ específicos para estas epítopes. Mientras que la secuencia T1BT* contienen la epítope T1 (DPNANPNVDPNANPNV) tres copias de la epítope B de la proteína CS (repeat NANP) seguidas de la epítope T* (DPNANPNVDPNANPNV(NANP)₃EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT), la secuencia T1BT*-Y contiene la secuencia T1B seguida de la secuencia T*-Y (DPNANPNVDPNANPNV(NANP)₃EYLNKIQNSYSTEWSPCSVT).

Adicionalmente se sintetizaron los péptidos T*-1 (YLNKIQNSLSTE), QNT-6 (QNSLSTEWSPCSV) y QNT-Y (QNSYSTEWSPCSV) para ser utilizados durante la re-estimulación.

Todos los péptidos fueron sintetizados por la compañía Twentyfirst Century Biochemicals, Inc Marlboro, MA, USA empleando la metodología t-Boc en fase sólida [31]. Los valores del peso molecular de los diferentes péptidos sintetizados arrojados por el análisis de masas se muestran en el Anexo 12.1.

6.2 Definición del registro de unión de QNT-6 a HLA-DR4

Con el fin de determinar que aminoácidos de la secuencia del péptido QNT-6 son importantes como residuos de anclaje a la molécula HLA-DRβ1*0401, se

Importancia de la estabilidad cinética de complejos HLA clase II/péptido formados en presencia de HLA-DM en la inmunodominancia de un epítope universal candidata a vacuna contra la malaria.

realizaron ensayos de competición entre el péptido de HA biotinado y cada uno de los análogos de QNT-6 en los cuales se sustituyó cada residuo de la secuencia por Alanina como se describe en la Tabla 1. Adicionalmente se sintetizaron péptidos truncados de QNT-6 en los que se habían removido aminoácidos del extremo amino y carboxi terminal, para de igual forma evaluar su competición.

	Péptido Análogo	Secuencia
1	QN=QNT-6	Ac-QNSLSTEWSPCSVT-amida
2	QN-Q332	Ac-ANSLSTEWSPCSVT-amida
3	QN-N333	Ac-QASLSTEWSPCSVT-amida
4	QN-S334	Ac-QNALSTEWSPCSVT-amida
5	QN-L335	Ac-QNSASTEWSWPCSVT-amida
6	QN-S336	Ac-QNSLATEWSWPCSVT-amida
7	QN-T337	Ac-QNSLSAEWSWPCSVT-amida
8	QN-E338	Ac-QNSLSTAWSPCSVT-amida
9	QN-W339	Ac-QNSLSTEASWPCSVT-amida
10	QN-S340	Ac-QNSLSTEWAPCSVT-amida
11	QN-P341	Ac-QNSLSTEWSACSVT-amida
12	QN-C342	Ac-QNSLSTEWSPASVT-amida
13	QN-S343	Ac-QNSLSTEWSPCAVT-amida
14	QN-V344	Ac-QNSLSTEWSPCSAT-amida
15	QN-T345	Ac-QNSLSTEWSPCSVA-amida

Tabla 1. Listado de análogos de Alanina de QNT-6 utilizados para la definición del registro de unión de QNT-6 a HLA-DR4.

	Péptido truncado	Secuencia
1	QN-334-345	Ac-SLSTEWSPCSVT-amide
2	QN-332-343	Ac-QNSLSTEWSPCS-amide
3	QN-335-343	Ac-LSTEWSPCS-amide
4	QN-336-343	Ac-STEWSPCS-amide

Tabla 2. Listado de péptidos truncados utilizados para confirmar la importancia del residuo de anclaje en P1 y aminoácidos cercanos.

Ensayos de competición de péptidos a la molécula DR4 se realizaron en buffer de unión pH 5,5 preparado como se describe en el Anexo 12.2.1 y utilizando 0,05 μM de DR4; 0,025 μM de HA Biotinado y los péptidos análogos y truncados de QNT-6 utilizados como péptidos competidores a diferentes concentraciones entre (0 y 100 μM) en un volumen final de 75 μL .

Se prepararon las diferentes concentraciones de los análogos de QNT-6 haciendo diluciones 1 en 5 de los péptidos en platos de 96 pozos de fondo redondo como muestra en el Anexo 12.2.2. La reacción se incubó a 37°C durante 72 horas.

Previamente, se recubrieron platos de ELISA de 96 pozos de fondo plano con 50 μL de anticuerpo de captura LB3.1 (preparado a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1X). LB3.1 es un anticuerpo anti-DR que se utilizó como anticuerpo de captura para fijar el complejo DR4/péptido al plato. El anticuerpo se fijó al plato a 4°C toda la noche. Al día siguiente se hicieron 3 lavados del plato con PBS 1X-tween al 0,05%, para eliminar el anticuerpo de captura no unido al plato. Luego se adicionaron 100 μL de BSA al 0,25% en PBS 1X a cada pozo para bloquear el plato y evitar las uniones inespecíficas. La solución de bloqueo se dejó a temperatura ambiente por 2 horas seguidas de 3 lavados del plato con PBS 1X-tween al 0,05%.

Sesenta μL (60 μL) de cada reacción de competición fueron adicionados a cada pozo del plato de 96 que tenía unido el anticuerpo LB3.1. Luego de 2 horas a temperatura ambiente, el plato fue lavado 3 veces con PBS 1X-tween al 0,05% y 50 μL de solución de estreptavidina 1:1000 (Kirkegaard Perry Laboratories KPL, Maryland) en PBS 1x fueron adicionados a cada pozo e incubados por 1 hora a temperatura ambiente.

Luego se hicieron 2 lavados con PBS 1X-tween 0,05% y un lavado final con PBS 1X. El plato se dejó secó invirtiéndolo sobre un papel absorbente. Posteriormente se adicionaron 150 μL de solución de revelado KPL preparada como se describe en el Anexo 12.2.3. El plato fue incubado a 37°C por 30 minutos en oscuridad. Finalizado el tiempo de incubación se leyó el plato en un lector de ELISA a 415 nm. Los datos fueron analizados utilizando el programa KaleidaGraph 4.0 para la determinación del IC50 de cada uno de los péptidos.

6.3 Aislamiento de DNA a partir de sangre periférica.

Se aisló DNA a partir de células de sangre periférica de donantes mediante la utilización del kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante, los resultados de concentración y pureza de los DNAs obtenidos se encuentran en el Anexo 12.3.

6.4 Tipificación HLA.

Para tipificar el alelo HLA-DR β 1*0401, a partir del DNA extraído de células de sangre de los voluntarios se utilizaron dos kits de tipificación, uno de baja

resolución (Biotest DRB SSP Kit, Biotest) que permite identificar alelos del grupo alélico DRB1*04, y el otro kit de alta resolución (AllSet+™ Gold SSP DRB1 Locus High Res Kit, Invitrogen) que permite la genotipificación a nivel alélico del locus HLA-DRβ1*04:01. Ambos kits utilizan técnicas basadas en reacciones de PCR que utilizan cebadores específicos de secuencias. La asignación de los alelos se realiza verificando por medio de electroforesis en gel de agarosa si la amplificación de un producto del tamaño esperado se ha producido.

6.4.1 Tipificación de baja resolución.

Por cada DNA a tipificar se preparó una mezcla maestra conteniendo:

- Coctel de PCR 120 µL
- Taq DNA polimerasa (5U/uL) 1,8 µL
- Agua desionizada 150 µL

Una vez agitada la mezcla, se adicionaron 10 µL en el primer pozo de la placa de PCR correspondiente al control negativo marcado con negro. Luego se adicionaron a la mezcla maestra, 30 µL de DNA precalentado a 65°C por 30 minutos con una concentración superior a 50 ng/mL y un cociente A260/A280 ≥1,6 y se agitó. A partir de esta mezcla se dispensaron 10 µL en cada uno de los 23 tubos restantes conteniendo la mezcla de cebadores secos. Los tubos fueron sellados y sometidos al proceso de PCR con el siguiente programa:

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Acción
Paso de desnaturalización A	94	2 minutos	Desnaturalización
10 ciclos	94	10 segundos	Desnaturalización Hibridación y Extensión
	65	60 segundos	
20 ciclos	94	10 segundos	Desnaturalización Hibridación Extensión
	61	50 segundos	
	72	30 segundos	

Una vez finalizado el tiempo de amplificación las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X teñidos con bromuro de

etidio. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 150 V durante 30 minutos. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue colocado sobre un transiluminador ultravioleta y fotografiado para la documentación e interpretación de los resultados. Los resultados fueron analizados teniendo en cuenta la plantilla del Anexo 12.4 que muestra los pozos que deben amplificar para un determinado alelo.

6.4.2 Tipificación de alta resolución

Al tubo conteniendo la mezcla maestra que viene con el estuche se añadieron:

- Taq DNA polimerasa (5U/ μ L) 7 μ L
- Agua desionizada 608 μ L

Una vez agitada la mezcla, se adicionaron 10 μ L de esta mezcla en el pozo A12 de la placa de PCR correspondiente al tubo de control de contaminación que tiene el tinte azul. Luego se adicionaron a la mezcla maestra, 125 μ L de DNA precalentado con una concentración superior a 50 ng/mL y un cociente A260/A280 \geq 1,6 y se agitó. A partir de esta mezcla se dispensaron 10 μ L en cada uno de los 95 tubos restantes conteniendo la mezcla de los cebadores secos.

Los tubos fueron sellados y sometidos al proceso de PCR con el siguiente programa:

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg.)	Acción
Paso de desnaturalización A	96	60	Desnaturalización
5 ciclos	96	25	Desnaturalización
	70	50	Hibridación
	72	45	Extensión
21 ciclos	96	25	Desnaturalización
	65	50	Hibridación
	72	45	Extensión
4 ciclos	96	25	Desnaturalización
	55	60	Hibridación
	72	120	Extensión

Una vez finalizado el tiempo de amplificación las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 0,5X teñidos con bromuro de etidio.

La electroforesis se realizó a voltaje constante de 250 V durante 22 minutos. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue colocado sobre un transiluminador ultravioleta y fotografiado para la documentación e interpretación de los resultados. Los resultados fueron analizados teniendo en cuenta la plantilla del Anexo 12.5 que muestra los pozos que deben amplificar para un determinado alelo.

6.5 Determinación de diferencias en la secuencias de aminoácidos de los alelos DR4 expresados por voluntarios participantes en el estudio.

La baja frecuencia de expresión del alelo HLA-DRβ1*0401 en los voluntarios que aceptaron participar en el estudio nos llevó a utilizar células de individuos que expresaban alelos del locus DRβ1*04 distintos al HLA-DRβ1*0401 en nuestros ensayos. Con el fin de evaluar el impacto en la unión de los péptidos debido a cambios en el bolsillo de unión de los diferentes alelos, fue analizado el grado de similitud entre las secuencia del alelo HLA-DRβ1*0401 con la secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por alelos del locus DRβ1*04 (DRβ1*04:02; DRβ1*04:03; DRβ1*04:04; DRβ1*04:05 y DRβ1*04:07) expresadas por varios de los voluntarios del estudio. Para ello se realizó la comparación de las secuencias mediante alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal W2.

Adicionalmente se utilizó el programa PROPED <http://www.imtech.res.in/tmp/propred/> para la predicción de unión de epítopes a las moléculas de clase II, con el fin de establecer la unión relativa de los péptidos T*-

1, QNT-6 y QNT-Y a los diferentes alelos DRB1*04 expresados por los voluntarios.

6.6 Criopreservación de PBMCs.

Concentrados de leucocitos (buffy-coat) obtenidos por aféresis en banco de sangre (que habitualmente son incinerados luego de que son aprovechados los glóbulos rojos, las plaquetas y el plasma de donadores de sangre sanos DR4), fueron utilizados como fuente de leucocitos de sangre periférica en este trabajo.

El concentrado de leucocitos obtenido del Banco de Sangre aproximadamente 50 mL, fue dividido en condiciones de esterilidad en dos mitades. La primera mitad del concentrado leucocitario fue procesada en esterilidad con el fin de purificar PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque. De esta mitad de concentrado leucocitario se obtuvieron en promedio 150 millones de PBMCs. Estos PBMCs fueron dispensados en crioviales a razón de 15 millones de PBMCs en 1,5 mL de medio de congelación (10% de Dimetil Sulfóxido (DMSO), 40% de suero fetal bovino y 50% de RPMI-1640). Los viales fueron criopreservados a -70 °C por 1 día y posteriormente se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido (-140 °C) hasta su uso.

6.7 Purificación de monocitos.

La segunda mitad del concentrado leucocitario fue destinada a la purificación de monocitos. Estos monocitos se purificaron utilizando el kit para aislamiento de monocitos: RosetteSep (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá), siguiendo

las instrucciones del fabricante. Por cada mililitro de buffy coat se utilizaron 150 μ L de RosetteSep. Estos monocitos fueron congelados en crioviales a razón de 5 millones de monocitos en 1 mL de medio de congelación como se describió para los PBMCs.

6.8 Generación de línea de LT-CD4+ específicos para el péptido T*.

Para obtener una línea de LT-CD4+ específica para T* se utilizó como antígeno el péptido T1BT* un péptido de 48 aminoácidos que hace necesario su procesamiento intracelular por la célula presentadora de antígeno para la generación de las epítopes DR4 (T*-1 y QNT-6) contenidas en T*. Para la generación de la línea se utilizaron PBMCs.

6.8.1 Generación de línea T1BT* a partir de PBMCs

Viales de PBMCs de 15 millones de los diferentes donantes DRB1*04 fueron descongelados y lavados con RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% para remover el DMSO del medio de congelación. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas para su cultivo en cajas de 6 pozos (1 pozo) en medio AIMV (GIBCO, INVITROGEN). El péptido T1BT* fue adicionado al cultivo a una concentración final de 10 μ M. Los PMBCs fueron incubados por 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. Transcurridas 72 horas de incubación la mitad del medio fue reemplazado por medio AIMV fresco suplementado con IL-2 (300 UI/mL). El cultivo se continuó a 37°C, 5% de CO₂ por 72 horas, al cabo de las cuales se hizo un último recambio de medio con IL-2 al cultivo el cual se prolongó por 72 horas adicionales completándose así 10 días de la línea de LT-CD4+ anti T1BT* en cultivo.

6.8.2 Primera re-estimulación de la línea T1BT* con distintas concentraciones de péptido

Diez días después de iniciada la generación de la línea contra el péptido T1BT*, esta fue cosechada, contada y dispensada en 36 pozos de cajas de 96 pozos para el re-estimulo con DCs maduras con IL-1 β , IL-6, TNF- α y PGE2 y pulsadas con tres concentraciones (0.1; 1 y 10 μ M) de los péptidos T*-1; QNT-6 y QNT-Y como se describe en el numeral 8.8.3. El re-estimulo de la línea T1BT* con el péptido QNT-Y se hizo para evaluar el grado de reconocimiento de este péptido por linfocitos T específicos para QNT-6 presentes en la línea (evaluación de reactividad cruzada). Para evaluar la sensibilidad de la respuesta de los linfocitos T a cada epitope, la re-estimulación de la línea T1BT* se hizo utilizando DCs maduras pulsadas con las concentraciones anotadas de los tres péptidos.

Las DCs fueron adicionadas a los microcultivos de línea en los 36 pozos siempre en relación: una DC por cada 5 linfocitos T presentes en el co-cultivo (aproximadamente 10^5 LT-CD4+ de la línea co-cultivados con 20 mil DCs pulsadas con péptido). DCs pulsadas con cada concentración de péptido evaluada fueron adicionadas a grupos de 3 microcultivos. Como control de re-estimulo de linfocitos T de la línea T1BT* con DCs maduras tres micro-cultivos fueron estimulados con DCs maduras que no fueron pulsadas con péptido.

El plato de 96 pozos con los 36 microcultivos de línea re-estimulada se incubo a 37°C, 5% de CO2 por 72 horas. Transcurrido este tiempo se recolectaron los sobrenadantes de todos los pozos para la determinación de citoquinas por CBA. La incubación se continuó hasta completar 10 días de cultivo haciendo recambios de medio con IL-2 (300 UI/mL) cada tercer día.

6.8.3 Producción de células dendríticas (DCs) maduras pulsadas con péptido.

Las DCs fueron producidas a partir de los monocitos de sangre periférica como ha sido descrito previamente por nosotros [32] con algunas modificaciones descritas por [33]. En breve, viales de monocitos de 5 millones del donante HLA-DR β 1*0401 fueron descongelados y lavados con RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% para remover el DMSO. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medio AIMV para su cultivo. Para generar DCs inmaduras se adicionaron a los monocitos IL-4 y GM-CSF a una concentración final de 750 UI/mL y 1000 UI/mL respectivamente. Los monocitos fueron cultivados en un plato de fondo plano y se incubaron por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂. Para madurar las DCs se adiciono al pozo conteniendo las DCs inmaduras IL-1 β , IL-6, TNF- α y PGE2 a una concentración final de 10 ng/mL, 1000 UI/mL, 10 ng/mL y 1 μ g/mL respectivamente. Las células fueron incubadas nuevamente a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas. Para la re-estimulación de la línea, las DCs maduras fueron cosechadas, contadas y pulsadas con 0.1; 1 y 10 μ M de los péptidos T*⁻¹, QNT-6 y QNT-Y. En todos los experimentos las DCs maduras fueron pulsadas con péptidos durante 2 horas a 37°C, 5% CO₂ previo al co-cultivo con los linfocitos T.

6.8.4 Segunda re-estimulación de la línea T1BT*/péptido con DCs pulsadas con los péptidos T*⁻¹; QNT-6 y QNT-Y.

Para evaluar la sensibilidad de la respuesta de los linfocitos T específicos para las epitopes T*⁻¹; QNT-6 presentes en la línea T1BT*/péptido y el grado de reactividad cruzada con QNT-Y de los linfocitos T específicos para QNT-6 presentes en la línea T1BT*/péptido, luego de 10 días del re-estimulo de la línea T1BT*/péptido con DCs pulsadas con los péptidos T*⁻¹; QNT-6 y QNT-Y, estas líneas fueron sometidas a una segunda re-estimulación con el mismo péptido utilizado en la misma concentración del primer re-estimulo (0.1, 1 y 10 μ M).

6.8.5 Medición del grado de linfoproliferación con CFSE de la línea T1BT*/péptido luego de la segunda re-estimulación con DCs pulsadas con T*-1; QNT-6 y QNT-Y.

Para el segundo y último re-estimulo con DCs de la línea T1BT*/péptido las DCs fueron generadas y pulsadas como se describió previamente (ver numeral 8.8.3).

Un grupo de DCs pulsadas fue utilizado para la estimulación por 48 horas de la línea T1BT*/péptido con el fin de analizar por citometría de flujo la expresión de los marcadores de activación CD27 y CD69 en LT-CD4+ (ver numeral 8.8.6).

Un segundo grupo de DCs pulsadas con péptido a las concentraciones anotadas fue utilizada para re-estimular células de la línea T1BT*/péptido marcadas con CFSE, con el fin de determinar por citometría de flujo 6 días después del segundo re-estimulo el grado de proliferación inducido por DCs pulsadas con cada una de las concentraciones de péptido. Para esto las líneas fueron marcadas con CFSE CellTrace (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, las líneas T1BT*/péptido fueron resuspendidas en PBS 1X + SFB 5%, posteriormente se adicionó CFSE a una concentración final de 1,5 μ M y se incubó en baño serológico a 37°C durante 10 minutos. Se detuvo la coloración por adición de PBS 1x + SFB 5% frío a las células. Se incubó en hielo durante 5 minutos, se centrifugó y se hicieron 2 lavados más. Finalmente se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio AIMV para su cultivo con las DCs pulsadas con péptido.

6.8.6 Determinación de marcadores de activación en LT-CD4+ por citometría de flujo multicolor.

Luego de co-cultivar por 72 horas las líneas con DCs pulsadas con cada una de las concentraciones del péptido, los cultivos fueron centrifugados con el fin de recolectar el sobrenadante para la determinación de citoquinas por CBA. Las células fueron teñidas con anti-CD4 PE texas red, anti-CD3 PE Cy7 (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA), anti-CD62L PE Cy5, anti-CD45RO FITC, anti-CD69 APC Cy7 y anti-CD27 APC (eBioscience, San Diego, CA, USA), con el fin de detectar por citometría de flujo en cada cultivo el grado de activación medido por la expresión de CD69 al igual que el grado de diferenciación de las células medido por la expresión del CD27 luego del re-estimulo.

En breve, las células fueron teñidas con el coctel de anticuerpos por 20 minutos a 4°C, posteriormente las células fueron resuspendidas en PBS 1X,.

6.9 *Determinación de la reactividad cruzada de LT-CD4+ específicos para la epítotope QNT-6 (contenida en T*) cuando son re-estimulados con DCs pulsadas con QNT-Y.*

La reactividad cruzada fue determinada utilizando líneas de LT-CD4+ específicas para la epítotope QNT-6 contenida en la secuencia T* del péptido T1BT* y las cuales fueron generadas como se describió en la sección 8.8. Estas líneas fueron re-estimuladas con DCs pulsadas con 10 µM de los péptidos QNT-6 (control positivo) o QNT-Y (análogo de QNT-6). El grado de reconocimiento de estos péptido por linfocitos LT-CD4+ presentes en la línea fue evaluado por citometría de flujo midiendo en LT-CD4+ de la línea: (i) el nivel de expresión de CD69 y CD27 por estas células, (ii) la producción de citoquinas mediante CBA; y (iii) el

grado de proliferación monitoreando el nivel de marcación con CFSE a los 6 días de estimulación con CPAs pulsadas con los péptidos.

6.10 Determinación de citoquinas en sobrenadantes mediante CBA.

En los sobrenadantes de cultivo de la línea celular generada contra el péptido T1BT* recolectados 3 días después de cada estimulación con DCs pulsadas con los péptidos T*-1; QNT-6 y QNT-Y, se midieron las concentraciones de las citoquinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ . Para cuantificar estas citoquinas se utilizó el estuche comercial Cytometric Bead Array (CBA) atendiendo las instrucciones de uso del estuche señaladas por el fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA. USA).

6.11 Respuesta de linfocitos T presentes en PBMCs a la estimulación con células dendríticas “aceleradas” pulsadas con péptido.

En algunos experimentos para la estimación de precursores de linfocitos T específicos para las epítopes DR4 contenidas en T* presentes en PBMCs se utilizaron DCs como células presentadoras de antígeno inducidas in situ a partir de la estimulación con las citoquinas IL-4 y GM-CSF de monocitos presentes en PBMCs totales. Para ello se descongeló un vial de 15 millones de PBMCs del donante HLA-DR β 1*0401. Se cultivaron en 1,2mL de medio AIMV con IL-4 y GM-CSF y 5 μ M de péptido largo T1BT* por 3 horas. A las 3 horas las células fueron divididas en 4 pozos en un plato de 24 pozos (300 μ L de medio/pozo) y se dejaron incubar por 24h. Al siguiente día se adicionaron a los 3 primeros pozos 5 μ M de péptido corto, T*-1, QNT-Y, QNT-6 respectivamente y el ultimo pozo se dejó como control sin péptido. Se preparó una mezcla de coctel de maduración conteniendo

(IL-1B, IL-6, TNF- α , PGE2 e IL-7 a 0.5ng/mL) para añadirlo a cada uno de los 4 pozos simultáneamente con los péptidos para un volumen final de 500 μ L/pozo en medio AIM-V. El plato se cultivó durante 6 días más sin recambio de medio. Transcurridos 6 días se tomaron 400 μ L de sobrenadante de cada cultivo para el análisis de citoquinas TH1 y TH2 utilizando un estuche comercial de CBA (BD BIOSCIENCES, San Diego, CA. USA). Las células fueron recolectadas y lavadas con PBS frío y se procedió a la marcación de superficie e intracelular para análisis por citometría de flujo de las células marcadas con los siguientes marcadores: anti-CD4 PE texas red, anti-CD3 PE Cy7 (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA), anti-CD62-L PE Cy5, anti-CD45RO FITC y anti-CD27 APC (eBioscience, San Diego, CA, USA).

6.12 Determinación del perfil de memoria de líneas generadas a partir de linfocitos CD4 vírgenes estimulados con DCs pulsadas con péptido.

Se generaron líneas contra los péptidos T1BT* y T1BT*-Y a partir de linfocitos T CD4 vírgenes y monocitos pulsados con el respectivo péptido.

Para ello fue necesario el aislamiento de los linfocitos T CD4 vírgenes a partir de PBMCs del donante HLA-DR β 1*0401 utilizando el kit Naive CD4+ T cell isolation kit II human (Miltenyi Biotec, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se descongelaron PBMCs del donante HLA-DR β 1*0401, se lavaron con medio RPMI estéril con 10% de suero fetal bovino precalentado. Las células fueron resuspendidas en 40 μ L de buffer conteniendo RPMI + 1% suero fetal bovino + 0,5 mM EDTA. Luego se adicionaron 10 μ L de naive CD4 T cell biotin antibody cocktail II, se agitó y se dejó en nevera a 4°C por 10 minutos. Se adicionaron 2 mL de buffer para lavar y se centrifugó. Las células se resuspendieron en 80 μ L de buffer y luego se adicionaron 20 μ L de antibiotin microbeads, se incubó por 15

minutos a 4°C. Luego se adicionan 2 mL de buffer para lavar y se centrifugó, se resuspendieron las células en 500 µL de buffer para su separación mediante columna magnética por selección negativa. Una vez aislados los LT-CD4+ vírgenes se dividieron en 2 pozos y se pusieron en contacto con monocitos y 5µM de T1BT* o 5 µM de T1BT*-Y respectivamente. A ambos pozos se les adicionaron las citoquinas IL-4(750 UI/mL) y GM-CSF (1000 UI/mL). Un día después al pozo con T1BT* se adicionaron 5 µM de QNT-6 y 5 µM de T*-1, y coctel de maduración conteniendo: IL-1β (10ng/mL), TNF-α (10ng/mL), PGE2 (1µg/mL) e IL-2 (300UI/mL) y al pozo con T1BT*-Y se adicionan 5 µM de QNT-Y y 5 µM de T*-1, y el mismo coctel de maduración. Luego de esto el plato fue incubado durante 10 días haciendo recambio de medio con IL-2 (300 U/mL) cada 72 horas.

Finalizados los 10 días se adicionaron a cada uno de los dos cultivos originalmente pulsados con T1BT* monocitos pulsados con QNT-6 y T*-1 y a los cultivos originalmente pulsados con T1BT*-Y monocitos pulsados con los péptidos QNT-Y y T*-1 (siempre a una concentración 5 µM) en medio suplementado con IL-4 y GM-CSF en las concentraciones anotadas. Al siguiente día se adicionó coctel de maduración y nuevamente los péptidos cortos según fuera el caso y el plato se incubó durante 12 días adicionales. Al día 10 (dos días antes de completarse el día 12) se generaron células dendríticas como se describió en la sección 8.8.3. Estas DCs fueron divididas en 8 pozos para ser pulsadas por duplicado con 5 µM de QNT-6, QNT-Y, T*-1 y sin péptido, con el fin de utilizar un set de 4 cultivos de DCs para la re-estimulación de las líneas T1BT* o T1BT*-Y que fueron re-estimuladas 10 días antes con (T*-1 y QNT-6 o T*-1 y QNT-Y respectivamente). En estos cultivos la relación LT a DC fue de 5:1. Tres días después del este último re-estimulo se recolectaron las células para la determinación de los perfiles de memoria mediante citometría de flujo utilizando los marcadores CD45RO y CD62-L. Para la cuantificación de células tetrámero positivas en estos cultivos, se utilizó en cada línea el tetrámero correspondiente al péptido individual usado en el último re-estimulo.

6.13 Cuantificación de LT-CD4+ específicos para T*-1; QNT-6 y QNT-Y generados de LT vírgenes estimulados con DCs que procesan y presentan naturalmente los péptidos T1BT* y T1BT*-Y.

Para cuantificar LT-CD4+ específicos para las epítopes T*-1; QNT-6 y QNT-Y se generaron líneas específicas para los péptidos T1BT* y T1BT*-Y. Para ello se descongeló un vial de monocitos de donante (HLA-DRβ1*04:01) de 3 millones de monocitos. Se recuperaron 2.3 millones de monocitos los cuales fueron divididos en 2 pozos cada uno con 1 millón de monocitos que fueron colocados en 500µL de medio AIM-V en un plato de 48 pozos de fondo plano y se indujo la producción de DCs inmaduras suplementando el medio de cultivo con IL-4 (750U/mL) y GM-CSF (1000U/mL) por 2 días a 37°C, en atmosfera de 5% CO₂.

Luego de los 2 días se adicionaron 500uL de medio AIMV a cada pozo y cada pozo de DCs fueron pulsadas con el péptido largo T1BT* o T1BT*-Y a una concentración final de 3,75 µM luego de lo cual se incubaron las células por 3 días a 37°C, en 5%CO₂. A los 3 días se adiciono nuevamente el péptido largo respectivo a cada pozo y se incubaron las células hasta el siguiente día, momento en que se adiciono TNF-α a una concentración final de 25 ng/mL como factor de maduración de las DCs pulsadas.

Linfocitos T CD4 vírgenes fueron purificados como se describió en la sección 8.12 a partir de 2 viales de PBMCs del donante HLA-DRβ1*0401. Con los linfocitos T vírgenes obtenidos se realizaron cultivos de 900 mil linfocitos T vírgenes con 45 mil DCs pulsadas con cada uno de los péptidos largos T1BT* o T1BT*-Y (relación linfocito T a DC de 20:1). Como control se cultivaron 300 mil linfocitos T vírgenes con 15 mil DCs sin pulsar. Los cultivos fueron incubados a 37°C, 5% CO₂.

Al día sexto se descongeló un vial de monocitos de 5 millones del donante HLA-DRβ1*04:01 para la generación de DCs. Se cultivaron 4 pozos con 10⁶ de monocitos en 1 mL de medio AIM-V con IL-4 (750U/mL) y GM-CSF (1000U/mL).

Se incubaron las células por 3 días a 37°C, 5% CO₂. Luego de los 3 días se adicionó el péptido T1BT* a 2 pozos y T1BT*-Y a los 2 pozos restantes a una concentración final de 3,75 µM y se incubaron las células por 2 días a 37°C, 5% CO₂. Transcurridos los 2 días se hizo recambio de 500 µL de medio de cada pozo y se adicionó nuevamente péptido largo a los respectivos pozos a la misma concentración. Al día siguiente se procedió a madurar las DCs con TNF-α a una concentración final de 25ng/mL y PGE2 a 20µg/mL.

Un día después de la maduración, las DCs pulsadas con cada péptido y las líneas de LT-CD4+ vírgenes pulsadas dos semanas antes con DCs con los péptidos T1BT* o T1BT*-Y fueron cosechadas y contadas.

Las líneas de los linfocitos vírgenes específicas para los péptidos T1BT* y T1BT*-Y fueron re-estimuladas con DCs pulsadas con cada péptido en una relación DC:LT de 1:10 en 200 µL de AIMV en plato de 96 pozos de fondo plano y se incubaron a 37°C, 5% CO₂. Al cabo de 3 días se adicionaron 100 µL de medio AIMV conteniendo 50UI/mL de IL-2, los cultivos se incubaron y 4 días después se realizó la recolección de las células para tinción con tetrámeros fluorescentes DR4/T*-1; DR4/QNT6 y DR4/QNT-Y producidos como fue descrito por Parra-Lopez y col [29] gentilmente suministrados por el Profesor Lawrence Stern (Departamento de Patología y Bioquímica de la Universidad de Massachusetts, Worcester, MA, USA).

Para la tinción con tetrámeros se preparó una solución de trabajo de Estreptavidina PE (SA-PE) (eBiosciences) mezclando 32µL del stock SA-PE (0.25µg/µL) + 64µL de PBS y se dispensaron (0.5µg de esta dilución por cada 2µg de tetrámero) en este caso 24µL fueron adicionados a cada tetrámero (8µL cada 5 min (2 veces) y los últimos 8µL por 30 minutos). En total se prepararon 200 µL: 176 µL iniciales de dilución de tetrámero más 24 µL de dilución de SA-PE y se dispensaron 50 µL/tubo. Los tubos fueron incubados por 1 hora a temperatura

ambiente en oscuridad.

Finalmente, con el fin de analizar la distribución de sub-poblaciones de LT-CD4+ vírgenes y de memoria en células tetrámero positivas presentes en los dos cultivos, luego de la tinción de las células con tetrámero, se adicionaron anticuerpos para los marcadores de superficie CD4 PE Texas red, CD45RO FITC, CD62-L PECy5 y CD27 APC que se incubaron por 15 min a 4 °C luego de lo cual las células se lavaron con PBS.

6.14 Evaluación de la respuesta in vivo de ratones transgénicos DR4 tras la inmunización con T1BT* y T1BT*Y

Ratones transgénicos que poseen el transgen para el alelo DR4 (HLA-DR α 1*01:01/DR β 1*04:01) fueron vacunados con tres dosis de (i) PBS en adyuvante Montanide ISA 720 (SEPPIC, Inc., Fairfield, NJ, USA) Grupo control); (ii) péptido T1BT* en Montanide ISA 720; o (iii) péptido T1BT*-Y en Montanide ISA 720, con el fin de medir la capacidad de las epítopes T*-1; QNT-6 o QNT-Y de inducir en los ratones vacunados: (i) la producción por linfocitos B de anticuerpos anti-NANP y (ii) la producción de IFN- γ por células del bazo.

6.14.1 Determinación de la expresión de moléculas HLA-DR en ratones transgénicos.

Ratones C57BL-6/Tac-Abb (Tm1) TgNC (DR4) que expresan el transgen HLA-DR α 1*0101/DR β 1*0401 fueron gentilmente facilitados por el Profesor Larry Stern del departamento de Patología y Bioquímica de la Universidad de Massachusetts,

Worcester, MA, USA. Los ratones fueron obtenidos de Taconic Farms y mantenidos en el bioterio de la Universidad de Massachusetts en Worcester, MA. Los bazos de 5 ratones transgénicos fueron extraídos, se maceraron sobre un filtro de 40 μm y los glóbulos rojos fueron lisados por adición de cloruro de amonio. Una vez lisadas las células rojas se adicionó medio MEM suplementado con suero fetal bovino al 10% para hacer tres lavados de los esplenocitos. Las células obtenidas a partir de cada ratón fueron teñidas con anticuerpos anti-HLA-DR FITC y anti-CD19 APC (BD, San Diego, CA. USA), para determinar la expresión de moléculas de clase II en los ratones mediante citometría de flujo.

6.14.2 Inmunización de ratones

Se tomaron cuatro ratones por grupo (Control, T1BT* o T1BT*-Y) y fueron inmunizados con tres dosis, una cada 20 días del péptido T1BT* en Montanide ISA 720 como adyuvante, T1BT*-Y en Montanide ISA 720 como adyuvante y un tercer grupo control fue inmunizado sólo con PBS en adyuvante Montanide ISA 720.

Las emulsiones para la inmunización fueron preparadas mezclando en un tubo eppendorf de plástico de 1.5 mL:

- 100 μL de péptido T1BT* o T1BT*-Y (5 mg/mL)
- 50 μL de PBS 1X
- 350 μL de Montanide ISA 720.

En el caso de la emulsión para los ratones control, los 100 μL de péptido fueron reemplazados por 100 μL de PBS 1X. Los tubos fueron mezclados por agitación en vortex y posteriormente fueron sometidos a ultrasonido durante 10 minutos hasta que la emulsión formó micelas estables e insolubles en fase acuosa. Este procedimiento fue repetido cada vez que se inyectaron los 3 grupos

experimentales a los días 0, 20 y 40. Los ratones fueron inmunizados con 50 μ L de emulsión que contenía 50 μ g del péptido por vía subcutánea en la base de la cola de cada animal.

6.14.3 Determinación del título de anticuerpos por ELISA en suero de ratones DR4 transgénicos

Los animales fueron sangrados 20 días después de la primera dosis, 20 días después de la segunda dosis, 27 días después de la tercera dosis y 45 días después de la tercera dosis, con el fin de monitorear en suero los niveles de anticuerpos contra la epítotope (NANP)₆ por ELISA.

Las muestras de sangre 400 μ L fueron tomadas en tubo eppendorf seco, el tubo fue colocado en hielo durante 1 hora y el suero fue obtenido luego de retraer el coágulo por centrifugación de la muestra a 13.000 rpm por 5 minutos.

Para determinar la cantidad de anticuerpos contra NANP presentes en los sueros de los ratones, se cubrieron platos de ELISA de 96 pozos de fondo plano con 100 μ L de (NANP)₆ 1 μ g/mL por pozo (gentilmente suministrado por el Dr. Alberto Moreno, Emory University, Atlanta GA. USA) o 100 μ L de BSA 2,5 % como control como se muestra en el Anexo 12.8. Luego se bloqueó el plato por adición de 100 μ L de BSA 2,5% en PBS 1X y se dejó por 1 hora a temperatura ambiente. Para la determinación del título de anticuerpos presentes en el suero de los ratones 20 días después de la primera dosis, 20 días después de la segunda dosis, 27 días después de la tercera dosis y 45 días después de la tercera dosis, se hicieron diluciones seriadas a la mitad comenzando en 1/640 hasta llegar a 1/20480 en PBS 1X + Tween 20 0,05% + BSA 2,5%. En el caso de la evaluación de anticuerpos anti-NANP en sueros de animales vacunados con T1BT*-Y estas diluciones fueron menores ya que tras las inmunizaciones el título de anticuerpo

anti-NANP detectado en este grupo de animales fue considerablemente menor al detectado en el suero de animales vacunados con T1BT*. Al pozo H1 (del plato mostrado en el Anexo 12.8) se adicionó el anticuerpo 2A10 (gentilmente suministrado por el Dr. Alberto Moreno, Emory University, Atlanta GA. USA) a una concentración final de 1 µg/mL el cual fue utilizado como control positivo ya que reconoce específicamente la secuencia NANP. Los platos con las diluciones de anticuerpos se dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron tres veces con PBS 1X + Tween 20 0,05% y se adicionan 100 µL de una dilución 1 en 10000 de un anticuerpo anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano (KPL, catalogo 214-1802). Los platos se dejaron a temperatura ambiente por 1 hora, se lavaron dos veces con PBS 1X + Tween 20 0,05% y una vez con PBS 1X. Luego se adicionaron 100 µL del sustrato para la peroxidasa, solución ABTS (KPL, Washington DC, USA) y se dejó actuar a la enzima sobre el sustrato durante 30 minutos. Para detener la reacción se adicionaron 50 µL de solución al 1,5% de dodecilsulfato de sodio en agua. Finalmente, los platos se leyeron en un lector de ELISA a 405 nm.

6.14.4 Determinación de producción de IFN- γ por ELISPOT a partir de esplenocitos de ratones transgénicos inmunizados con T1BT* o T1BT*-Y

Procedimiento aséptico:

Mediante la utilización del kit Mouse IFN gamma ELISPOT Ready-SET-Go!® de (eBiosciences, San Diego, CA, USA), se hizo la cuantificación de las células de bazo de ratones transgénicos inmunizados con T1BT* o T1BT*-Y, productoras de IFN- γ tras la estimulación con los diferentes péptidos T*-1, QNT-6 o QNT-Y. La distribución de las células y estímulos en los platos se describen en el Anexo 12.9.

Para esto el día 1 se cubrieron 2 platos con 100 μ L de una dilución 1 en 250 del anticuerpo de captura en PBS 1X estéril. Los platos se incubaron a 4°C toda la noche.

El día 2 se aspiró el anticuerpo de captura de cada pozo y se lavaron los platos 2 veces con 200 μ L por pozo de PBS 1X estéril. Se aspiró nuevamente y se bloqueó el plato mediante la adición de 200 μ L por pozo de RPMI-1640 a temperatura ambiente por 1 hora.

Al mismo tiempo se procedió a la obtención de las células a partir del bazo del ratón como sigue:

En falcón de 50 mL se pusieron filtros de 40 μ m, uno por cada bazo de ratón a analizar y se lavó con 1 mL de cloruro de amonio para la lisis de células rojas. Se pusieron los bazos sobre cada filtro, se maceraron con un embolo y se adicionaron 4 mL de buffer de lisis de células rojas para jugar el filtro. Se esperó 7 minutos con cada bazo.

Al finalizar el tiempo se adicionó sobre cada filtro 10 mL de RPMI-1640 y se centrifugó el tubo. Se hicieron 3 lavados más con RPMI-1640 y finalmente se resuspendieron las células en RPMI-1640 para su conteo con azul de tripan.

Se ajustó el volumen de las células con RPMI-1640 para que en 100 μ L hubiese 10^6 de células para el ensayo de ELISPOT con los diferentes péptidos.

NOTA: el volumen final en cada pozo fueron 200 μ L de los cuales 100 μ L contenían las células y los otros 100 μ L contenían el péptido a ser evaluado a una concentración final de 10 μ g/mL.

Luego del bloqueo, se adicionaron los 100 μ L del péptido en los respectivos pozos y posteriormente los 100 μ L de medio conteniendo 10^6 de células. Los platos se incubaron a 37°C, 5% CO₂ por 48 horas.

Para el revelado del plato de ELISPOT, luego de las 48 de incubación se descartó el contenido de los platos en el lavadero, y se lavó el plato 3 veces con PBS 1X:Tween 0.05%. El anticuerpo de detección biotinado se diluyó 1 en 250 en assay diluyente buffer 1x y se adicionaron 100 μ L del anticuerpo de detección en cada uno de los pozos. Luego se incubó el plato a temperatura ambiente por 2 horas y se lavó 4 veces con PBS1X:Tween 0.05%. La enzima HRP-avidin (eBiosciences, San Diego, CA, USA), fue diluida 1 en 250 en assay diluyente 1x y se adicionaron 100 μ L de la enzima en cada uno de los pozos. Se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos y el plato fue lavado 3 veces con PBS1X:Tween 0.05% y luego 2 veces con PBS1x. Finalmente 100 μ L de solución de sustrato AEC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), recién preparado (Anexo 12.9.1) fueron adicionados a cada pozo y se dejó revelar a temperatura ambiente por 10-60 minutos. Para detener la reacción de la enzima sobre el sustrato el plato fue lavado 3 veces con 200 μ L de agua destilada. El plato se dejó secar antes de leer en el ImmunoSpot Analyzer (CTL-ImmunoSpot® S6, Cellular Technology Limited, USA).

7 RESULTADOS

7.1 Definición del registro de unión de QNT-6 a HLA-DR4

Si bien la definición del registro de unión de QNT-6 a la molécula DR4 no estaba dentro de los objetivos de la tesis, experimentos conducentes a determinar los residuos críticos para la unión del péptido QNT-6 a esta molécula fueron realizados en esta tesis. En trabajos previos Vargas y col identificaron un registro de unión del péptido QNT-6 a la molécula DR4 que solo involucraba el anclaje de la secuencia QNT-6 a los bolsillos P1 y P7 de esta molécula, lo cual resultaba un registro de unión atípico (manuscrito en preparación). En el presente trabajo se quiso evaluar nuevamente el registro de unión de QNT-6 a DR4 mediante ensayos de competición utilizando una nueva batería de péptidos análogos de Alanina de la secuencia QNT-6 (péptidos acetilados en el N-terminal). Los resultados mostrados en la Figura 5 muestran las curvas resultado de ensayos de competición de cada uno de los análogos de Alanina y péptidos truncados que al ser utilizados a diferentes concentraciones compiten con el péptido BioHA por la unión a la molécula de DR4. La Figura 6 muestra el valor promedio del IC50 junto con su desviación estándar para cada uno de los péptidos ensayados luego de realizarse 3 réplicas del experimento en días diferentes.

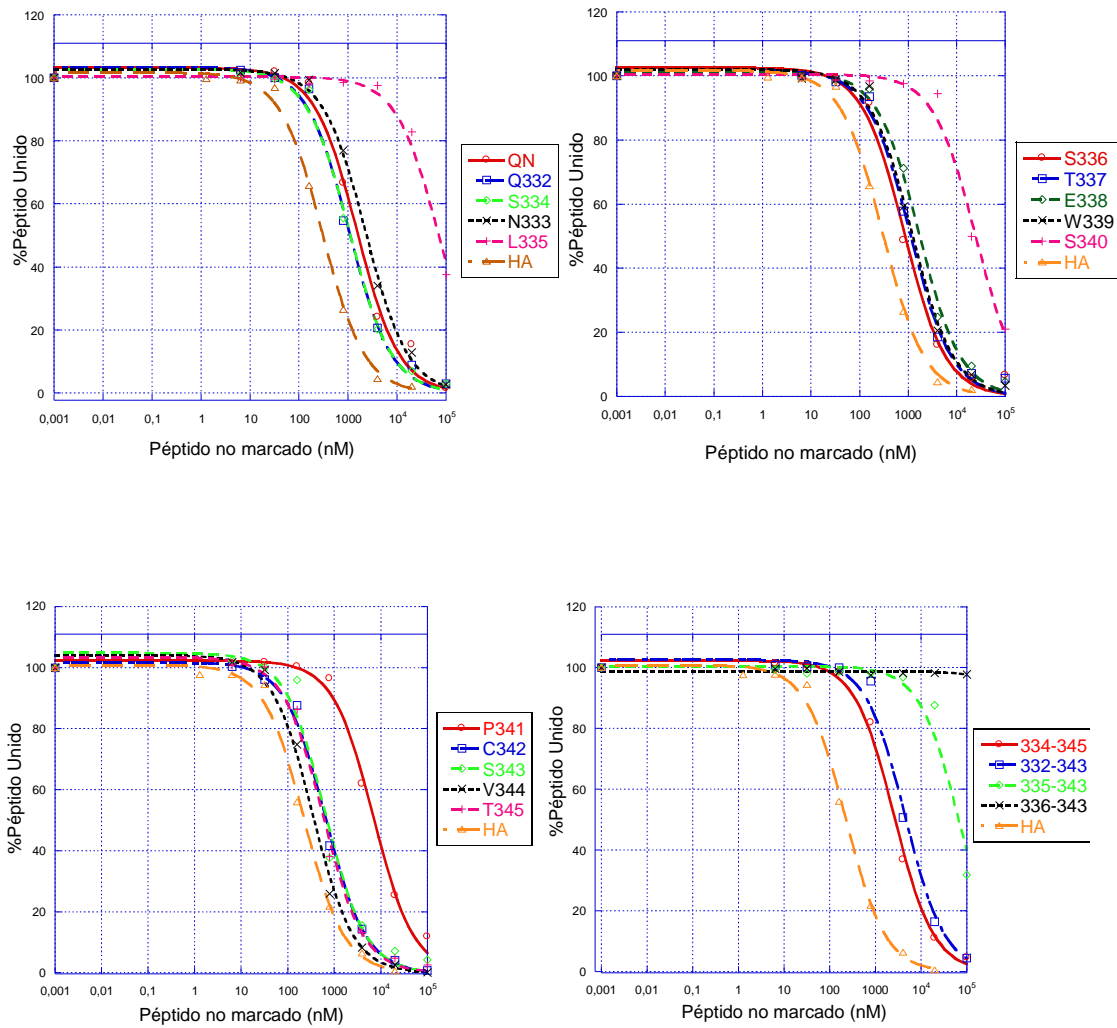


Figura 5. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50) de los análogos de Alanina de QNT-6. El ensayo se realizó utilizando 0,05 μ M de DR4; 0,025 μ M de HA Biotinado y los péptidos análogos y truncados de QNT-6 utilizados como péptidos competidores a diferentes concentraciones entre (0 y 100 μ M). Los datos fueron analizados utilizando el programa Kaleida Graph 4.0 para el cálculo del IC50.

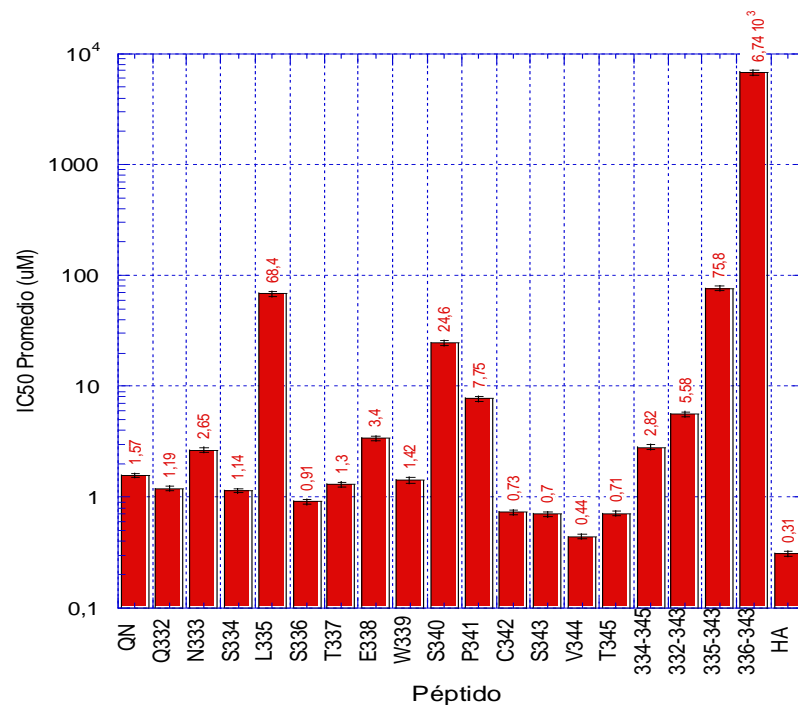


Figura 6. IC 50 promedio de los diferentes análogos de Alanina de QNT-6. El IC50 corresponde al promedio de 3 experimentos diferentes realizados en 3 días diferentes. El número sobre cada barra indica el promedio del IC 50 para cada péptido en los 3 experimentos y la barra indica la desviación estándar de los 3 experimentos.

Mediante el cálculo de IC50 correspondiente (concentración de cada péptido análogo competidor no marcado capaz de producir el 50% del desplazamiento de la unión de BioHA de DR4), se identificaron varios aminoácidos que contribuyen a la unión del péptido QNT-6 a DR4. Mientras la concentración del péptido QNT-6 necesaria para competir por el 50% de la unión de Bio HA a la molécula DR4 fue 1,57 µM, el cambio por Alanina de la Leucina en la posición 335 incremento el IC50 a 68,4 µM (43 veces); el cambio del Ácido Glutámico en la posición 338 incremento el IC50 a 3,4 µM (2 veces), el cambio de la Serina en la posición 340 incremento el IC50 a 24,6 µM (15 veces mayor) y el cambio de la Prolina en la posición 341 incremento la concentración requerida a 7,75 µM (5 veces mayor). Estos aumentos fueron calculados con base en IC50s que superan dos veces la desviación estándar encontrada para cualquiera de las otras posiciones. Estos datos permiten evidenciar un registro de unión de la secuencia del péptido QNT-6

a DR4 que comprende el anclaje de cadenas laterales de este péptido a los bolsillos P1, P4, P6 y P7 del DR4.

Por su parte el uso de los péptidos truncados en este tipo de ensayo permitió evidenciar: (i) Que aminoácidos hacia el extremo amino terminal del péptido y cercanos al aminoácido que encaja en el bolsillo P1 contribuyen a la unión del péptido, ya que el IC50 obtenido para el péptido truncado 335-343 (5,58 μM) se encontró que era casi 4 veces mayor cuando es comparado con el de la secuencia completa de QNT-6 (1,57 μM) y (ii) que la leucina en la posición 335 es fundamental para la unión de QNT-6 a DR4, ya que el péptido truncado 336-343 necesitó aproximadamente 6000 veces más concentración para competir por el 50% de las unión de Bio-HA respecto a la secuencia nativa QNT-6.

7.2 Tipificación HLA

7.2.1 Tipificación de baja resolución.

Mediante visualización de bandas de amplificación en electroforesis de geles de agarosa como se muestra en la Figura 7, la tipificación de baja resolución permitió determinar la expresión del grupo de alelos DRB1*04 en varios de los voluntarios del estudio.

Tanto la tipificación de baja como de alta resolución se basan en que cada línea del gel que contenga una muestra cargada debe ofrecer una banda de control exceptuando la línea que contenga el pocillo de control de contaminación. En la tipificación se utilizan mezclas de cebadores. Por un lado se utilizan cebadores control que amplifican un fragmento de un gen conservado que está presente en todas las muestras como por ejemplo la hormona de crecimiento humano. Estos

cebadores no presentan una concentración tan alta como los pares de cebadores alelo- específicos y sirven para controlar que el proceso de PCR se desarrolle con éxito. Por regla general, la amplificación se efectúa siempre, es decir, tanto en presencia como en ausencia de un fragmento de PCR de alelo o grupo específico. La banda de control puede o no amplificarse eficientemente cuando haya un producto específico presente debido a la competencia por el sustrato. Para interpretar el ensayo se parte de la presencia o ausencia de una banda de DNA específica en el gel y se compara con la plantilla que trae el estuche comercial donde indican que carriles deben amplificar para un determinado alelo. Ver Anexo 12.4.

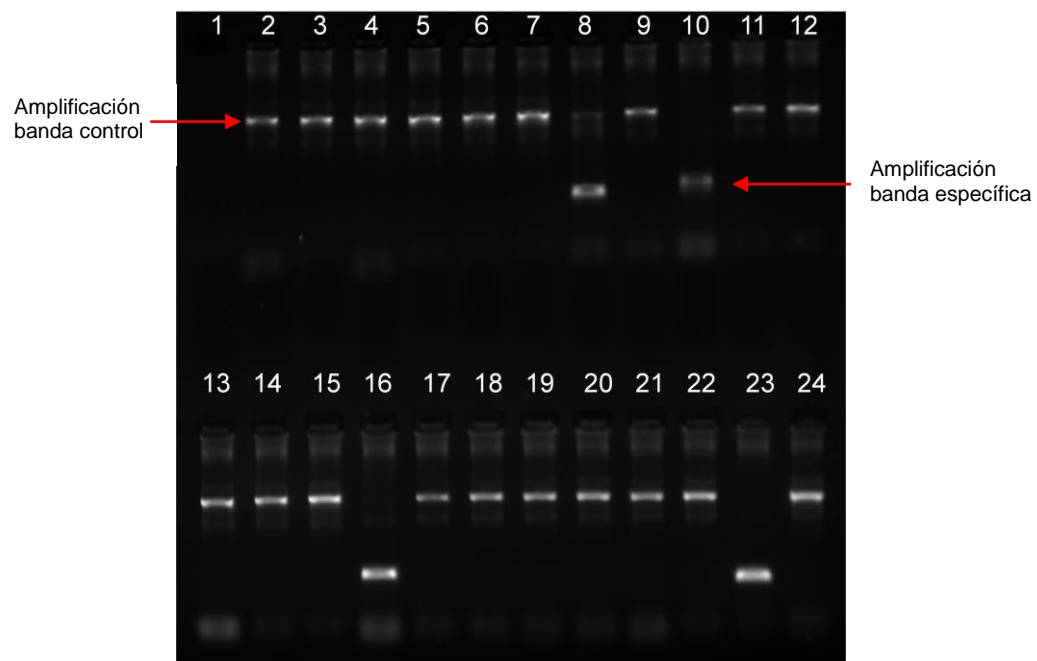


Figura 7. Gel de agarosa al 2% para la determinación de la tipificación de baja resolución. El carril 1 es el pozo de control de contaminación en el cual no se aprecia ninguna banda a pesar de que se han adicionado coctel de PCR, Taq polimerasa y agua pero sin la adición de DNA. En el gel se observan la banda de amplificación del control positivo y las bandas específicas de alelo.

La tabla presentada a continuación resume los resultados de la tipificación de baja resolución obtenidos para los diferentes voluntarios que participaron en el estudio.

Voluntario	Tipificación de baja resolución
V1	DRB1*04, DRB1*13, DRB4*01
V2	DRB1*01, DRB1*03, DRB3*01
V3	DRB1*04, DRB1*07, DRB5*01
V4	DRB1*01, DRB1*03, DRB3*01
V5	DRB1*08, DRB1*10
V6	DRB1*04, DRB1*07, DRB4*01
V7	DRB1*01, DRB1*03, DRB3*01
V8	DRB1*04, DRB1*07, DRB4*01
V9	DRB1*08, DRB1*14, DRB3*01
V10	DRB1*04, DRB1*16, DRB4*01, DRB5*01
V11	DRB1*04, DRB1*07, DRB4*01
V12	DRB1*01, DRB1*16, DRB5*01
V13	DRB1*10, DRB1*11, DRB3*01
V14	DRB1*04, DRB1*08, DRB4*
V15	DRB1*01, DRB1*11, DRB3*
V16	DRB1*11, DRB1*13, DRB3*
V17	DRB1*04, DRB1*09, DRB4*
V18	DRB1*04, DRB1*07, DRB4*
V19	DRB1*11, DRB1*14, DRB3*
V20	DRB1*04, DRB1*07, DRB4*
V21	DRB1*04, DRB4*
V22	DRB1*07, DRB1*16, DRB4*, DRB5*
V23	DRB1*03, DRB1*08, DRB3*
V25	DRB1*03, DRB1*04, DRB3*, DRB4*
V26	DRB1*03, DRB1*13, DRB3*
V27	DRB1*12, DRB1*15, DRB3*, DRB5*

Tabla 3. Resultado de la tipificación de baja resolución DR4 en los diferentes voluntarios. Los resultados resaltados en rojo muestran los voluntarios en los cuales se encontró la expresión de alelos del locus DR β 1*04.

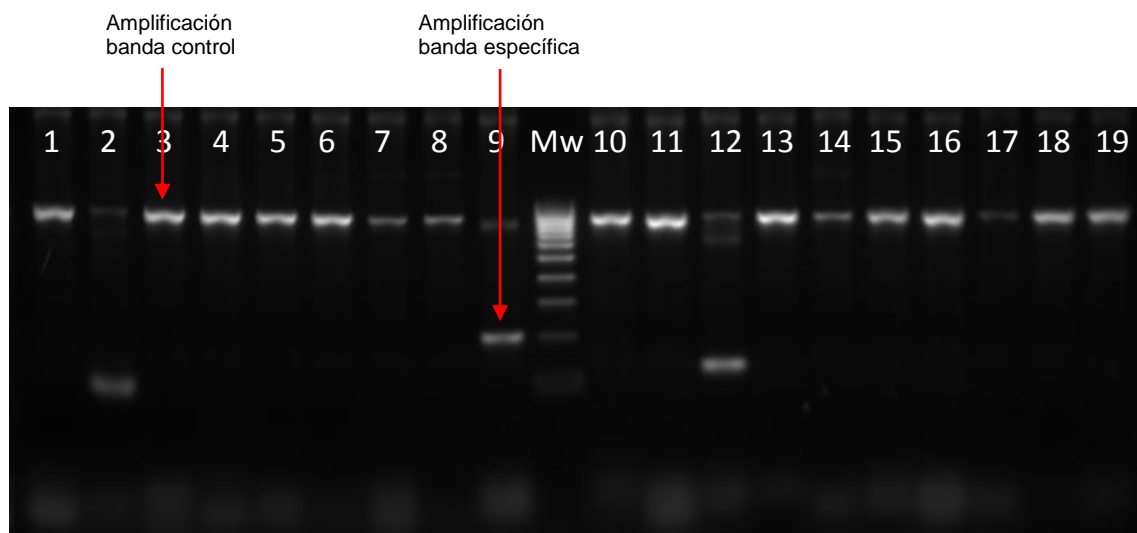
7.2.2 Tipificación de alta resolución

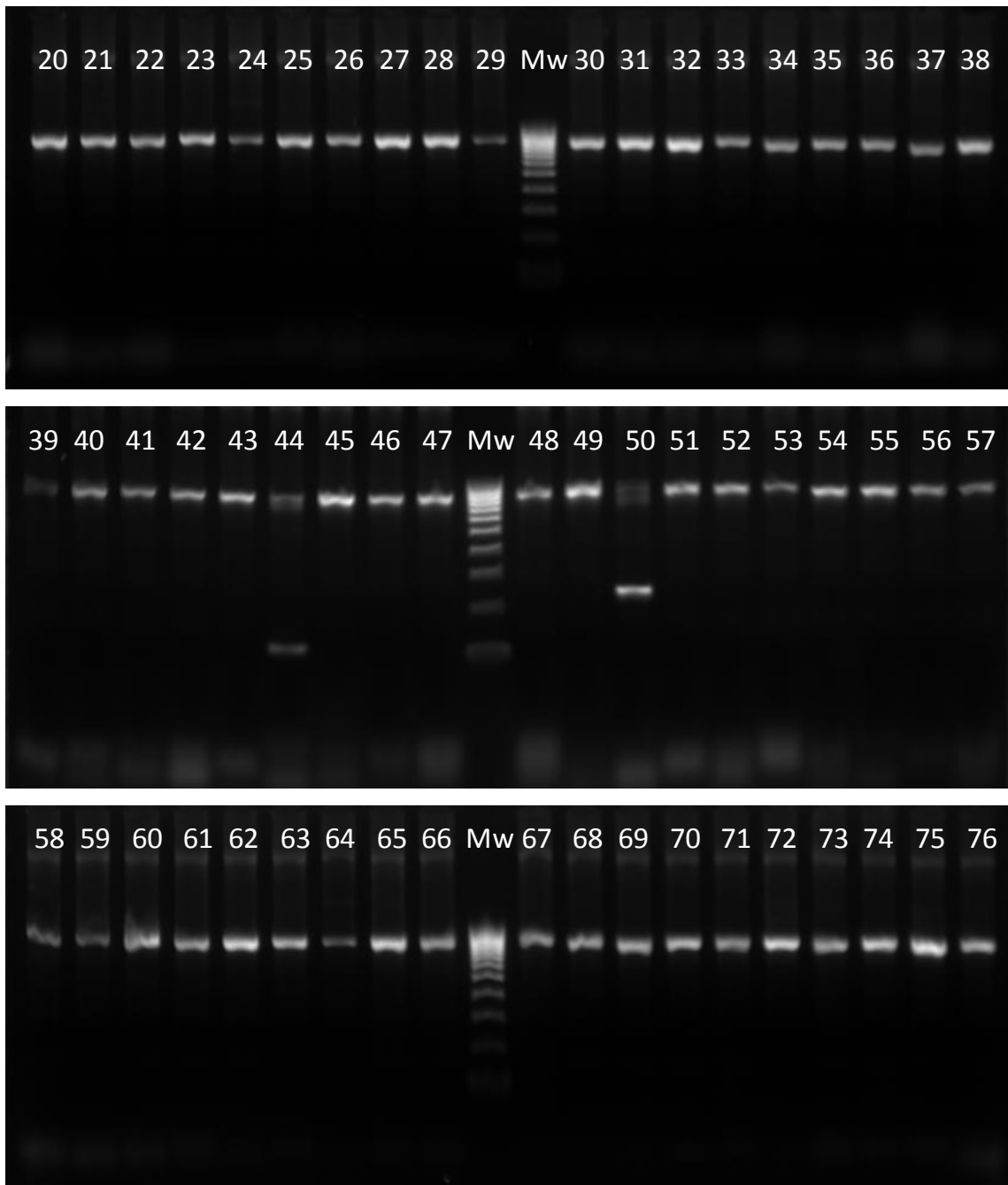
Mediante el kit de tipificación de alta resolución se pudo realizar la genotipificación a nivel alélico del locus HLA-DR β 1*04:01 en los voluntarios que mediante la tipificación de baja resolución fueron positivos para el locus DRB1*04. Ambas

técnicas utilizan el método SSP el cual es una técnica basada en PCR que utiliza cebadores específicos de secuencia (Sequence Specific Primers, SSP) para la tipificación de tejidos basada en ADN. La asignación de los alelos se realiza casi exclusivamente determinando si la amplificación se ha producido o no, es decir, mediante la visualización y la detección de la amplificación por medio de electroforesis en gel de agarosa.

Como se muestra en la Figura 8 se observan los amplificados específicos generados en la tipificación. Una vez conocidos los carriles en los cuales hubo amplificación se compara con la plantilla que trae el estuche comercial en donde se indican los carriles que deben amplificar para cada alelo en particular. Ver Anexo 12.5.

Como se presenta en la Tabla 4 luego de la tipificación de alta resolución se encontró que solo uno de los 10 voluntarios DR4 (V20) expresaba una copia del alelo HLA-DR β 1*04:01.





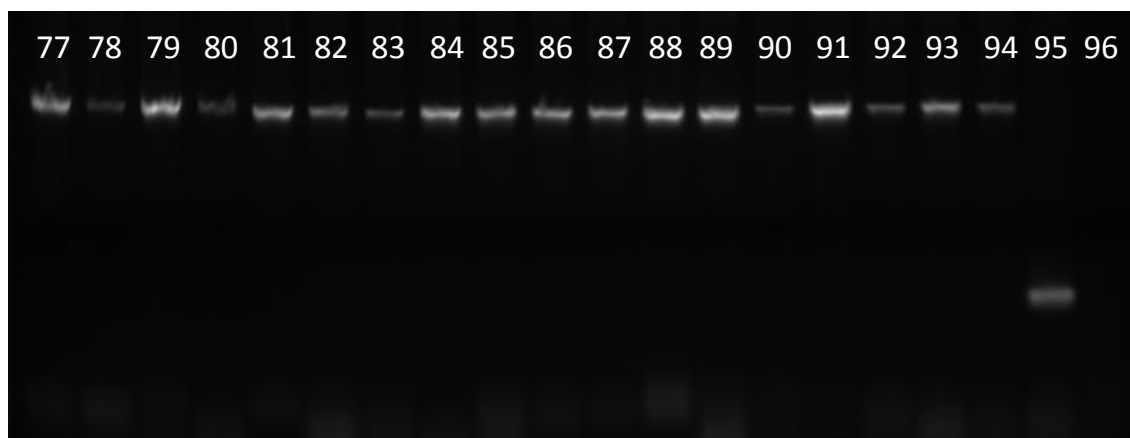


Figura 8. Gel de agarosa al 2% para la determinación de la tipificación de alta resolución. El carril 96 es el pozo de control de contaminación en el cual se han adicionado coctel de PCR, Taq polimerasa y agua pero sin la adición de DNA. En el gel se observan la banda de amplificación del control y las bandas específicas de alelo.

Voluntario	Tipificación alta resolución
V1	DRB1*04:07:01:07:02:07:03:07:04 DRB1*13:01:06 DRB3*01:08 DRB4*01:01:01:01:02:03:01:01:03:01:02N:03:02:03:04:04:05:06:07:08
V3	DRB1*04:02 DRB1*07:01:01:01:01:01:02:01:02:01:03:19 DRB1*07:08 DRB5*01:01:01:01:02:02:03:05:06:07:08N:09:10N:14,DRB5*02:02:05
V10	DRB1*04:02 DRB1*16:02:01:02:02:14 DRB4*01:01:01:01:02:03:01:01:03:01:02N:03:02:03:04:04:05:06:07:08 DRB5*01:01:01:01:02:02:03:05:06:07:08N:09:10N:14,DRB5*02:02:05
V11	DRB1*04:11 DRB1*07:01:01:01:01:01:02:01:02:01:03:19 DRB4*01:01:01:01:02:03:01:01:03:01:02N:03:02:03:04:04:05:06:07:08
V14	DRB1*04:05:01:05:02:05:03:05:04:05:05:05:06:05:07:05:09:05:10:80:83:89 DRB1*08:02:01:02:02:02:03 DRB4*01:01:01:01:02:03:01:01:03:01:02N:03:02:03:04:04:05:06:07:08
V17	DRB1*04:04:01:04:03:04:04:79 DRB1*09:01:02:01:03:01:04:01:05:01:06:01:07:09 DRB1*09:02:02

	DRB4*01:01:01:01/:02/:03:01:01/:03:01:02N/:03:02/:03:04/:04/:05/:06/:07/:08
V18	DRB1*01:24 DRB1*04:05:01/:05:02/:05:03/:05:04/:05:05/:05:06/:05:07/:05:09/:05:10/:80/:83/:89 DRB1*04:08:02 DRB4*01:01:01:01/:02/:03:01:01/:03:01:02N/:03:02/:03:04/:04/:05/:06/:07/:08
V20	DRB1*04:01:01/:01:02/:01:03/:01:04/:01:05/:01:06 DRB1*07:11 DRB4*01:01:01:01/:02/:03:01:01/:03:01:02N/:03:02/:03:04/:04/:05/:06/:07/:08
V21	DRB1*01:24 DRB1*04:03:01/:03:03/:03:04/:03:05 DRB4*01:01:01:01/:02/:03:01:01/:03:01:02N/:03:02/:03:04/:04/:05/:06/:07/:08
V25	DRB1*03:01:01:01/:01:01:02/:01:03/:01:04/:01:05/:01:07/:01:09/:45/:47/:48/:50/:51/:54/:55 DRB1*04:04:01/:04:03/:04:04/:79 DRB3*01:09,DRB3*02:02:01/:02:03/:02:04/:02:05/:03/:05/:07/:09/:10/:12/:13/:14/:15/:17/:19/:21/:22/:23/:25,DRB3*03:03 DRB4*01:01:01:01/:02/:03:01:01/:03:01:02N/:03:02/:03:04/:04/:05/:06/:07/:08

Tabla 4. Resultado de la tipificación de alta resolución de los voluntarios DR4. Los resultados resaltados en rojo muestran los diferentes alelos DR4 encontrados. El resultado resaltado en morado muestra el único voluntario (V20) que expreso una copia del alelo HLA-DRβ1*0401.

7.3 Alineamiento múltiple para los diferentes haplotipos

Con el fin de evaluar la validez del uso de células de voluntarios que expresaban alelos del grupo DRβ1*04 distintos al alelo HLA-DRβ1*04:01 se realizó una comparación de las secuencias de las proteínas de los diferentes haplotipos identificados con el fin de determinar en donde se encontraban las variaciones en los aminoácidos del bolsillo de unión de péptidos de los diferentes alelos DRβ1*04 tipificados. Para evaluar el grado de similitud de la molécula HLA-DRβ1*04:01 con las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por alelos del locus DRβ1*04 (DRβ1*04:02; DRβ1*04:03; DRβ1*04:04; DRβ1*04:05 y DRβ1*04:07)

expresadas por varios de los voluntarios del estudio, se realizó alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal W2.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

proteína_0401      MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEQVKHECHFFNGTERVRFDRYF  60
proteína_0405      MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEQVKHECHFFNGTERVRFDRYF  60
proteína_0403      MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEQVKHECHFFNGTERVRFDRYF  60
proteína_0407      MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEQVKHECHFFNGTERVRFDRYF  60
proteína_0404      MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEQVKHECHFFNGTERVRFDRYF  60
proteína_0402      MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEQVKHECHFFNGTERVRFDRYF  60
*****

proteína_0401      YHQEEYVRFDSVDVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKRAAVDTCRHNYGVGESFTV  120
proteína_0405      YHQEEYVRFDSVDVGEYRAVTELGRPSAEYWNSQKDLLEQKRAAVDTCRHNYGVGESFTV  120
proteína_0403      YHQEEYVRFDSVDVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKRAAVDTCRHNYGVGESFTV  120
proteína_0407      YHQEEYVRFDSVDVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKRAAVDTCRHNYGVGESFTV  120
proteína_0404      YHQEEYVRFDSVDVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKRAAVDTCRHNYGVGESFTV  120
proteína_0402      YHQEEYVRFDSVDVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKRAAVDTCRHNYGVGESFTV  120
*****

proteína_0401      QRRVYPEVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYFPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIQNG  180
proteína_0405      QRRVYPEVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYFPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIQNG  180
proteína_0403      QRRVYPEVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYFPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIQNG  180
proteína_0407      QRRVYPEVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYFPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIQNG  180
proteína_0404      QRRVYPEVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYFPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIQNG  180
proteína_0402      QRRVYPEVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYFPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIQNG  180
*****

proteína_0401      DWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLLG  240
proteína_0405      DWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLLG  240
proteína_0403      DWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLLG  240
proteína_0407      DWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLLG  240
proteína_0404      DWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLLG  240
proteína_0402      DWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLLG  240
*****

proteína_0401      FLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFSL  266
proteína_0405      FLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFSL  266
proteína_0403      FLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFSL  266
proteína_0407      FLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFSL  266
proteína_0404      FLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFSL  266
proteína_0402      FLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFSL  266
*****
    
```

Tabla 5. Resultado del alineamiento múltiple de los diferentes haplotipos encontrados en los voluntarios utilizando el programa ClustalW. La columna de la izquierda muestra el nombre del haplotipo que se desea analizar. La columna derecha muestra la secuencia de aminoácidos que constituyen cada uno de los haplotipos a analizar. Los símbolos debajo de cada columna de aminoácidos tiene el siguiente significado: (*): los aminoácidos en las secuencias son idénticos, (:) posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas y el punto (.), indica sustituciones menos conservativas.

El resultado de los alineamientos utilizando el programa ClustalW, mostró que la mayoría de las secuencias poseían residuos en su mayoría idénticos al alelo HLA-DRβ1*0401, lo cual se representa por los asteriscos (*) en la Tabla 5. Adicionalmente los dos puntos (:) indican posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas en las que el nuevo aminoácido tiene una cadena lateral con propiedades químicas similares y el punto (.), indica sustituciones menos conservativas.

Los resultados del análisis de homologías entre las secuencias presentadas en la Tabla 6 mostraron que las variaciones se encontraban en las posiciones: 86, 96, 99, 100, 103 y 115.

HLA-DRβ1*04:01 con	HLA-DRβ1*04:07	HLA-DRβ1*04:02	HLA-DRβ1*04:04	HLA-DRβ1*04:05	HLA-DRβ1*04:03
Identidad	264/266 (99.2%)	262/266 (98.5%)	264/266 (99.2%)	264/266 (99.2%)	263/266 (98.9%)
Similitud	265/266 (99.6%)	264/266 (99.2%)	265/266 (99.6%)	265/266 (99.6%)	264/266 (99.2%)
Puntaje	1412.0	1400.0	1408.0	1411.0	1403.0
Cambios en aminoácidos	K100R A103E	L96I Q99D K100E G115V	K100R G115V	D86S K100R	K100R A103E G115V

Tabla 6. Comparación del resultado de los alineamientos de los diferentes alelos DR4.

En el alineamiento de secuencias de proteínas, la identidad de secuencias se refiere al porcentaje de coincidencias de los mismos residuos de aminoácidos entre las dos secuencias alineadas. Por su parte la similitud de secuencias se refiere al porcentaje de residuos alineados que tienen características fisicoquímicas similares como el tamaño, carga e hidrofobicidad.

Al comparar el puntaje de los diferentes alineamientos se evidenció que la secuencia que se diferencia más de la del HLA-DRβ1*04:01 es HLA-DRβ1*04:02, y la de mayor similitud es HLA-DRβ1*04:07.

Predicción de epítopes

Por medio de la utilización de la base de datos PROPED la cual contiene algoritmos para la predicción de unión de epítopes a moléculas del complejo

mayor de histocompatibilidad, se pudieron determinar los siguientes valores de “score” de probabilidad de la unión de los diferentes péptidos a diferentes haplotipos MHC II expresados por los voluntarios:

Péptido	HLA- DRβ1*04:01	HLA- DRβ1*04:02	HLA- DRβ1*04:04	HLA- DRβ1*04:05
QNT-6	1,200	0	0	0
QNT-Y	2,200	0	0	0
T*-1	2,400	2,480	4,400	3,400

Tabla 7. Resultado de la predicción de unión de los diferentes péptidos a los diferentes haplotipos. El análisis fue realizado utilizando la base de datos PROPED.

Como se puede evidenciar en los “score” de las predicciones en la Tabla 7, el cambio de la Leucina en la posición 335 por Tirosina en el péptido (QNT-Y) genera un péptido cuya predicción pronostica una mejor unión de este análogo a la molécula de HLA-DRβ1*04:01. Por su parte los resultados de PROPED predicen que las secuencias QNT-6 y QNT-Y no tienen capacidad de unión alguna a los alelos HLA-DRβ1*04:02; HLA-DRβ1*04:04 y HLA-DRβ1*04:05 lo cual sugeriría que el uso en los ensayos funcionales de células de voluntarios que expresen estos alelos no estaría indicado.

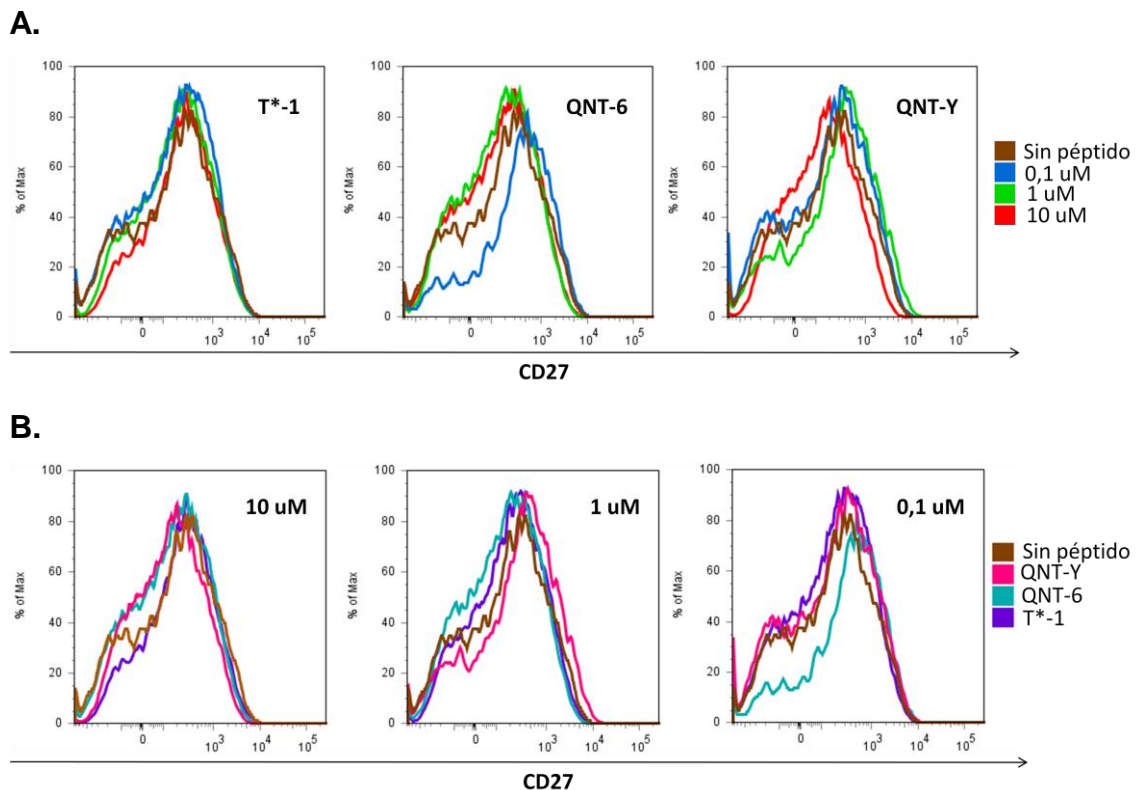
7.4 Resultado ensayos celulares

Los ensayos celulares se realizaron utilizando células de diferentes haplotipos: HLA-DRβ1*04:01, HLA-DRβ1*04:02 y HLA-DRβ1*04:07. Los resultados de los ensayos celulares con HLA-DRB1*04:02 y HLA-DRB1*04:07 no arrojaron resultados concluyentes (Datos no mostrados).

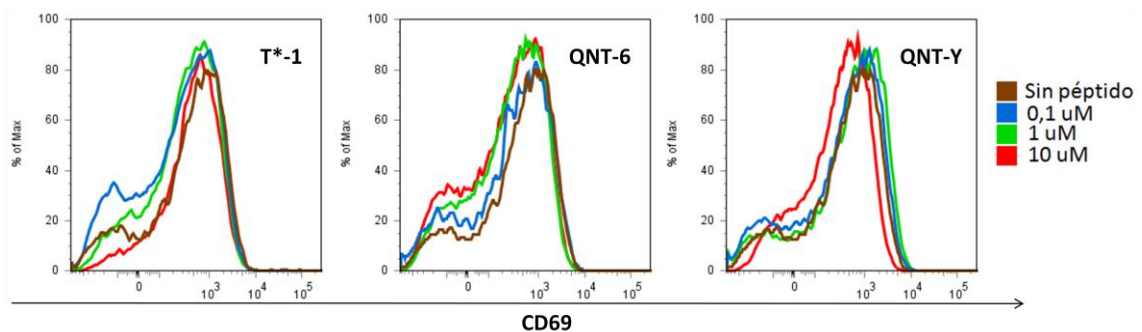
7.4.1 Expresión de CD27 y CD69

Los resultados mostrados a continuación corresponden al promedio de 3 ensayos realizados con células del donante HLA-DR β 1*04:01.

Mediante la utilización de marcadores como el CD27 que está relacionado con la generación de células de un fenotipo efector y el CD69 el cual es una molécula que se expresa en los estadios tempranos de la activación de los linfocitos T que se va perdiendo a medida que las células se van diferenciando [34, 35] se quiso evaluar las diferencias entre los diferentes péptidos utilizados a diferentes concentraciones.



C.



D.

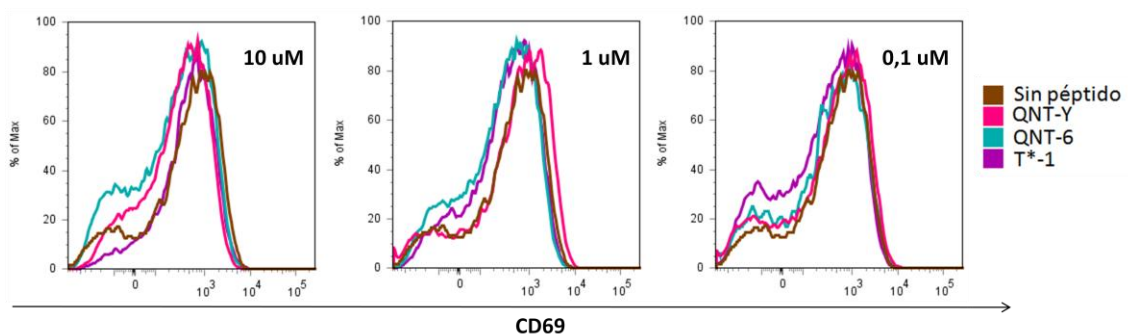


Figura 9. Determinación de la expresión de CD27 y CD69 en las líneas celulares HLA-DRβ1*0401 tras la doble estimulación con DCs pulsadas con péptido. Líneas celulares generadas a partir de PBMCs pulsadas con el péptido T1BT* y mantenidas durante 10 días con 300 UI/mL de IL-2. Las líneas fueron estimuladas dos veces con DCs pulsadas con los péptidos a diferentes concentraciones. El análisis de la expresión de CD27 y CD69 se realizó mediante citometría de flujo como se describe en la metodología (numeral 8.8.6).

Como se puede evidenciar en la Figura 9, bajo estas condiciones experimentales no fue posible observar diferencias significativas en la expresión de CD27 y CD69 durante la re-estimulación de la línea T1BT*/péptido con los diferentes péptidos utilizados a tres diferentes concentraciones.

7.4.2 Proliferación celular

Con el fin de identificar si el estímulo con los diferentes péptidos en varias concentraciones afectaba la proliferación, se realizó la tinción de las células de la

línea T1BT*/péptido con CFSE previo a la segunda re-estimulación con DCs pulsadas con diferentes concentraciones de péptido. Como se puede observar en la Figura 10 tras el re-estimulo con los diferentes péptidos todas las líneas proliferaron de igual manera como se puede observar por la dilución de la tinción con el CFSE al compararse con el día cero. De igual forma se puede observar que con esta metodología las líneas que fueron estimuladas con DCs que no habían sido pulsadas con péptido fueron capaces de proliferar de igual manera. Este resultado sugiere que esta proliferación no es antígeno específica atribuida posiblemente a una proliferación inducida en LT-CD4+ de la línea por DCs maduras.

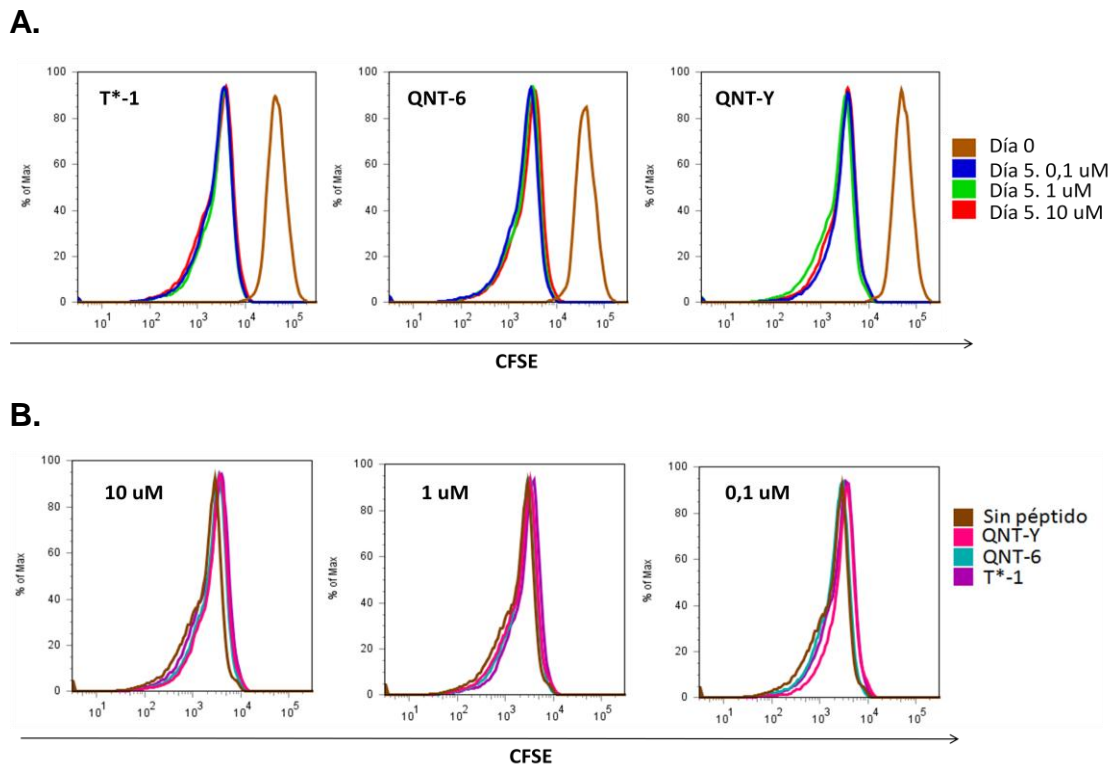
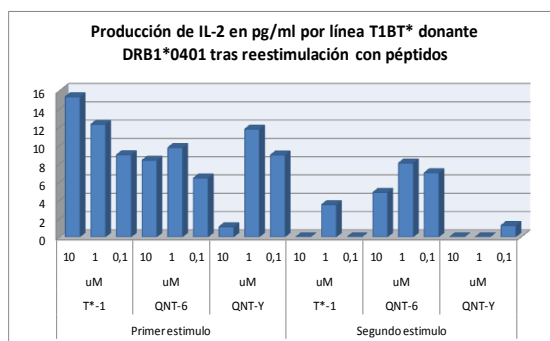


Figura 10. Proliferación por CFSE de líneas celulares HLA-DR β 1*0401 tras la estimulación con péptidos. Las líneas celulares fueron marcadas con CFSE a una concentración final de 1,5 μ M. Se realizó la determinación de la tinción de las células el día cero como control. Las líneas marcadas con CFSE y estimuladas con DCs pulsadas con diferentes concentraciones de péptidos, fueron cultivadas por 6 días con el fin de determinar por citometría de flujo el grado de proliferación en respuesta al re-estímulo de cada línea. **A.** Proliferación inducida en cada línea por cada uno de los péptidos utilizados a diferentes concentraciones durante la re-estimulación. **B.** Comparación de la proliferación inducida en cada línea por los diferentes péptidos utilizados a una misma concentración.

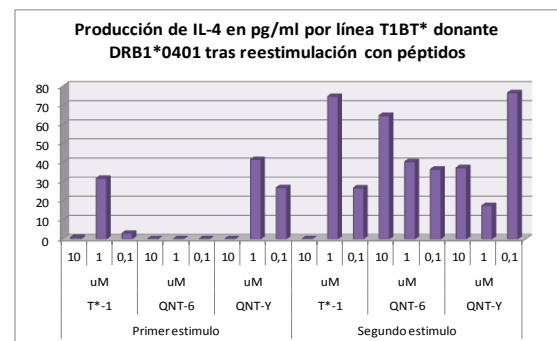
7.5 Determinación de citoquinas en sobrenadantes mediante CBA.

Además de la medición de CD27, CD69 y de medir el grado de proliferación, para medir grado de activación de la línea re-estimulada, se realizó la determinación de la concentración de las citoquinas, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ , en sobrenadantes (i) de la línea T1BT* recolectados 3 días después del primer re-estimulo con DCs pulsadas con péptido y (ii) en sobrenadantes de la línea T1BT*/péptido 3 días después del segundo re-estimulo. Este procedimiento se realizó mediante la utilización del kit CBA.

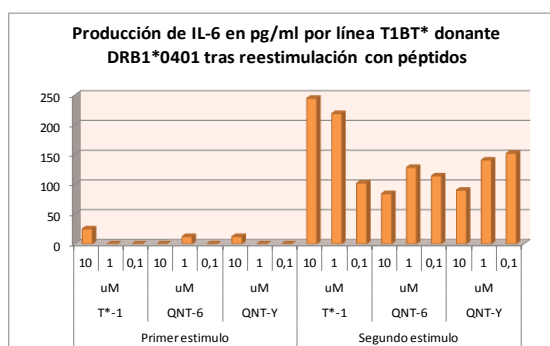
A.



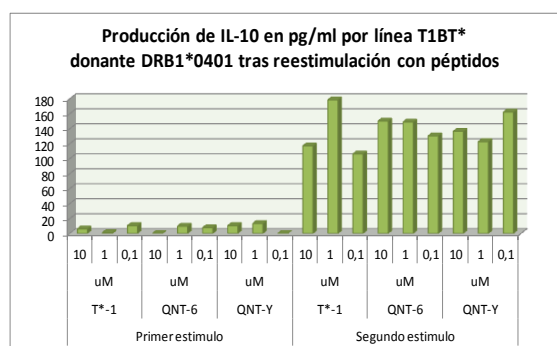
B.



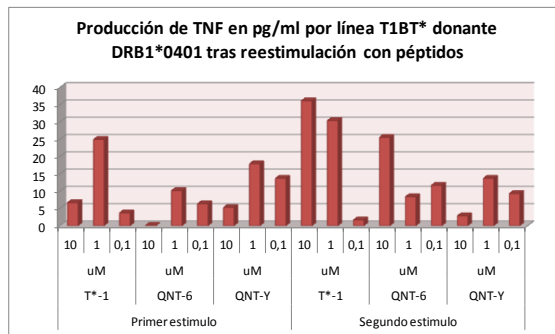
C.



D.



E.



F.

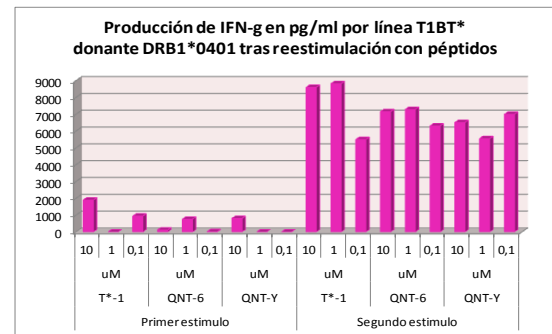


Figura 11. Determinación de citoquinas en sobrenadantes mediante CBA. La concentración en pg/mL de: A. IL-2, B. IL-4, C. IL-6, D. IL-10; E. TNF y F. IFN- γ fue determinada mediante CBA. Los sobrenadantes para la determinación de citoquinas fueron recolectados 3 días después de cada re-estimulación. Se realizó el análisis según las instrucciones del fabricante (BD BIOSCIENCES, San Diego, CA) y las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo.

Como se puede observar en las gráficas en la Figura 11, no fue posible evidenciar relación directa entre las concentraciones utilizadas de los péptidos y la capacidad de producción de citoquinas por parte de los linfocitos T. De igual manera el análisis por CBA de la producción de citoquinas no permitió establecer diferencias significativas entre los tres péptidos evaluados. Sin embargo, estos resultados permitieron evidenciar algunos comportamientos generales tales como una alta producción de IL-2 tras el primer re-estimuló que decreció substancialmente luego del segundo re-estimulo. Esta tendencia puede atribuirse a la dependencia de los linfocitos de esta citoquina en etapas tempranas del desarrollo. La citoquina que presentó mayor producción fue el IFN- γ , el cual incremento (5000 pg/mL) tras la segunda re-estimulación. Las gráficas B, C, D, E y F permiten evidenciar que es necesario un doble re-estimulo de las células de la línea de T1BT* con DCs pulsadas con péptidos para lograr un mayor grado de producción de citoquinas.

Una posible explicación de estos resultados es que la respuesta detectada corresponde a la respuesta de células que responden a la re-estimulación de la línea con péptidos cortos durante los dos re-estímulos que al ser cargados sobre la superficie de CPAs genera respuestas indistinguibles entre los tres péptidos

debido a que el procesamiento y presentación del antígeno se hace en ausencia de DM. No obstante estos resultados negativos, el aumento de la producción de citoquinas detectado en sobrenadantes de las líneas luego del segundo re-estimulo permite afirmar que en estas condiciones de cultivo es posible el “*priming in vitro*” de linfocitos T específicos contra los péptidos T*-1, QNT-6 y QNT-Y en un individuo que nunca ha tenido previa exposición al parasito. Este resultado lo atribuimos al uso de DCs como CPAs en estos ensayos. Finalmente, la respuesta de citoquinas producidas por la línea T1BT*/péptido en respuesta al re-estimulo con el péptido QNT-Y sugiere un importante grado de reconocimiento cruzado del péptido QNT-Y por LT-CD4+ específicos para la secuencia QNT-6.

7.6 Estimulación de linfocitos T presentes PBMCs con células dendríticas aceleradas.

En vista que la metodología utilizada no permitió encontrar diferencias en la respuesta de LT-CD4+ a los péptidos T*-1, QNT-Y, QNT-6, se decidió evaluar un método alternativo descrito en [36], el cual ha demostrado ser eficiente para la estimulación de Linfocitos T específicos contra antígenos peptídicos estimulando PBMCs con DCs generadas “in situ” [36]. El ajuste de nuestro protocolo a esta metodología se realizó como se describe en el numeral 8.11. Brevemente, el pulso inicial de PBMCs del voluntario HLA-DR β 1*0401 se hizo con el péptido T1BT* concomitante con la diferenciación a DCs de los monocitos presentes en PBMCs suplementando el medio de cultivo con IL-4 y GM-CSF por 24 horas. Una vez realizado el pulso inicial, a las 24 horas las células de la línea fueron cosechadas y dispensadas en cuatro cultivos los cuales fueron re-estimulados de manera individualizada con los péptidos T*-1; QNT-6 y QNT-Y (5 μ M) o sin péptido en presencia de un cocktail de maduración de DCs compuesto por las citoquinas (IL-1B, IL-6, TNF- α , PGE2 e IL-7). Los cultivos mantenidos por 6 días al cabo de los

cuales se hizo la determinación mediante CBA de citoquinas TH1 y TH2 presentes en los sobrenadantes de cultivo. Como lo muestra la Figura 12, estos experimentos permitieron evidenciar que en respuesta al re-estimulo con los péptidos QNT-Y y QNT-6 la línea T1BT* produce altas concentraciones de TNF- α y bajos niveles de IL-10 mientras que el re-estimulo con T*-1 al igual que la re-estimulación sin péptido indujo la producción de una alta concentración de IL-10 en estas células. De igual manera la Figura 12 permitió evidenciar un alto grado de reconocimiento del péptido QNT-Y por células que recibieron un estímulo inicial con QNT-6 manifiesto por una respuesta de tipo TH1 (alta producción de TNF- α y baja producción de IL-10), lo cual sugiere un reconocimiento cruzado del péptido QNT-Y por LT-CD4+ específicos para QNT-6.

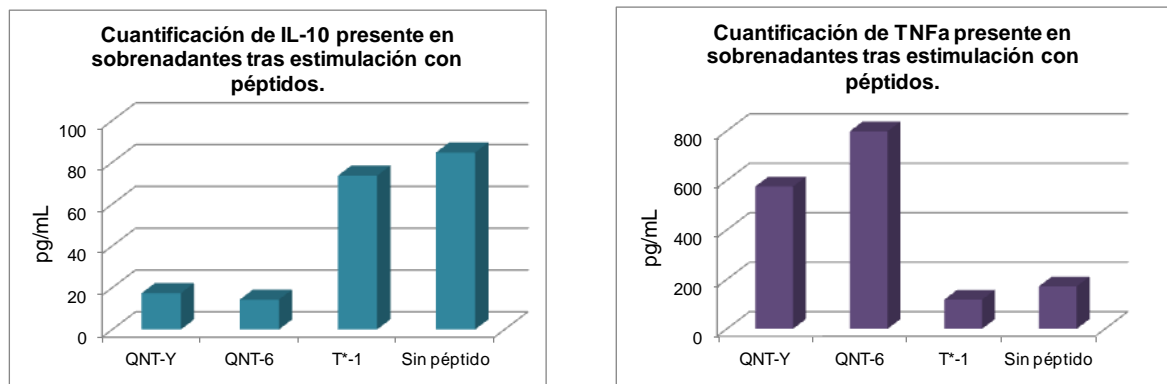


Figura 12. Cuantificación de IL-10 y TNF- α en sobrenadantes de la línea T1BT* tras su re-estimulación con los péptidos T*-1; QNT-6 o QNT-Y. La determinación de las citoquinas se realizó en los sobrenadantes utilizando un estuche comercial de CBA siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.7 Determinación del perfil de memoria de líneas generadas a partir de linfocitos CD4 vírgenes estimulados con DCs pulsadas con péptido.

Los experimentos realizados hasta ahora fueron hechos con LT-CD4+ totales presentes en PBMCs en los cuales se encuentran presentes tanto LT-CD4+ de memoria como LT-CD4+ vírgenes. En vista de que el grado de reconocimiento de

las epítopes T*-1; QNT-6 y QNT-Y por LT presentes en PBMCs obtenidos hasta ahora, pudiese estar influenciado por una respuesta no específica a estos péptidos por parte de linfocitos T de memoria presentes en estas preparaciones, nos llevó a evaluar el reconocimiento de los péptidos por preparaciones de linfocitos T vírgenes estimulados con células dendríticas pulsadas con los distintos antígenos. El grado de reconocimiento de los péptidos por LT-CD4+ vírgenes estimulados con DCs pulsadas con péptido fue realizado como se describe en la sección 8.12. A diferencia de los experimentos hechos hasta ahora, en estos experimentos se generaron dos líneas (i) la primera contra el péptido T1BT* y (ii) la segunda contra el péptido T1BT*-Y conteniendo a QNT-Y, las cuales fueron re-estimuladas en dos oportunidades con los péptidos T*-1 y QNT-6 la primera línea y con T*-1 y QNT-Y la segunda. Un estímulo final por 48 horas fue hecho a cada línea de forma individual con los tres péptidos T*-1; QNT-6; QNT-Y y sin péptido con el fin de establecer (i) el grado de inmuno-dominancia de las tres epítopes en las dos líneas y (ii) el grado de reactividad cruzada de las dos líneas con los péptidos QNT-6 y QNT-Y.

El análisis de los perfiles de memoria luego de dos re-estímulos evidenció que las líneas generadas originalmente a partir de LT vírgenes estimulados con DCs pulsadas con el péptido T1BT*-Y generaban un mayor porcentaje de células de memoria y efectoras (Figura 13) que el generado por LT-CD4+ vírgenes estimuladas con DCs pulsadas con el péptido T1BT* (Figura 14). Como se observa en la Figura 14, el porcentaje de células vírgenes en las líneas generadas con T1BT* fue 12.6% y 11.5% luego de dos re-estímulos de esta línea con los péptidos QNT-Y y QNT-6 respectivamente. Este porcentaje fue substancialmente mayor que el observado en la línea T1BT*-Y luego de dos re-estímulos con los péptidos QNT-Y y QNT-6 (5.42% y 5.81% respectivamente). Este resultado sugiere que el péptido QNT-Y estimuló más eficientemente la diferenciación de linfocitos vírgenes hacia fenotipos de memoria y efector que el péptido QNT-6. Estos datos estarían a favor de la hipótesis de que el péptido QNT-Y (más estable

a DM), estimula más eficientemente la diferenciación de LT-CD4+ vírgenes hacia fenotipos de memoria y efector que el péptido QNT-6 (inestable a DM).

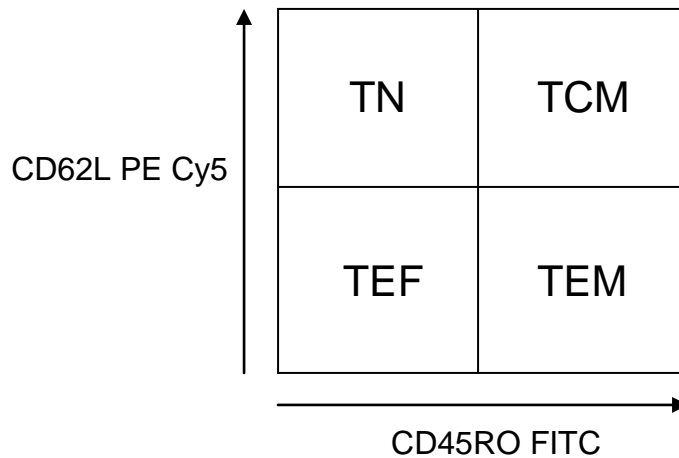
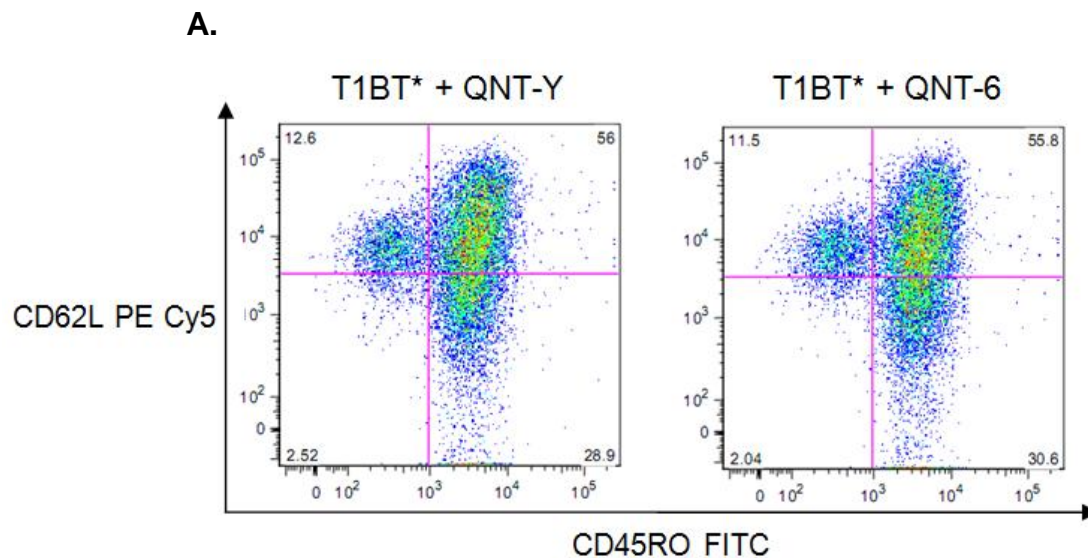


Figura 13. Distribución de las subpoblaciones vírgenes y de memoria mediante el uso de los marcadores CD62L y CD45RO. TN: células vírgenes CD62L+/CD45RO-, TCM: células de memoria central +/+, TEM: células de memoria efectora -/+ y TEF: células efectoras terminales -/-.



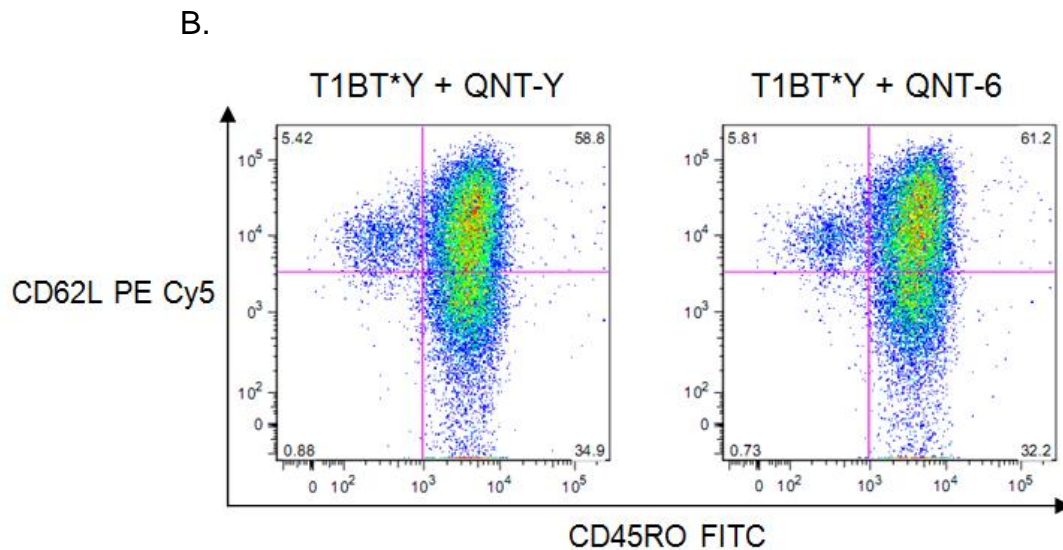


Figura 14. Determinación del perfil de memoria de las líneas generadas a partir de linfocitos T CD4 vírgenes tras su estimulación con DCs pulsadas con péptidos. Líneas celulares generadas utilizando el péptido T1BT* o T1BT*-Y fueron reestimuladas con DCs pulsadas con los péptidos cortos o sin péptido como control. El porcentaje de células vírgenes, de memoria y efectoras fue determinado mediante citometría de flujo analizando la distribución en las células de los marcadores CD62L y CD45RO como se describe en la Figura 13.

Al analizar las células tetrámero positivas en líneas de células vírgenes pulsadas inicialmente con T1BT* o T1BT*-Y luego de dos re-estímulos con los péptidos QNT-6 y QNT-Y y un re-estimulo final de cada línea con cada uno de los tres péptidos de manera individual y sin péptido (cultivo control), se observó un mayor porcentaje de células QNT-6 y QNT-Y tetrámero positivas en los cultivos re-estimulados con QNT-6 o QNT-Y comparado con el porcentaje detectado en el cultivo control (línea re-estimulada solo con DCs sin péptido (Figura 15)). Sin embargo el análisis de células tetrámero positivas no permitió evidenciar diferencias significativas en la capacidad de ninguna epítipo para favorecer la expansión de LT-CD4+ vírgenes en respuesta a una epítipo en particular (Figura 15 y datos no mostrados).

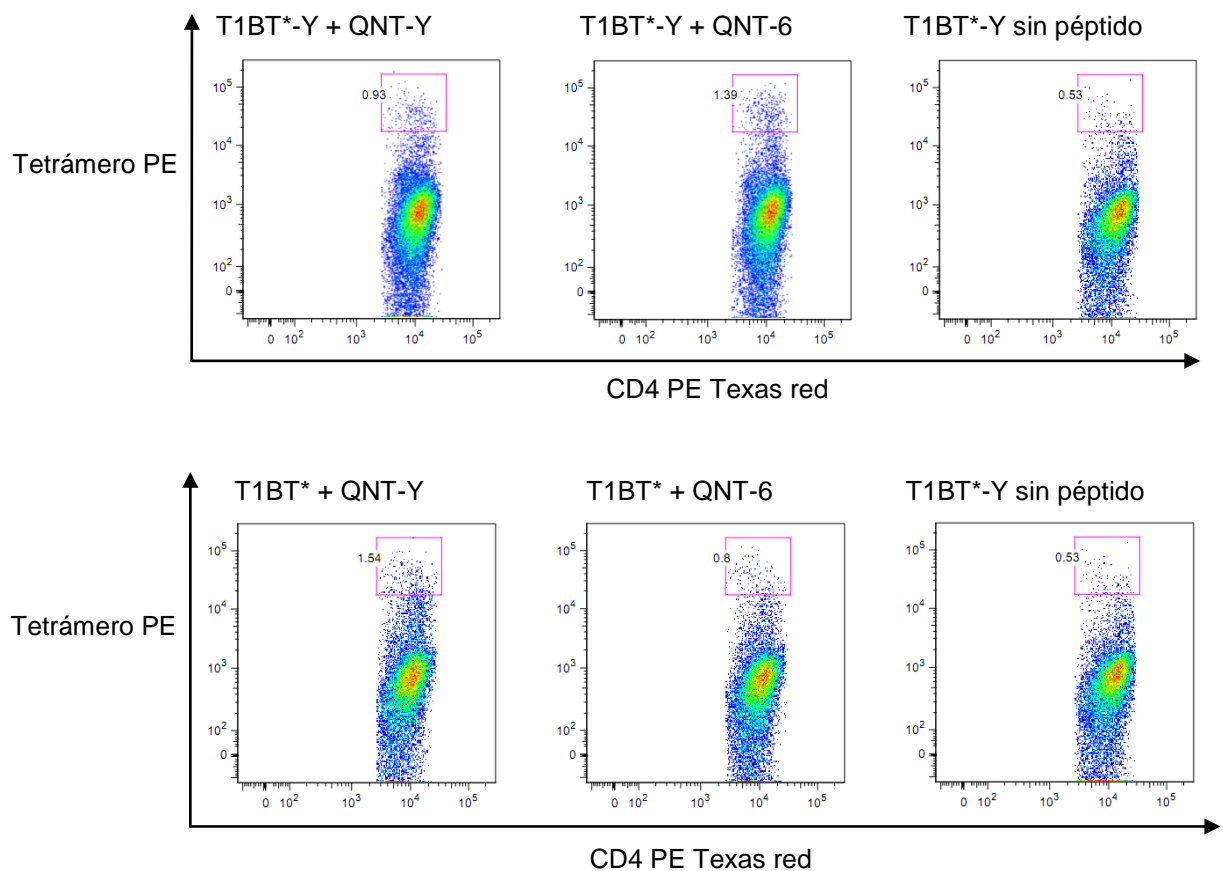


Figura 15. Porcentaje de células tetrámero positivas en las líneas generadas a partir de LT-CD4+ vírgenes pulsados inicialmente con T1BT* y T1BT*-Y tras dos re-estimulaciones con QNT-Y, QNT-6 y sin péptido como control. En cada caso el tetrámero utilizado para la tinción fue el correspondiente al péptido utilizado en la última re-estimulación.

Mediante la determinación de la expresión de CD27 en las células tetrámero positivas fue posible observar que tras la re-estimulación con el péptido QNT-Y tanto las líneas originalmente generadas a partir del péptido T1BT* como T1BT*-Y, la pérdida de la expresión de CD27 en células tetrámero positivas fue máxima cuando se compara con la pérdida de este marcador inducida por el re-estimulo con T*-1 o QNT-6 (Figura 16). Estas evidencias sugieren que bajo estas condiciones de cultivo el péptido QNT-Y es más eficiente que el péptido QNT-6 estimulando la diferenciación de LT-CD4+ vírgenes hacia un fenotipo efector

evidenciado por la pérdida de la expresión del marcador CD27 de la superficie de estas células.

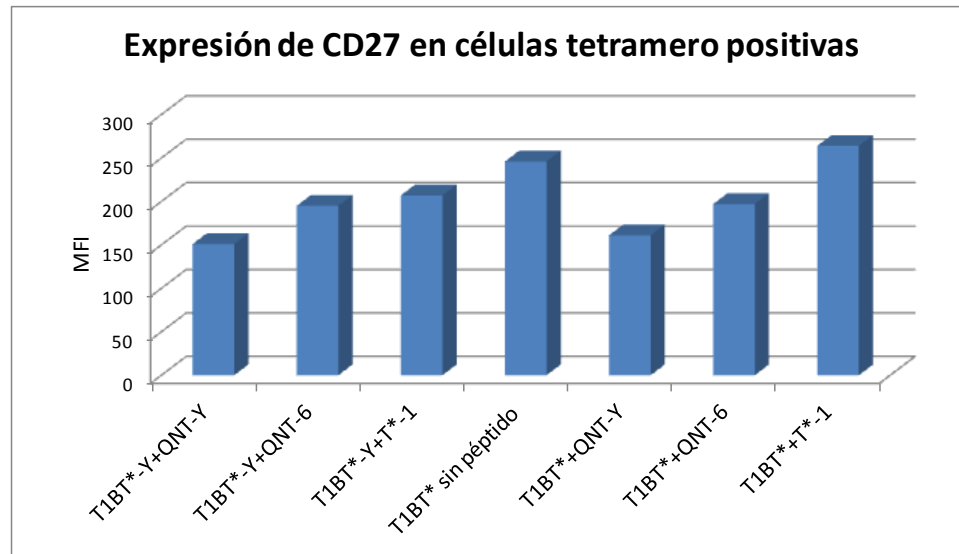


Figura 16. Pérdida de la expresión de CD27 en células tetramero positiva luego del re-estimulo con diferentes péptidos. En cada panel el tetramero utilizado para teñir cada cultivo corresponde al tetramero cargado con el péptido utilizado para el re-estimulo final. En el caso de los cultivos control (cultivos re-estimulados con DCs sin pulsar con péptido) estos cultivos fueron teñidos con un tetramero control DR4 unido a un péptido no relacionado.

7.8 Cuantificación de LT-CD4+ específicos para T*-1; QNT-6 y QNT-Y generados de LT vírgenes estimulados con DCs que procesan y presentan naturalmente los péptidos T1BT* y T1BT*-Y.

Teniendo en cuenta que la utilización de péptidos cortos durante el re-estimulo *in vitro* podría estar generando LT-CD4 específicos para estas epítopes que se estimulan producto de la presentación de las epítopes sobre la superficie celular de la célula presentadora en ausencia de HLA-DM, se decidió realizar un experimento en el cual se evaluara la generación de LT específicos para estas epítopes luego del procesamiento natural de las epítopes T1BT* y T1BT*-Y por

DCs. La cuantificación de los LT-CD4+ específicos para cada epítipo se midió con tetrámeros fluorescentes específicos para cada complejo DR4/péptido analizado. Para realizar este experimento LT-CD4+ vírgenes del voluntario HLA-DRβ1*04:01 fueron estimulados con DCs pulsadas con el péptido T1BT* o T1BT-Y como se describió en la metodología (sección 8.13).

En este experimento se pudieron determinar las diferentes sub-poblaciones de memoria generadas luego del estímulo de los LT-CD4+ vírgenes con cada péptido al igual que el porcentaje de las células tetrámero positivo tanto dentro de la población total de linfocitos en cultivo como dentro de cada sub-población de memoria (central y efectora). De igual forma la expresión de CD27 pudo ser determinada en células tetrámero-positivo. Finalmente, mediante el uso de CBA fue posible determinar la producción de citoquinas como el IFN- γ en los cultivos luego de dos re-estímulos.

Como se observa en la Figura 17, basados en el porcentaje de las células vírgenes (cuadrante superior izquierdo) en los dos grupos, se puede sugerir que las líneas generadas con el péptido T1BT* generan más células de memoria que la línea generada con T1BT*-Y. Esto quiere decir que el péptido QNT-6 contenido dentro de T1BT*, genera en LT-CD4+ vírgenes una mayor proporción de linfocitos que se diferencian a células efectoras productoras de citoquinas en comparación con el péptido QNT-Y contenido dentro de T1BT*-Y.

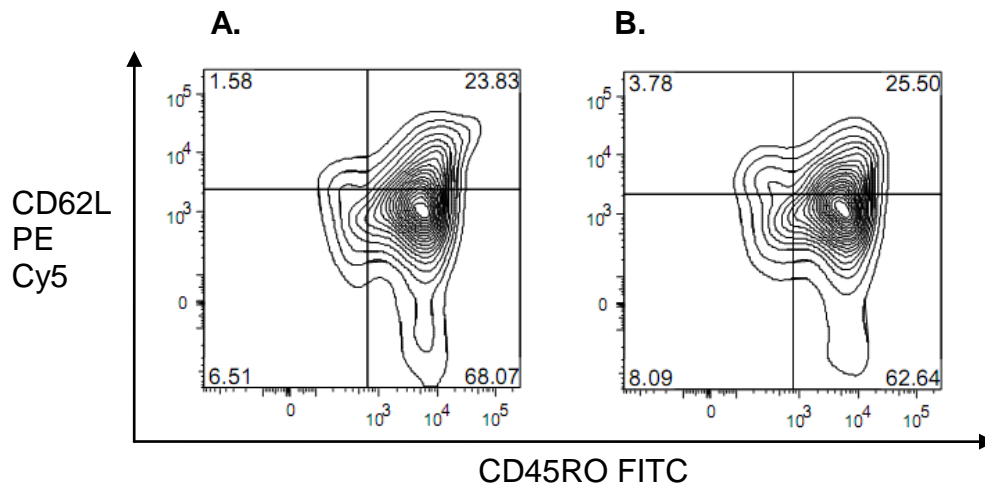


Figura 17. Subpoblaciones de memoria generadas en las líneas para T1BT* y T1BT*-Y. **A.** Línea generada a partir de linfocitos CD4 vírgenes estimulados con DCs pulsadas con T1BT*, re-estimulados con DCs pulsadas con T1BT* y teñidas con tetrámero para QNT-6. **B.** Línea generada a partir de linfocitos CD4 vírgenes estimulados con DCs pulsadas con T1BT*-Y, re-estimulados con DCs pulsadas con T1BT*-Y y teñidas con tetrámero para QNT-6.

Mediante la utilización de tetrámeros para los diferentes péptidos T*-1, QNT-6 y QNT-Y se pudo determinar el porcentaje de células tetrámero positivas para cada péptido.

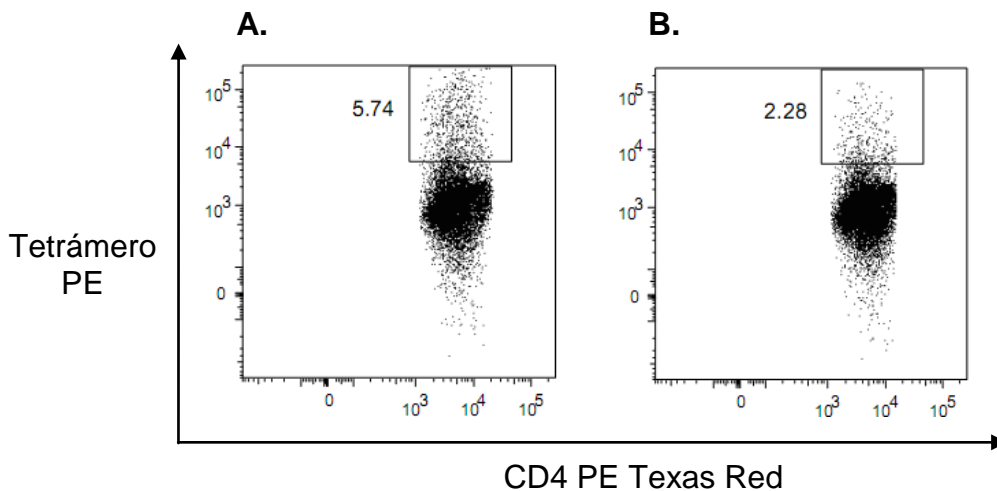


Figura 18. Porcentaje de células CD4+, tetrámero QNT-6 positivas. **A.** Línea generada a partir de linfocitos CD4 vírgenes estimulados con DCs pulsadas con T1BT*, re-estimulados con DCs pulsadas con T1BT* y teñidas con tetrámero para QNT-6. **B.** Línea generada a partir de linfocitos CD4 vírgenes estimulados con DCs pulsadas con T1BT*-Y, re-estimulados con DCs pulsadas con T1BT*-Y y teñidas con tetrámero para QNT-6.

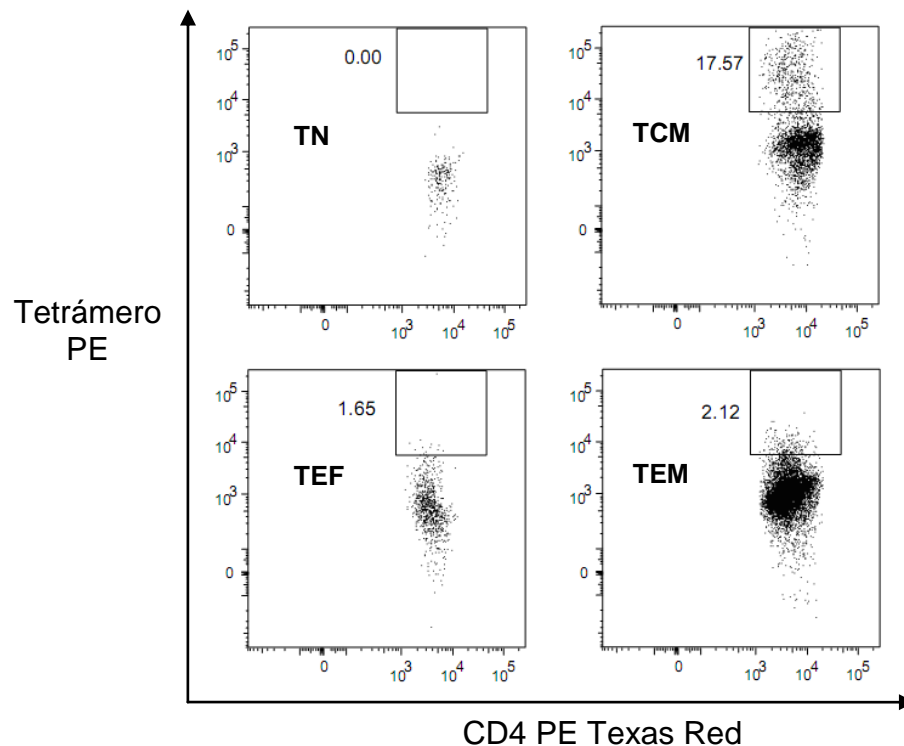
Como se puede observar en la Figura 18, las células de la línea generadas con el péptido T1BT* generan un mayor número de células que exhiben una tinción positiva con el tetrámero DR4/QNT-6 que las que provienen de línea generada con T1BT*-Y. Este resultado sugiere que en las condiciones de cultivo utilizadas LT-CD4+ vírgenes pulsados con DCs que procesan naturalmente el péptido T1BT* generaron linfocitos T específicos para QNT-6 más eficientemente que LT-CD4+ vírgenes estimulados con DCs que procesaron naturalmente el péptido T1BT*-Y. Esto indica una ventaja del procesamiento intracelular de la epítope QNT-6 (menos estable a DM) sobre la epítope QNT-Y (más estable). En la Tabla 8 se presentan los porcentajes de células CD4+ tetrámero positivas obtenidas en cada uno de los cultivos de LT-CD4+ vírgenes estimulados con DCs pulsadas con T1BT* y T1BT*-Y, luego de la tinción utilizando diferentes tipos de tetrámeros. Los resultados de la Tabla 8 indican que TCRs de LT específicos para QNT-6 reconocen complejos fluorescentes DR4/QNT-Y y que TCRs de LT generados con el péptido QNT-Y reconocen complejos fluorescentes DR4/QNT-6 sugiriendo un alto grado de reactividad cruzada entre las dos epítopes.

LÍNEA	Tetrámero utilizado en la tinción	% de células CD4+ Tetrámero+
T1BT*	T*-1	3.25%
T1BT*	QNT-6	5.74%
T1BT*	QNT-Y	2.93%
T1BT*	Control sin tetrámero	0.02%
T1BT*-Y	T*-1	2.66%
T1BT*-Y	QNT-6	2.28%
T1BT*-Y	QNT-Y	1.70%
T1BT*-Y	Control sin tetrámero	0.01%

Tabla 8. Porcentaje de células CD4+ para cada uno de los tetrámeros utilizados.

Con el fin de determinar cuál de las sub-poblaciones de memoria y efectoras específicas para QNT-6 y QNT-Y se caracterizaba por presentar un mayor porcentaje de células tetrámero positivas, se realizó el análisis en células vírgenes, células de memoria central y células efectora de la tinción con cada uno de los tetrámeros en cada una de las líneas específicas para T1BT* y T1BT*-Y. La Figura 19 muestra los resultados obtenidos de la tinción de las líneas T1BT* y T1BT*-Y utilizando el tetrámero QNT-6, ya que fue en el que se evidencio el mayor cambio entre las dos líneas. Como se observa en esta figura tanto en la línea T1BT* como de T1BT*-Y la mayoría de las células tetrámero positivas para QNT-6 corresponden a células de memoria central (TCM). Este resultado sugiere que el péptido QNT-6 favorece un estadio temprano de diferenciación de LT-CD4+ virgen a LT de memoria central.

A.



B.

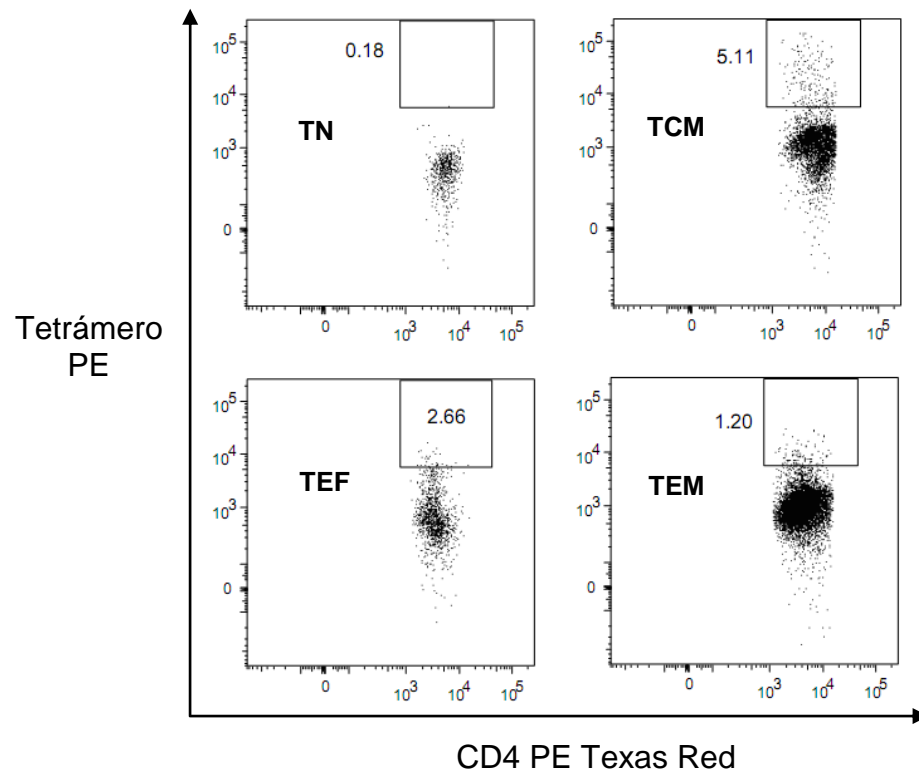


Figura 19. Células Tetrámero positivas para QNT-6 en células vírgenes y en las sub-poblaciones de memoria central y efectora. A. Línea generada a partir de linfocitos CD4 vírgenes estimulados con DCs pulsadas con T1BT*, re-estimulados con DCs pulsadas con T1BT* y teñidas con tetrámero para QNT-6. **B.** Línea generada a partir de linfocitos CD4 vírgenes estimulados con DCs pulsadas con T1BT*-Y, re-estimulados con DCs pulsadas con T1BT*-Y y teñidas con tetrámero para QNT-6.

La Tabla 9 resume los porcentajes de células tetrámero positivas para cada uno de los péptidos, en las diferentes sub-poblaciones: LT vírgenes (TN), sub-población de LT-CD4+ de memoria central (TCM); LT de memoria efectora (TEM) y LT efectores terminales (TEF) pulsados con el péptido T1BT* (parte superior de la tabla) y T1BT*-Y (parte inferior).

LÍNEA	Tetrámero	% de células TN Tetrámero+	% de células TCM Tetrámero+	% de células TEF Tetrámero+	% de células TEM Tetrámero+
T1BT*	T*-1	0.76%	7.68%	0.87%	1.99%
T1BT*	QNT-6	0.00%	17.57%	1.65%	2.12%
T1BT*	QNT-Y	0.29%	7.93%	0.20%	1.16%
T1BT*	Control sin tetrámero	0.00%	0.06%	0.00%	0.00%
T1BT*-Y	T*-1	0.00%	8.19%	0.79%	1.17%
T1BT*-Y	QNT-6	0.18%	5.11%	2.66%	1.20%
T1BT*-Y	QNT-Y	0.50%	4.47%	0.26%	0.98%
T1BT*-Y	Control sin tetrámero	0.00%	0.06%	0.00%	0.00%

Tabla 9. Porcentaje de células tetrámero positivas para los diferentes péptidos en las diferentes sub-poblaciones de LT.

Teniendo en cuenta que la pérdida del marcador CD27 es sugestivo de la diferenciación de los linfocitos hacia un fenotipo efector, se quiso determinar la expresión de este marcador en células tetrámero positivas para QNT-6, en cada una de las sub-poblaciones de LT para cada una de las líneas generadas contra los péptidos T1BT* y T1BT*-Y. Como se muestra en la Figura 20 la expresión de CD27 es menor en las sub-poblaciones TCM y TEM de la línea generada con T1BT*, lo cual sugiere que el péptido QNT-6 presente en T1BT* genera una mayor diferenciación de los linfocitos hacia un fenotipo efector que el péptido QNT-Y presente en T1BT*-Y, lo cual sugiere una mayor capacidad de la epítipe QNT-6 para inducir un fenotipo efector en LT-CD4+ vírgenes estimulados con este péptido.

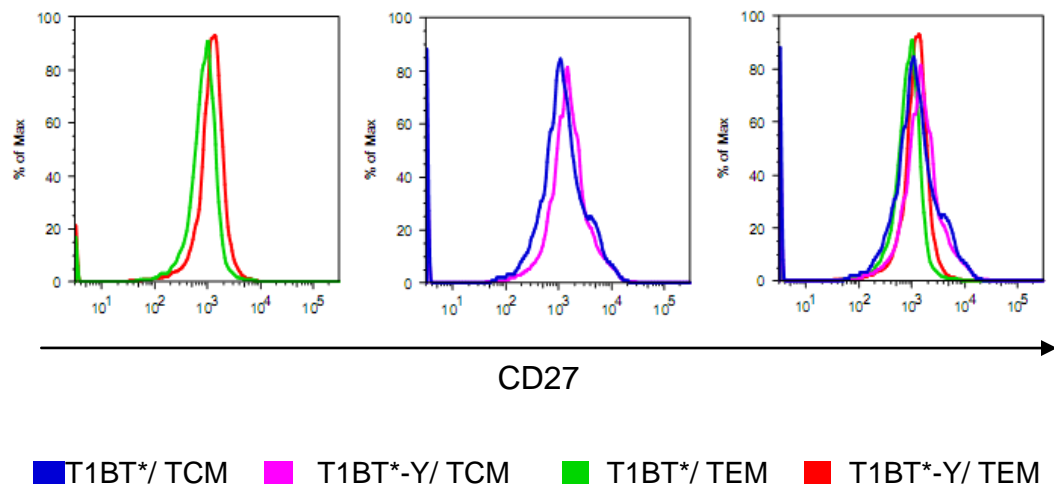


Figura 20. Expresión de CD27 en las subpoblaciones de memoria central (TCM) y memoria efectora (TEM) de las líneas generadas con T1BT* y T1BT*-Y.

Teniendo en cuenta que las células efectoras se caracterizan por su producción de citoquinas, se quiso determinar la producción de citoquinas tales como el IFN- γ en las células activadas.

Como se muestra en la Figura 21, las líneas generadas con el péptido T1BT* producen una mayor cantidad de IFN- γ que las líneas generadas con el péptido T1BT*-Y, lo cual concuerda con la evidencia de una mayor capacidad de la epítipo QNT-6 para favorecer la generación de células efectoras, haciendo que este péptido sea más inmunogénico que su análogo QNT-Y.

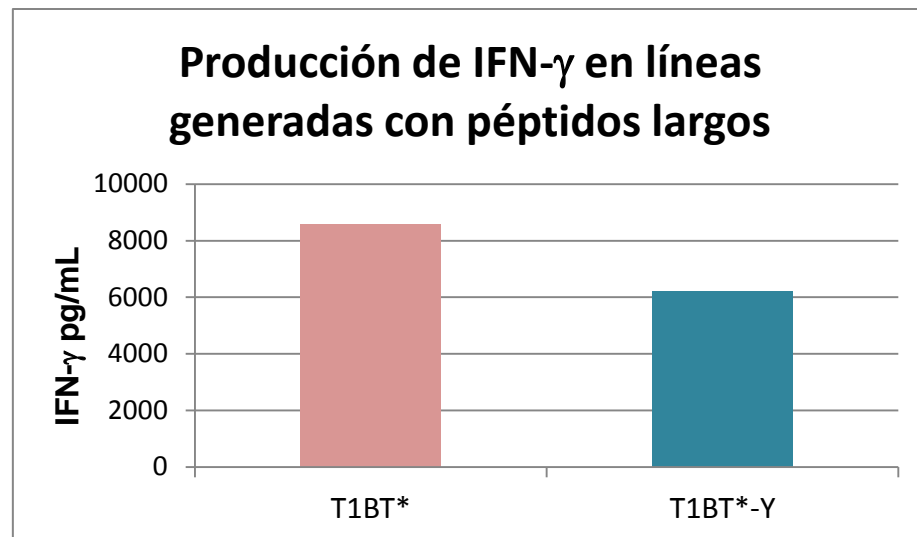


Figura 21. Producción de IFN- γ en los sobrenadantes de las líneas generadas con T1BT* y T1BT*-Y.

Tomando en consideración que los resultados obtenidos *in vitro* sugerían que contrario a lo esperado, el péptido QNT-6 era más inmunógeno que el péptido QNT-Y, se decidió realizar experimentos *in vivo* en un modelo utilizando ratones que expresan el transgén para el alelo DR4, con el fin de evaluar el desempeño como epítoto cooperadora o “helper” de las epítotos QNT-6 y QNT-Y *in vivo*. Para esto grupos de ratones transgénicos para DR4 fueron vacunados con los péptidos T1BT* y T1BT*-Y como se describe en la metodología sección 8.14.2.

7.9 Determinación mediante citometría de flujo de la expresión de moléculas HLA-DR β 1*04:01 en ratones transgénicos.

Previa la inmunización de los ratones transgénicos fue evaluado el grado de expresión de la molécula DR4 en células de estos animales. El resultado de la expresión de moléculas HLA-DR β 1*04:01 en los ratones transgénicos se encuentra descrita en el Anexos 12.7. Los niveles de molécula HLA-DR detectados en leucocitos de los ratones utilizados para estos experimentos

sugieren que los ratones utilizados expresaban niveles adecuados del transgen que codifica para el alelo HLA-DR β 1*04:01.

7.10 Determinación del título de anticuerpos en suero de ratones por ELISA

Para evidenciar de manera directa el impacto de la estabilidad de complejos MHC/péptido en el desempeño de epítopes ayudadoras o “helper”, se evaluó la capacidad de las epítopes QNT-6 y QNT-Y para inducir en linfocitos B de ratones DR4-transgénicos la producción de anticuerpos *in vivo* contra el péptido NANP de la proteína CS.

Para esto, la cantidad de anticuerpos contra la epitope B (secuencia NANP repetida tres veces en los peptidos T1BT* y T1BT*-Y) presentes en los sueros de ratones inmunizados a diferentes tiempos bien sea (i) con solo adyuvante como control o (ii) con los péptidos T1BT* o T1BT*-Y, fueron determinados mediante ELISA como se describió en la metodología (sección 8.14.3).

La cantidad de anticuerpo presente en los sueros fue determinada mediante diluciones seriadas por ELISA. El título de anticuerpos fue establecido como la dilución a la cual la absorbancia obtenida mediante ELISA era mayor a 0,100 el cual era el valor de ruido de fondo. La Tabla 10 presenta el título de anticuerpos de los cuatro ratones inmunizados con cada péptido evaluados en cuatro puntos tiempo (luego de cada una de las tres dosis de antígeno) y previo al sacrificio de los animales 45 días después de la tercera dosis.

Péptido utilizado en la inmunización	Ratón	Título de anticuerpos			
		20 días después de 1 ^{ra} dosis	20 días después de 2 ^{da} dosis	27 días después de 3 ^{ra} dosis	45 días después de 3 ^{ra} dosis
T1BT*	1	1280	10240	10240	10240
	2	1280	10240	40960	40960
	3	1280	5120	20480	20480
	4	1280	10240	10240	10240
T1BT*-Y	1	1280	2560	2560	2560
	2	1280	1280	1280	640
	3	1280	1280	1280	1280
	4	1280	5120	2560	1280

Tabla 10. Título de anticuerpos contra NANP presentes en los sueros de los ratones inmunizados.

Los resultados de títulos de anticuerpo muestran altos títulos de anticuerpo en todos los animales vacunados con T1BT* comparados con aquellos medidos en los animales vacunados con el péptido T1BT*-Y.

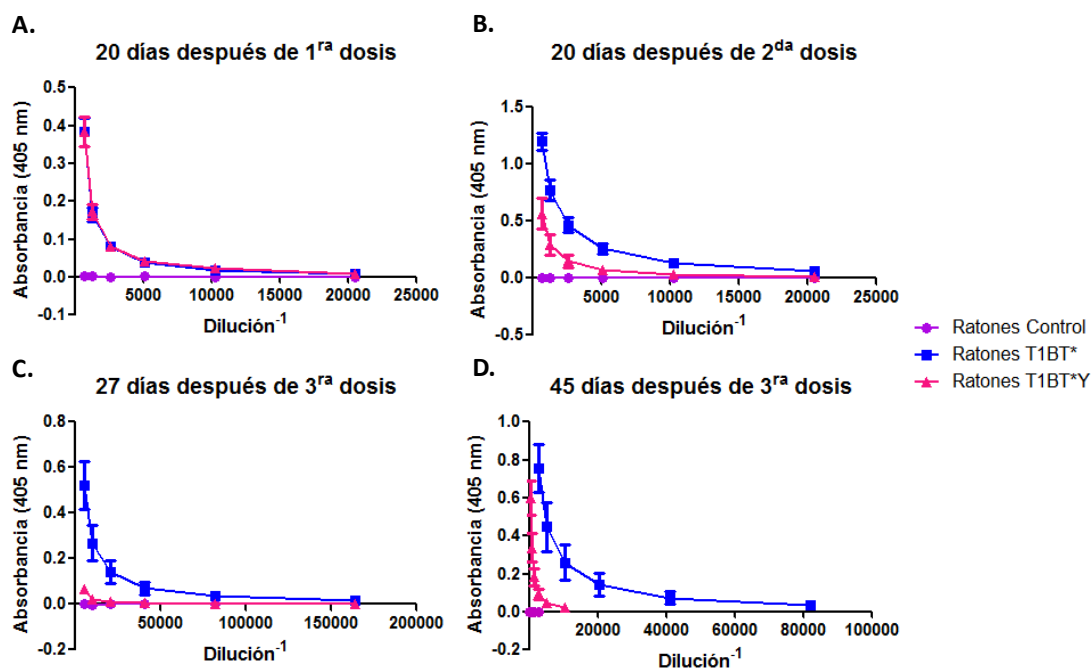


Figura 22. Curvas que muestran los títulos de anticuerpos contra la epítoto B (NANP) presentes en el suero de los ratones inmunizados. Cada una de las curvas corresponde al promedio de los resultados obtenidos para cada grupo de ratones. Las barras muestran la desviación estándar entre los ratones de cada grupo.

La Figura 22 permite evidenciar las concentraciones de anticuerpos a las diferentes diluciones establecidas en los diferentes puntos tiempo. La figura muestra que si bien los títulos de anticuerpo fueron similares en los sueros de ratones inmunizados con el péptido T1BT* y T1BT*-Y determinada 20 días después de la inmunización con la primera dosis del péptido, tras las diferentes inmunizaciones en el tiempo se encontró que los títulos de anticuerpos en los sueros de ratones inmunizados con el péptido T1BT*-Y conteniendo la epítope QNT-Y (estable a DM), tenían menor cantidad de anticuerpos contra la epítope NANP que los sueros de los ratones inmunizados con el péptido T1BT* que contiene la epítope nativa QNT-6 (DM inestable).

7.11 Determinación de producción de IFN- γ por ELISPOT a partir de esplenocitos de ratones transgénicos inmunizados con T1BT* o T1BT*-Y

La producción de IFN- γ fue determinada mediante la técnica de ELISPOT (sección 8.14.4), utilizando para ello células del bazo de ratones inmunizados con solo adyuvante; con péptido T1BT* o con péptido T1BT*-Y. Estas células fueron estimuladas in vitro con los péptidos T*-1, QNT-6 y QNT-Y, con el fin de evidenciar: 1) La respuesta de los células de los ratones inmunizados con T1BT* a los péptidos T*-1 y QNT-6 contenidos en T*; 2) La respuesta de los células de los ratones inmunizados con T1BT*-Y a los péptidos T*-1 y QNT-Y contenidos en T*-Y, y 3) La reactividad cruzada de las células de ratones inmunizados con T1BT* al péptido QNT-Y y la reactividad cruzada de las células de ratones inmunizados con T1BT*-Y al péptido QNT-6. Como control negativo las células no fueron pulsadas con péptido y adicionalmente se utilizó la estimulación con un péptido no relacionado (péptido de hemaglutinina del virus de influenza (HA 306 a 318) del

cual existe abundante evidencia experimental de ser un péptido que se une de manera estable a la molécula DR4).

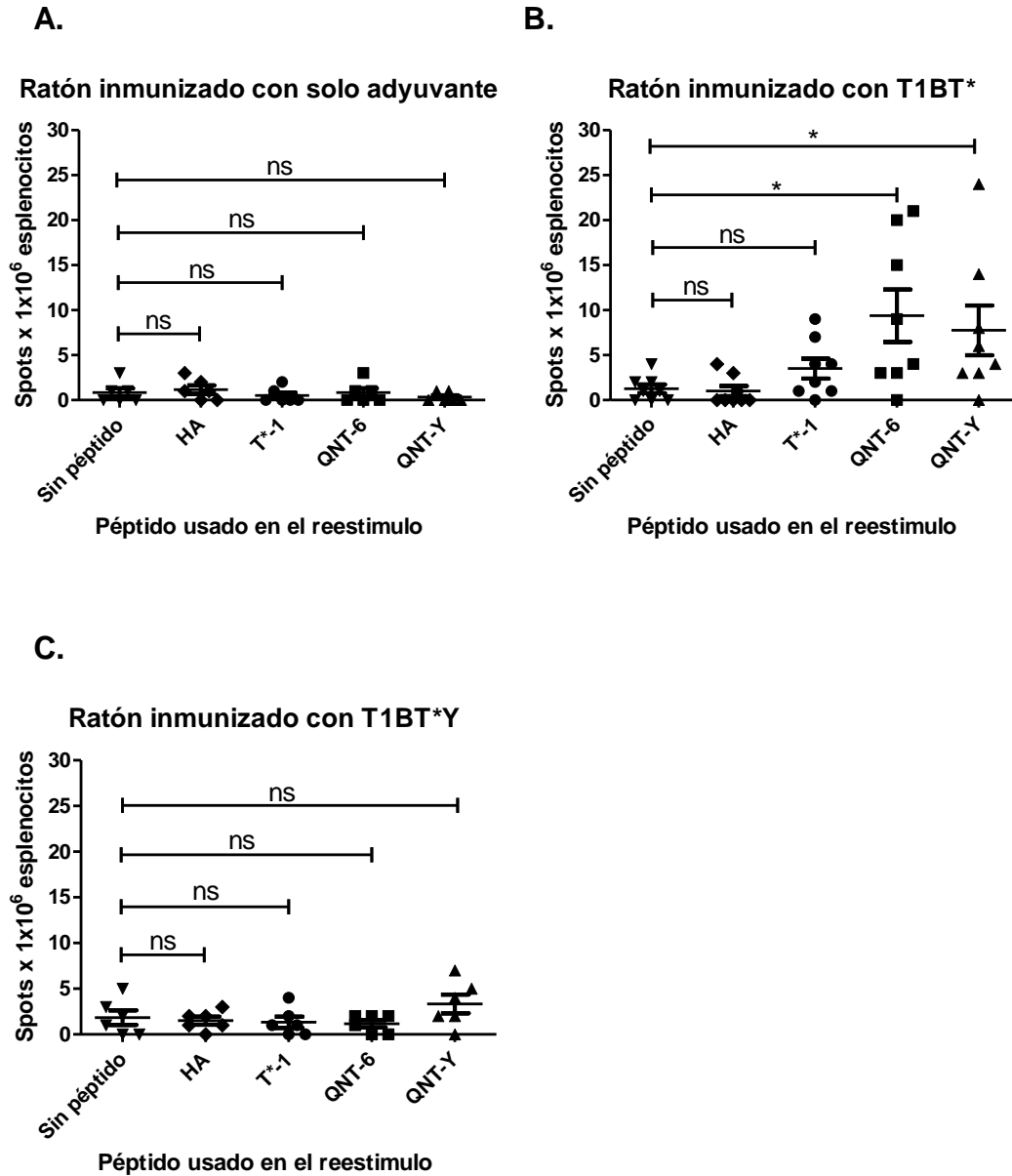


Figura 23. Determinación por ELISPOT del número de células productoras de IFN- γ en los bazo de diferentes ratones inmunizados. **A.** Ratones inmunizados con solo adyuvante sin péptido, **B.** Ratones inmunizados con el péptido T1BT*, **C.** Ratones inmunizados con el péptido T1BT*-Y. Las células de los ratones fueron evaluadas en su capacidad de producir IFN- γ tras la estimulación con T*-1, QNT-6, QNT-Y, HA como péptido no relacionado y sin péptido como control. Los resultados fueron analizados utilizando un método no paramétrico a dos colas, $p < 0,05$, usando el programa GraphPad Prisma 5. ns: diferencia no significativa, *: diferencia significativa, $p < 0,05$.

Como se muestra en la Figura 23, la producción de IFN- γ medida por la generación de spots no fue evidenciada en las células de bazo de los ratones inmunizados con solo adyuvante, lo cual sugiere que las células no reaccionaron con ninguno de los péptidos.

Respecto a células en el bazo de animales del grupo control, los ratones inmunizados con T1BT* mostraron por una parte diferencias significativas en el número de células productoras de IFN- γ tras su re-estimulación con QNT-6 y QNT-Y, lo cual sugiere que durante la inmunización con T* se generaron células específicas contra el péptido QNT-6 que a su vez tienen reactividad cruzada con QNT-Y la epítotope análoga estable de QNT-6. Por su parte, en las células del bazo de los ratones inmunizados con T1BT*-Y, no se encontraron diferencias significativas entre la producción de spots tras la re-estimulación con los diferentes péptidos y re-estimulación con el péptido control.

8 DISCUSIÓN

La activación de las células T es un evento fundamental en el inicio de la respuesta inmune adaptativa frente a agentes infecciosos. Esta respuesta depende del reconocimiento por parte del TCR de la célula T de complejos MHC-péptido presentados en la superficie de las células presentadoras de antígeno. La interacción MHC-péptido-TCR activa una cascada de señalización al interior de la célula T que desencadena la activación de factores de transcripción que ayudan a la activación del linfocito. La presentación de péptidos en moléculas MHC clase II a LT-CD4⁺ se ve afectada por la susceptibilidad a la edición por HLA-DM de complejos MHC clase II-péptido. DM es una molécula presente en el interior de las CPAs que promueve la disociación de péptidos similares a CLIP (péptidos con una alta tasa de disociación) que cataliza el intercambio de péptidos en el bolsillo de unión de péptidos de moléculas MHC clase II. En este trabajo se examinó la capacidad de complejos estables o inestables a la edición por DM de evocar distintos tipos de respuesta en LT-CD4⁺ con el fin de analizar la relación entre estabilidad de complejos MHC-péptido y capacidad del reconocimiento por LT-CD4⁺ de antígenos peptídicos que hacen parte de estos complejos.

T* (₃₂₆EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT₃₄₅) es un péptido de 20 aminoácidos de la proteína de circumsporozoito (CS) de *P. falciparum*, que en distintos estudios clínicos ha demostrado estimular LT-CD4⁺ contra el parásito en individuos HLA-DR1, -DR4, -DR7 y -DR11 (75% de la población) por lo cual es un buen prospecto de candidato a vacuna contra la malaria. T* al poseer 2 epítopes DR4: T*-1 y QNT-6 inestable a DM es un modelo apropiado para estudiar la influencia de la estabilidad a DM de complejos MHC-péptido y capacidad de estos complejos para estimular eficientemente a los LT-CD4⁺ que los reconocen.

Previamente nuestro grupo estableció las características de la unión de la epítope T*-1 a la molécula DR4 y aspectos estructurales de las interacciones del complejo

DR4/T*-1 con el TCR de LT-CD4+ específicos para estos complejos [29]. En el presente trabajo además de establecer aminoácidos dentro de la secuencia de QNT-6 importantes para la unión de este péptido a la molécula DR4, se realizaron una serie de análisis con el fin de comparar la capacidad de este complejo y el de un análogo estable a DM (QNT-Y) para estimular LT-CD4+.

Como se pudo evidenciar mediante el cálculo de IC50, los aminoácidos que contribuyen a la unión de QNT-6 a DR4 son leucina (L335), ácido glutámico (E338), serina (S340) y prolina (P341). Esto sugiere que adicional a la Leucina 335 y la prolina 341 que se unen a los bolsillos P1 y P7 respectivamente como había sido descrito previamente por Vargas y col (*Vargas L. observación no publicada*), el ácido glutámico 338 y la serina 340 son residuos de anclaje de la secuencia QNT-6 a los bolsillos P4 y P6 respectivamente. Estos resultados evidencian un registro de unión P1, P4, P6 y P7 ligeramente distinto al registro de unión P1, P4, P6 y P9 clásicamente reportado para la unión de péptidos a moléculas de clase II [37]. Datos estructurales señalan que el residuo DRβ71 que hace parte del bolsillo P4 en el haplotipo HLA-DRβ1*0401 corresponde a Lisina o Arginina y que debido a su carga positiva cadenas laterales con carga negativa (como la del ácido glutámico 338 en la secuencia QNT-6) encajan bien en este bolsillo [38].

La importancia en la unión de prolina 341 en P7 quizás sea atribuida al hecho de que como ha sido descrito, la prolina desplaza moléculas de agua que generalmente están unidas allí favoreciendo la unión del péptido a la molécula [39]. Además, péptidos que contienen una prolina que encaja en P7 adoptan conformación poliprolina tipo II que ha sido encontrada en varias de las estructuras cristalinas de complejos MHC clase II/péptido resueltas hasta ahora probablemente porque esta ayuda a mantener puentes de hidrógeno claves para la estabilidad de la unión [39]. Finalmente, P9 es punto de anclaje de péptidos solo si en esa posición el péptido posee aminoácidos con cadenas alifáticas largas,

esto explica por qué la sustitución de la serina 343 en QNT-6 por alanina no perturba la unión del péptido a DR4 [39].

Por su parte, el uso de péptidos truncados permitió evidenciar: (i) Que aminoácidos hacia el extremo amino terminal de P1 contribuyen también a la unión de QNT-6 a DR4 y (ii) Que la leucina en la posición 335 es clave para la unión. Estos resultados encuadran bien con lo señalado por otros en el sentido de que P1 y aminoácidos localizados hacia el N-terminal de P1 estabilizan la unión de péptidos a moléculas DR porque generan puentes de hidrogeno que interactúan con el MHC estabilizando el complejo [40-42].

Debido a la importancia que tiene el entendimiento de los parámetros que afectan la activación de las células T, en el presente trabajo se quiso determinar si la mayor estabilidad del péptido QNT-Y (péptido análogo de QNT-6 estable en presencia de DM) a moléculas DR4 se podía traducir en un modelo *in vitro*, en una mayor activación de las células T. Para ello fue necesaria la identificación de individuos que expresasen el haplotipo HLA-DR β 1*04:01 en muestras de diferentes voluntarios. El tamizaje de varios voluntarios evidencio una baja prevalencia del haplotipo HLA-DR β 1*0401 en los individuos concordancia con estudios realizados por Arias-Murillo y colaboradores con el fin de analizar la frecuencia en la población colombiana de los haplotipos HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 [43]. En ese trabajo se encontró que la frecuencia del alelo HLA-DR β 1*04:01 en las muestras analizadas fue de menor al 1%, lo cual concuerda con la baja frecuencia en la población de individuos estudiados por nosotros.

Teniendo en cuenta que la frecuencia del haplotipo HLA-DR β 1*0401 fue baja, previa identificación del voluntario HLA-DR β 1*0401 se realizaron experimentos con células de individuos HLA-DR β 1*0402 y HLA-DR β 1*0407 conducentes a evidenciar la generación *in vitro* de líneas de linfocito T específicos para las

epítopes T*-1; QNT-6 y QNT-Y restringidos por estos haplotipos (resultados no mostrados). Líneas de LT-CD4+ fueron generadas in vitro luego del procesamiento natural por CPAs del péptido T1BT*. La eficiencia con que se producían LT-CD4+ específicos para las epítopes T*-1; QNT-6 y QNT-Y fue cuantificada mediante medición de la proliferación; diferenciación/activación celular y producción de citoquinas. Luego de un estímulo con CPAs pulsadas con T1BT* y la expansión con IL-2 por 10 días las líneas fueron re-estimuladas dos veces con DCs pulsadas con cada péptido. Como fuente de LT-CD4+ para la generación de las líneas se utilizaron (i) PBMCs totales; (ii) LT-CD4+ purificados totales y (iii) PBMCs depletados de LT-CD4+ vírgenes. Se intentaron diferentes fuentes de LT-CD4+ tratando de establecer cuál de ellas permitía evidenciar la mayor activación de LT-CD4+ inducida por los péptidos. Luego del procesamiento de varias muestras concluimos que los resultados obtenidos con los haplotipos DRB1*0402 y DRB1*0407 no eran reproducibles y no arrojaron resultados concluyentes. Los resultados de PROPED que predicen que las secuencias QNT-6 y QNT-Y no tienen capacidad de unión alguna a los alelos DRB1*0402; DRB1*0404 y DRB1*0405 es una probable explicación al porqué los resultados negativos de nuestros ensayos y evidencia una exquisita especificidad del registro de unión del péptido QNT-6 por el haplotipo HLA-DRβ1*0401.

A partir de PBMCs del voluntario HLA-DRβ1*0401 se generó una línea específica para T1BT* seguida de la medición de marcadores de activación; producción de citoquinas y proliferación de LT-CD4+ luego de una doble estimulación con células dendríticas pulsadas con los tres péptidos cortos T*-1, QNT-6 o QNT-Y. Los resultados de estos experimentos mostraron que ni la medición de la expresión de CD27 o CD69 (Figura 9) para evidenciar grado de diferenciación hacia un linaje efector [34] o de activación temprana [35] de las células en cultivo, ni la medición de su proliferación (Figura 10) permitieron evidenciar diferencias significativas en la respuesta de las células al re-estímulo con tres diferentes concentraciones de cada uno de los tres péptidos. Estos resultados nos indicaron que bajo las

condiciones de cultivo de PBMCs totales utilizadas en estos experimentos para generar la línea y para su re-estimulo con péptidos cortos (25 días en cultivo) no era posible evidenciar diferencias en la inmuno-dominancia de los péptidos, sin embargo, en ensayos de estimulación de 9 días de PBMCs con DCs “aceleradas” generadas “*in situ*” (sección 8.11 y resultados de la Figura 12) [36], fue posible evidenciar diferencias en producción de citoquinas de una línea contra T1BT* la cual en respuesta al re-estimulo con T*-1 produjo IL-10 mientras que en respuesta a QNT-Y y QNT-6 produjo una respuesta de tipo TH1 caracterizada por una alta producción de TNF- α (Figura 12).

No obstante estos resultados con PBMCs totales evidenciaron diferencias en la inmunogenicidad de QNT-6 y QNT-Y con respecto a T*-1, ellos no nos permitieron evidenciar diferencias entre QNT-6 y QNT-Y. Lo anterior sumado a que la presencia de linfocitos T vírgenes y de memoria en preparaciones de PBMCs totales plantea interrogantes respecto al origen y especificidad de las respuestas obtenidas (si provienen de células vírgenes o de memoria), se decidió analizar la inmunogenicidad de los péptidos en líneas generadas a partir de LT-CD4+ vírgenes pulsados con T1BT* y T1BT*-Y.

En contraste con los ensayos con PBMCs totales, en los ensayos realizados con linfocitos T CD4 vírgenes se pudo evidenciar que la eficiencia de diferenciación de LT-CD4+ vírgenes a células de memoria y a células efectoras específicas para QNT-6 y QNT-Y fue menor en las líneas generadas con T1BT* y más eficiente con la línea generada con T1BT*-Y. Además, la medición de la expresión de CD27 en las células tetrámero positivas mostro que el péptido QNT-Y es más eficiente que el péptido QNT-6 para inducir células efectoras (evidenciado por la pérdida de la expresión de CD27) (Figura 16). En conjunto, estos resultados favorecen la hipótesis de que el péptido QNT-Y por ser más estable a DM es probablemente más inmunogénico que el péptido QNT-6.

En estos experimentos hechos con células vírgenes la tinción de las células con tetrámero al final demostró que en las dos líneas se obtuvieron células tetrámero positivas tanto para QNT-6 como para QNT-Y lo cual indica dos cosas: (i) que es posible el “*priming in vitro*” de células vírgenes para estos dos péptidos y (ii) que existe reactividad cruzada entre las dos epítopes.

Existe la posibilidad de que la re-estimulación de la línea con péptidos cortos durante los dos o tres re-estímulos *in vitro* pudiese favorecer que los péptidos fuesen cargados sobre la superficie de CPAs y presentados a los linfocitos T en la ausencia de la edición intracelular por DM. Para obviar esta posibilidad se decidió evaluar la generación de linfocitos T específicos para cada epítope a partir de líneas celulares generadas a partir de LT-CD4 vírgenes estimulados por CPA profesionales como las DCs que presentan a estos linfocitos epítopes derivadas del procesamiento intracelular en presencia de DM de los péptidos T1BT* y T1BT*-Y.

Los resultados presentados en las Figuras 17 a 21 y Tablas 8 y 9 muestran que contrario a lo obtenido hasta ahora, estos experimentos demostraron que el péptido QNT-6 presente en T1BT* es mejor inmunógeno que el péptido QNT-Y presente en T1BT*-Y. Esto se soporta en los resultados que mostraron que la línea de T1BT* genera más células de memoria, mayor número de células tetrámero positivas para QNT-6, menor expresión de CD27 y mayor producción de IFN- γ . Adicionalmente se pudo evidenciar que existe reactividad cruzada ya que los linfocitos generados con T1BT*-Y generaron linfocitos específicos para QNT-6 que pudieron ser detectadas mediante el uso de un tetrámero para QNT-6 y viceversa, que linfocitos específicos para QNT-6 generaron linfocitos detectados con tetrámeros para QNT-Y (Tablas 8 y 9 y datos no mostrados).

Estudios han demostrado que la potencia de complejos MHC-péptido *in vitro* no necesariamente se correlacionan con mediciones de inmunogenicidad *in vivo*, por

lo cual en el diseño de candidatos a vacunas es necesario evaluar su eficacia *in vivo*. Teniendo en cuenta que los experimentos *in vitro* evidenciaron distintos resultados en cuanto a la inmunogenicidad de los péptidos QNT-6 Vs. QNT-Y dependiendo del sistema de cultivo utilizado, se decidió utilizar un modelo animal que permitiera el abordaje de la inmunogenicidad de estas epítopes *in vivo*, al igual que la medición de su capacidad para inducir reconocidos indicadores de inmunidad contra la malaria. Para ello se vacunaron ratones transgénicos DR4 con los péptidos T1BT* y T1BT*-Y con el fin de verificar la capacidad de cada antígeno de inducir la producción de anticuerpos contra NANP en los sueros de los ratones (los cuales han demostrado capacidad que proteger contra la malaria en modelos de malaria murina) [22] y adicionalmente ver la capacidad de producción de IFN- γ (una citoquina importante en la inmunidad contra formas hepáticas del parásito) [44], mediante ensayos de ELISPOT utilizando los esplenocitos de las ratones vacunados.

Los resultados de estos experimentos evidenciaron niveles de anticuerpos en los sueros de los ratones vacunados con los péptido T1BT* y T1BT*-Y que fueron similares al comienzo de las inmunizaciones (20 días después de la primera dosis). Sin embargo, con el transcurso del tiempo y con el curso de las inmunizaciones los animales inmunizados con el péptido QNT-Y evidenciaron títulos de anticuerpos contra la secuencia NANP más bajos que los animales vacunados con el péptido QNT-6. La marcada diferencia del título de anticuerpos anti-NANP favorecida por el uso de T1BT* respecto de T1BT*-Y sugiere que la epítope T*-1 (un péptido común en los dos antígenos) no juega ningún papel en la respuesta de anticuerpos. Adicionalmente la diferencia en el título de anticuerpos entre los ratones vacunados sugiere que el péptido QNT-6 podría tener una mayor capacidad para activar linfocitos T foliculares los cuales son linfocitos especializados en proveer ayuda en el centro germinal durante la respuesta de anticuerpos de las células B la cual es antígeno T dependiente [45]. Entre los mecanismos de acción de las células T foliculares se encuentran varias moléculas

tales como: CXCR5, ICOS y CD40L. CXCR5 es un factor que determina la migración de las células T a los folículos para su encuentro con las células B. Por otra parte las células T estimuladas a través del TCR y ICOS proliferan y producen IL-10, un potente factor de crecimiento y diferenciación de las células B y finalmente el CD40L se une al CD40 presente en la superficie de las células B e induce su proliferación, cambio de clase y diferenciación, contribuyendo así todos estos factores a la generación de anticuerpos [45]. Estudios en ratones inmunizados con las versiones de T1BT* vs T1BT*-Y en los que se evalúe en centros germinales la presencia de LT-CD4+ específicos para el péptido QNT-6 (células tetrámero positivas) que expresen de manera preferencial los marcadores anotados podrían ser evidencia a favor de porque esta epítotope tiene un mejor desempeño como epítotope “helper” que la epítotope QNT-Y.

La poca inmunogenicidad de T*-1 también fue evidente en la medición de células productoras de IFN- γ , ya que tras la estimulación *in vitro* con T*-1 de esplenocitos de ratones vacunados con T1BT* o T1BT*-Y no se evidenciaron células productoras de IFN- γ (Figura 23). La falta de inmunogenicidad de T*-1 un péptido más estable a DM que QNT-6 no puede ser explicada por nuestros resultados y es algo que merece ser estudiado.

En este caso, contrario a lo que se esperaba, el péptido QNT-Y que genera un complejo más estable a DM que el péptido QNT-6, resulto ser menos inmunogénico. Una posible explicación de la menor inmunogenicidad *in vivo* del péptido T1BT*-Y que contiene QNT-Y ha sido sugerido por Corse y colaboradores, quienes refieren que el TCR puede detectar diferencias en la fuerza de interacción del complejo MHC-péptido debido a cambios de aminoácidos en la secuencias de los péptidos afines y transmitir eventos corriente abajo del receptor de la célula T que redundan en cambios importantes en el tipo de respuesta de las células T.

En el mismo sentido, reportes en cuanto a diferencias cuantitativas y cualitativas en la fuerza de interacción del TCR-pMHC que influyen el reconocimiento del TCR han sido publicados [46]. Otra posible explicación para una mayor inmunogenicidad y mejor desempeño como epítipo helper del péptido QNT-6 menos estable, es que la estimulación del TCR por este complejo satisface el requerimiento de múltiples encuentros complejo MHC-péptido-TCR propuesto por Valitutti y col. [47]. Debido a la menor estabilidad de QNT-6 con DR4 respecto a QNT-Y, el complejo DR4/QNT-6 estarían favoreciendo el umbral de estimulación necesario para la fase de activación inicial [46].

Reportes acerca de que una vida media TCR-pMHC prolongada puede inducir señales inhibitorias en la vía de señalización de los linfocitos [48], o aquellos que señalan que la fuerte estimulación del TCR por un complejo MHC-péptido de alta afinidad puede guiar a la expansión de células T anérgicas [49] podrían explicar la menor inmunogenicidad del péptido QNT-Y.

Estudios realizados con células T CD4⁺ sugieren que la persistencia del antígeno más allá de la fase de activación puede interferir con la diferenciación de las células T de memoria central a efectora y causar que estas células se tornen efectoras terminales o en células exhaustas por sobre-estimulación [50]. La diferenciación de LT-CD4⁺ de memoria central a efectora (Figura 19) fue más marcada en la línea estimulada con QNT-Y (5.11 TCM Vs. 1.20 TEM) comparado con la línea estimulada con QNT-6 (17.57 Vs 2.12). Es posible que esta diferencia en la diferenciación de TCM a TEM entre estos antígenos explique en parte la menor inmunogenicidad de QNT-Y, debido a que este péptido genera células terminalmente diferenciadas con menor vida media mientras que QNT-6 favorece células de memoria central de vida media más larga.

La baja producción de anticuerpos contra NANP, al igual que la baja producción de IFN- γ encontrada en los ratones inmunizados con T1BT*-Y, podría deberse a la

falta de células T de respuesta a complejos de alta afinidad por el complejo péptido-MHC, debido a la eliminación de células T que tienen receptores de alta afinidad por apoptosis durante la selección del repertorio en el timo o por mecanismos de tolerancia en la periferia lo cual es un conocido mecanismo de prevención de respuestas inmunes patogénicas [46].

En el ensayo *in vivo* se detectó una mayor cantidad de anticuerpos tras las diferentes inmunizaciones en los ratones vacunados con T1BT* que contiene la epítotope QNT-6, lo cual podría explicarse por evidencias generadas *in vitro* que señalan que complejos MHC-péptido con rápida disociación inducen la producción de IL-4, sugiriendo que una señalización más débil del TCR favorece la diferenciación hacia TH2 como ha sido sugerido por otros autores [51].

Varios autores han reportado que contrario al concepto que se tenía de que una respuesta más potente de las células T resultaba de una interacción TCR-pMHC de larga vida durante el reconocimiento de las células T, existen evidencias de una óptima respuesta de células T *in vivo* generada por interacciones de un nivel de afinidad intermedio [46, 48, 49, 52, 53]. Mediante estudios realizados utilizando linfocitos T CD8+ con el fin de evaluar la respuesta diferencial de las células T inducida por células tumorales expresando ligandos pMHC que se unen al TCR con diferentes vidas medias, se pudo encontrar que la expresión del marcador de activación de superficie CD69 y la producción de IL-2 tenían su máximo cuando la interacción TCR/pMHC era de una vida media intermedia [48]. De igual manera se ha encontrado que la vacunación con péptidos de muy baja afinidad o muy alta afinidad no protegen contra la formación de tumor en ratones [49].

A su vez la baja producción de anticuerpos e IFN- γ en los ratones inmunizados con T1BT*-Y conteniendo la epítotope QNT-Y, podría sustentarse en resultados obtenidos por McMahan y colaboradores que apuntan a que existe un límite máximo de la potencia de los ligandos del TCR *in vivo*, que podría servir como

protección contra efectos inflamatorios nocivos durante respuestas a estimulación fuerte del TCR [49]. Estos hallazgos también pueden ser soportados por los experimentos realizados por Corse y colaboradores en los cuales utilizando diferentes péptidos alterados que se unen con diferentes afinidades al TCR, demostraron que péptidos con una vida media muy larga pueden generar células T con una función efectora disminuida determinada por la producción de IFN- γ e IL-2 al igual que muestran una proliferación disminuida [52]. Investigaciones sugieren que la atenuación de las respuestas in vivo de células T a pMHC de alta avidéz pueden funcionar para prevenir el detrimento de los efectos inflamatorios que podrían ocurrir en respuesta a el reconocimiento de gran avidéz del TCR de cualquiera de los péptidos propios o extraños [52].

Teniendo en cuenta que no se pudieron establecer las razones de fondo que hacen que el péptido QNT-Y más estable no sea mejor inmunógeno, planteamos varias posibilidades que podrían ser evaluadas en futuros trabajos: determinar los niveles de flujo de calcio en líneas generadas con T1BT* y T1BT*-Y estimuladas con los diferentes péptidos, determinar la internalización del TCR como una medida de la activación de la célula T, determinación de diferentes moléculas intermediarias en la cascada de activación de las células T tales como ZAP70, Ick, c-jun, pAkt y pStat3. Ver si hay diferencias en la translocación al núcleo de NFkB, NFAT y AP1 [48]. Determinar si existe una mayor presencia de células T reguladoras CD4+CD25+ Foxp3+ en los cultivos realizados con el antígeno de alta afinidad. Esta posibilidad es sugerida por ensayos realizados por Gottschalk y colaboradores en los que se comparaban in vivo complejos MHC-péptido de diferentes afinidades y encontraron que únicamente las interacciones TCR-pMHC de alta afinidad facilitaron la inducción de células T Foxp3+ [54].

Se podría evaluar si las células estimuladas con los péptidos de alta afinidad están exhaustas por medio del incremento en la expresión de PD-1 la cual se ha encontrado que regula negativamente la señalización del TCR, adicionalmente se

debe evaluar si hay un incremento en la apoptosis de células efectoras. Otra posibilidad podría ser que se haya aumentado la expresión de CTLA4 el cual es un regulador negativo de la activación de las células T y que ha sido sugerido para restringir preferencialmente la respuesta de las células T a fuertes señales del TCR [55].

Teniendo en cuenta todas estas observaciones y relacionándolas con los resultados obtenidos en nuestro estudio tanto en los experimentos in vitro como el título de anticuerpos y la determinación de IFN- γ por ELISPOT en los ratones transgénicos in vivo, sugieren que el cambio de la leucina en la posición 335 por tirosina, generó un péptido QNT-Y que tiene una alta estabilidad que probablemente generó interacciones de alta afinidad TCR-pMHC, lo cual probablemente hace que se supere el nivel intermedio de afinidad que parece ser el óptimo para la estimulación de los linfocitos T específicos.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A., L.A., Pillai S. , *Inmunología Celular y Molecular*. 2008, Elsevier. p. 113-135.
2. Stern, L.J., I. Potolicchio, and L. Santambrogio, *MHC class II compartment subtypes: structure and function*. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(1): p. 64-9.
3. Stumptner, P. and P. Benaroch, *Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region*. *EMBO J*, 1997. **16**(19): p. 5807-18.
4. Pashine, A., et al., *Interaction of HLA-DR with an acidic face of HLA-DM disrupts sequence-dependent interactions with peptides*. *Immunity*, 2003. **19**(2): p. 183-92.
5. Doebele, R.C., et al., *Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules*. *Immunity*, 2000. **13**(4): p. 517-27.
6. McFarland, B.J. and C. Beeson, *Binding interactions between peptides and proteins of the class II major histocompatibility complex*. *Med Res Rev*, 2002. **22**(2): p. 168-203.
7. Stern, L.J., et al., *Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide*. *Nature*, 1994. **368**(6468): p. 215-21.
8. Stratikos, E., D.C. Wiley, and L.J. Stern, *Enhanced catalytic action of HLA-DM on the exchange of peptides lacking backbone hydrogen bonds between their N-terminal region and the MHC class II alpha-chain*. *J Immunol*, 2004. **172**(2): p. 1109-17.
9. Kasson, P.M., et al., *Kinetics of peptide binding to the class II MHC protein I-Ek*. *Biochemistry*, 2000. **39**(5): p. 1048-58.
10. Rabinowitz, J.D., et al., *Formation of a highly peptide-receptive state of class II MHC*. *Immunity*, 1998. **9**(5): p. 699-709.
11. Lazarski, C.A., et al., *The kinetic stability of MHC class II:peptide complexes is a key parameter that dictates immunodominance*. *Immunity*, 2005. **23**(1): p. 29-40.
12. Liwski, R.S., et al., *Prolonged costimulation is required for naive T cell activation*. *Immunol Lett*, 2006. **106**(2): p. 135-43.
13. Sant, A.J., et al., *The relationship between immunodominance, DM editing, and the kinetic stability of MHC class II:peptide complexes*. *Immunol Rev*, 2005. **207**: p. 261-78.
14. Vargas, L.E., et al., *MHC allele-specific binding of a malaria peptide makes it become promiscuous on fitting a glycine residue into pocket 6*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **307**(1): p. 148-56.
15. Bhasin, M. and G.P. Raghava, *SVM based method for predicting HLA-DRB1*0401 binding peptides in an antigen sequence*. *Bioinformatics*, 2004. **20**(3): p. 421-3.

16. Sercarz, E.E., et al., *Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants*. *Annu Rev Immunol*, 1993. **11**: p. 729-66.
17. Lazarski, C.A., F.A. Chaves, and A.J. Sant, *The impact of DM on MHC class II-restricted antigen presentation can be altered by manipulation of MHC-peptide kinetic stability*. *J Exp Med*, 2006. **203**(5): p. 1319-28.
18. Nussenzweig, V. and R.S. Nussenzweig, *Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine*. *Adv Immunol*, 1989. **45**: p. 283-334.
19. Herrington, D.A., et al., *A model for Plasmodium falciparum sporozoite challenge and very early therapy of parasitaemia for efficacy studies of sporozoite vaccines*. *Trop Geogr Med*, 1988. **40**(2): p. 124-7.
20. Moreno, A., et al., *Cytotoxic CD4+ T cells from a sporozoite-immunized volunteer recognize the Plasmodium falciparum CS protein*. *Int Immunol*, 1991. **3**(10): p. 997-1003.
21. Tam, J.P., *Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(15): p. 5409-13.
22. Wang, R., et al., *Induction of protective polyclonal antibodies by immunization with Plasmodium yoelii circumsporozoite protein multiple antigen peptide vaccine*. *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1637.
23. Nardin, E.H., et al., *Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes*. *J Infect Dis*, 2000. **182**(5): p. 1486-96.
24. Nardin, E.H., et al., *Conserved repetitive epitope recognized by CD4+ clones from a malaria-immunized volunteer*. *Science*, 1989. **246**(4937): p. 1603-6.
25. Calvo-Calle, J.M., et al., *Binding of malaria T cell epitopes to DR and DQ molecules in vitro correlates with immunogenicity in vivo: identification of a universal T cell epitope in the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein*. *J Immunol*, 1997. **159**(3): p. 1362-73.
26. Nardin, E.H., et al., *A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing Plasmodium falciparum B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types*. *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 481-9.
27. Good, M.F., et al., *Human T-cell recognition of the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum: immunodominant T-cell domains map to the polymorphic regions of the molecule*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(4): p. 1199-203.
28. Bojang, K.A., et al., *Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against Plasmodium falciparum infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial*. *Lancet*, 2001. **358**(9297): p. 1927-34.
29. Parra-Lopez, C., et al., *Major histocompatibility complex and T cell interactions of a universal T cell epitope from Plasmodium falciparum circumsporozoite protein*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(21): p. 14907-17.

30. Calvo-Calle, J.M., G.A. Oliveira, and E.H. Nardin, *Human CD4+ T cells induced by synthetic peptide malaria vaccine are comparable to cells elicited by attenuated Plasmodium falciparum sporozoites*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7575-85.
31. Houghten, R.A., *General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(15): p. 5131-5.
32. Delgado, G., et al., *Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during Leishmania (Viannia) panamensis infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs)*. Parasite Immunol, 2003. **25**(4): p. 199-209.
33. Dauer, M., et al., *Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4069-76.
34. Fritsch, R.D., et al., *Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6489-97.
35. Testi, R., J.H. Phillips, and L.L. Lanier, *T cell activation via Leu-23 (CD69)*. J Immunol, 1989. **143**(4): p. 1123-8.
36. Martinuzzi, E., et al., *acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2128-37.
37. Fremont, D.H., et al., *Crystal structure of I-Ak in complex with a dominant epitope of lysozyme*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 305-17.
38. Dessen, A., et al., *X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II*. Immunity, 1997. **7**(4): p. 473-81.
39. Zavala-Ruiz, Z., et al., *Exploration of the P6/P7 region of the peptide-binding site of the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DR1*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44904-12.
40. Anders, A.K., et al., *HLA-DM captures partially empty HLA-DR molecules for catalyzed removal of peptide*. Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 54-61.
41. Cardenas, C., et al., *A comparative study of MHC Class-II HLA-DRbeta1*0401-Col II and HLA-DRbeta1*0101-HA complexes: a theoretical point of view*. J Struct Biol, 2005. **149**(1): p. 38-52.
42. McFarland, B.J., et al., *Ovalbumin(323-339) peptide binds to the major histocompatibility complex class II I-A(d) protein using two functionally distinct registers*. Biochemistry, 1999. **38**(50): p. 16663-70.
43. Arias-Murillo, e.a., *Analysis of HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 allelic, genotypic, and haplotypic frequencies in colombian population*. Colombia Médica, 2010. **Vol. 41**(Nº 4): p. 336-43.
44. Ferreira, A., et al., *Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon*. Science, 1986. **232**(4752): p. 881-4.
45. Vinuesa, C.G., et al., *Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(11): p. 853-65.

46. Corse, E., R.A. Gottschalk, and J.P. Allison, *Strength of TCR-peptide/MHC interactions and in vivo T cell responses*. J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5039-45.
47. Valitutti, S., et al., *Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 148-51.
48. Riquelme, E., et al., *The duration of TCR/pMHC interactions regulates CTL effector function and tumor-killing capacity*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2259-69.
49. McMahan, R.H., et al., *Relating TCR-peptide-MHC affinity to immunogenicity for the design of tumor vaccines*. J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2543-51.
50. Han, S., et al., *Role of antigen persistence and dose for CD4+ T-cell exhaustion and recovery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(47): p. 20453-8.
51. Tao, X., et al., *Induction of IL-4-producing CD4+ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4237-44.
52. Corse, E., et al., *Attenuated T cell responses to a high-potency ligand in vivo*. PLoS Biol, 2010. **8**(9).
53. Carreno, L.J., et al., *T-cell antagonism by short half-life pMHC ligands can be mediated by an efficient trapping of T-cell polarization toward the APC*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 210-5.
54. Gottschalk, R.A., E. Corse, and J.P. Allison, *TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo*. J Exp Med, 2010. **207**(8): p. 1701-11.
55. Egen, J.G., M.S. Kuhns, and J.P. Allison, *CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 611-8.

10 ANEXOS

10.1 Síntesis de péptidos

Los péptidos fueron sintetizados por la compañía Twentyfirst Century Biochemicals, Inc (Marlboro, MA, USA), y su identificación fue realizada por análisis de masas correspondiendo este valor a los respectivos pesos moleculares de cada péptido.

#	Péptido	Secuencia	Peso Molecular Dalton
1	QN	Ac-QNSLSTEWSPCSVT-amide	1579.67
2	QN-Q332	Ac-ANSLSTEWSPCSVT-amide	1522.62
3	QN-N333	Ac-QASLSTEWSPCSVT-amide	1536.64
4	QN-S334	Ac-QNALSTEWSPCSVT-amide	1563.67
5	QN-L335	Ac-QNSASTEWSPCSVT-amide	1537.59
6	QN-S336	Ac-QNSLATEWSPCSVT-amide	1563.67
7	QN-T337	Ac-QNSLSAEWSPCSVT-amide	1549.64
8	QN-E338	Ac-QNSLSTAWSPCSVT-amide	1521.63
9	QN-W339	Ac-QNSLSTEASPCSVT-amide	1464.54
10	QN-S340	Ac-QNSLSTEWAPCSVT-amide	1563.67
11	QN-P341	Ac-QNSLSTEWSPCSVT-amide	1553.63
12	QN-C342	Ac-QNSLSTEWSPASVT-amide	1547.60
13	QN-S343	Ac-QNSLSTEWSPCAVT-amide	1563.67
14	QN-V344	Ac-QNSLSTEWSPCSAT-amide	1551.61
15	QN-T345	Ac-QNSLSTEWSPCSVA-amide	1549.64
16	QN-334-345	Ac-SLSTEWSPCSVT-amide	1337.44
17	QN-332-343	Ac-QNSLSTEWSPCS-amide	1379.43
18	QN-335-343	Ac-LSTEWSPCS-amida	1050.12
19	QN-336-343	Ac-STEWSPCS-amida	936.97
20	QNT-6	QNSLSTEWSPCSVT-OH	1538.61
21	QNT-Y	QNSYSTEWSPCSVT-OH	1588.63
22	T*-1	YLNKIQNSLSTE-OH	1409.52
23	T1BT*	DPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANPE YLNKIQNSLSTEWSPCSVT	5132.36
24	T1BT*-Y	DPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANPE YLNKIQNSYSTEWSPCSVT	5182.37

10.2 Preparación de reactivos ensayos de unión

10.2.1 Buffer de unión pH 5,5 5X

Componente	Cantidad
Citrato de Sodio	100mM
Cloruro de sodio	50 mM
Octil glucósido	0,1 %
EDTA	5 mM
DTT	1 mM

10.2.2 Diluciones utilizadas para la evaluación de la competición de los diferentes análogos de QNT-6 y péptidos truncados

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	QN	Q332	N333	S334	L335	S336	T337	E338	W339	S340	HA
A	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	20000
B	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	4000
C	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	800
D	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	160
E	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	32
F	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	6,4
G	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	1,28
H	Complejo DR4 con Bio HA sin péptido competidor										

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	P341	C342	S343	V344	T345	334-345	332-343	335-343	336-343	HA	DR4 uM
A	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000	20000	0,05
B	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	4000	0,05
C	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	800	0,05
D	800	800	800	800	800	800	800	800	800	160	0,05
E	160	160	160	160	160	160	160	160	160	32	0,05
F	32	32	32	32	32	32	32	32	32	6,4	0,05
G	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	1,28	0,05
H	Complejo DR4 con Bio HA sin péptido competidor										

Importancia de la estabilidad cinética de complejos HLA clase II/péptido formados en presencia de HLA-DM en la inmunodominancia de un epítipo universal candidata a vacuna contra la malaria.

10.2.3 Solución de revelado KPL

La solución de revelado fue preparada según las instrucciones del fabricante KPL Catalogo: 50-80-00, en breve. Mezclar 1 mL de buffer de dietanolamina 5X con 4 mL de agua grado reactivo y adicionar 1 tableta de p-nitrofenilfosfato, agitar hasta disolver la tableta. La solución de revelado debe ser preparada justo antes de su adición.

10.3 Aislamiento de DNA a partir de sangre periférica

El DNA a partir de muestras de sangre de los diferentes voluntarios fue aislado utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega obteniéndose en todos los casos una concentración mayor a 50 ng/ μ L y una relación 260/280 mayor a 1,8 indicando una baja contaminación del DNA con proteínas.

#	Voluntario	Concentración DNA	Unidades	A260	A280	260/280
1	V1	98,3	ng/ μ l	2,315	1,218	1,9
2	V2	114,5	ng/ μ l	2,453	1,284	1,91
3	V3	123,8	ng/ μ l	2,752	1,448	1,9
4	V4	75,9	ng/ μ l	2,964	1,568	1,89
5	V5	114,6	ng/ μ l	2,291	1,197	1,91
6	V6	113,7	ng/ μ l	2,274	1,196	1,9
7	V7	158,7	ng/ μ l	3,175	1,647	1,93
8	V8	127,9	ng/ μ l	2,559	1,337	1,91
9	V9	162,8	ng/ μ l	3,256	1,708	1,91
10	V10	99,4	ng/ μ l	1,988	1,039	1,91
11	V11	119	ng/ μ l	2,379	1,234	1,93
12	V12	121,2	ng/ μ l	2,423	1,284	1,89
13	V13	147,7	ng/ μ l	2,954	1,551	1,9
14	V14	141,5	ng/ μ l	2,83	1,496	1,89
15	V15	100,7	ng/ μ l	2,015	1,058	1,9

16	V16	223,8	ng/ μ l	4,475	2,374	1,89
17	V17	97,9	ng/ μ l	1,957	1,019	1,92
18	V18	114,3	ng/ μ l	2,286	1,215	1,88
19	V19	66,8	ng/ μ l	1,335	0,686	1,95
20	V20	104,5	ng/ μ l	2,09	1,108	1,89
21	V21	150,1	ng/ μ l	3,001	1,562	1,92
22	V22	172,7	ng/ μ l	3,454	1,807	1,91
23	V23	158,2	ng/ μ l	3,165	1,662	1,9
24	V24	157,3	ng/ μ l	3,147	1,637	1,92
25	V25	103,9	ng/ μ l	2,079	1,076	1,93
26	V26	121,6	ng/ μ l	2,432	1,276	1,91
27	V27	69,8	ng/ μ l	1,396	0,717	1,95

10.4 Plantilla para el análisis de los amplificadores en la tipificación de baja resolución

Biotest DRB SSP Kit Auswerteschema/Worksheet

REF	826215
LOT	5729151
	2009-04-30
	18774201

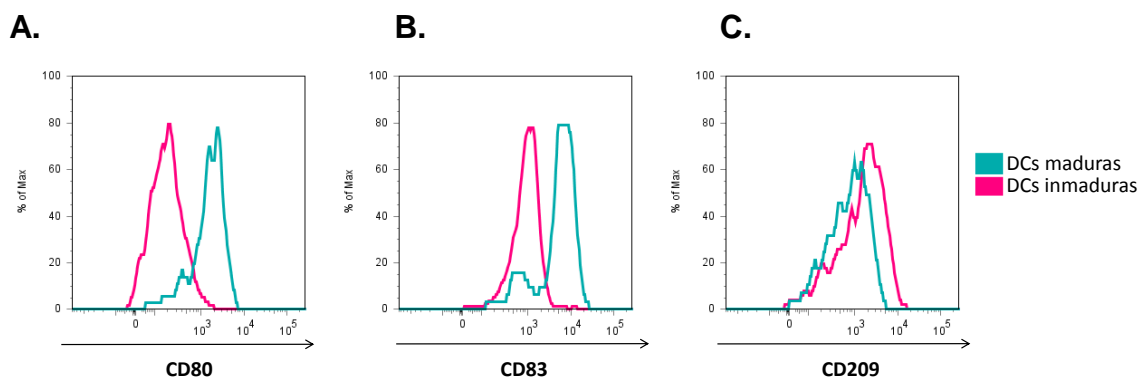
Name/ Name				geburtsdatum/ Date of birth	
DNA-Nr./ DNA No.	Herkunft/ Origin			Diagnose/ Diagnosis	
Tag-Pol. Lot No.	Datum/ Date			Untersucher/ Signature	
Ergebnis/ Result	DRB1*	DRB3* <input type="checkbox"/>	DRB4* <input type="checkbox"/>	DRB5* <input type="checkbox"/>	Bemerkungen/ Comments

	3/1H 1070bp	2/1G 200bp	3/1P 200bp	4/1E 200,210bp	5/1D 200bp	6/1C 220bp	7/1B 240bp	8/1A 200bp
negative Kontrolle/ negative control	DR1 DRB1*0101/02 (DR1)	DR103 DRB1*0103 (DR103)	DR15 DRB1*1501-03 (DR15)	DR16 DRB1*1601/02 (DR16)	DR17 DRB1*0301 (DR17) DRB1*0302 (DR18)	DR18+ DRB1*0302 (DR18) DRB1*1402/06 (DR14) DRB1*1403 (DR1403)	DR4 DRB1*0401-11 (DR4)	
DR7 DRB1*0701 (DR7)	DR8 DRB1*0801-04/06/ 08/11 (DR8)	DR9 DRB1*0901 (DR9)	DR10 DRB1*1001 (DR10)	DR11 DRB1*1101-04/06/ 11 (DR11)	DR12 DRB1*1201/02 (DR12)	DR13.1 DRB1*1302 (DR11) DRB1*1301-04/06/ 08/10/12 (DR13)	DR13.3 DRB1*0601/02/04/ 06/11 (DR8) DRB1*1101-04/06/ 11 (DR11) DRB1*1202 (DR12) DRB1*1301/02/04/ 05/08 (DR13)	DR12A 200,210bp
DR13.4 DRB1*0301/02 (DR17/18) DRB1*1301-06/08/ 10/12 (DR13) DRB1*140203/05/ 06 (DR14/1403)	DR14.1 DRB1*1401/04/05/ 07 (DR14/1404)	DR14.2 DRB1*1310 (DR13) DRB1*1402/06 (DR14)	DR14.3 DRB1*1403 (DR1403)	DR14.4 DRB1*1401/07 (DR14)	DR52 DRB3*0101/02 DRB3*0201-03 DRB3*0301 (DR52)	DR53 DRB4*0101/03 (DR53)	DR51 DRB5*0101/02/06N DRB5*0202 (DR51)	DR13A 200bp

Importancia de la estabilidad cinética de complejos HLA clase II/péptido formados en presencia de HLA-DM en la inmunodominancia de un epítoto universal candidata a vacuna contra la malaria.

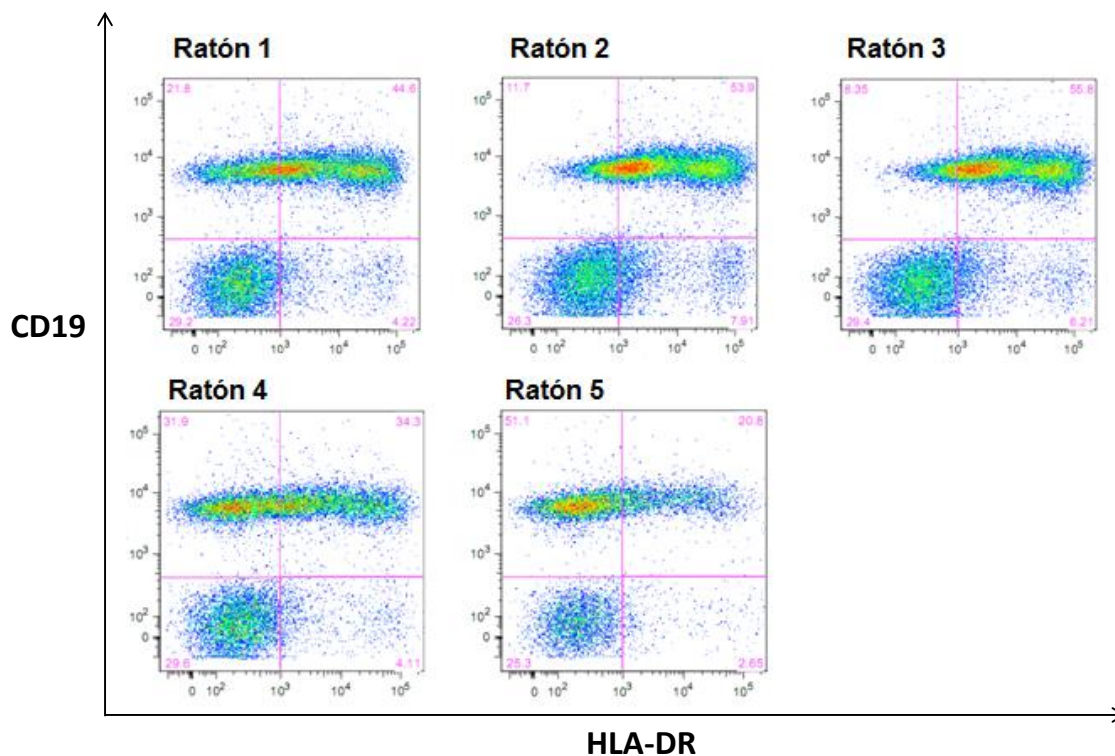
10.6 Determinación de la calidad de las células dendríticas utilizadas en la estimulación.

La calidad de las células dendríticas fue determinada mediante la tinción con anticuerpos anti-CD80, anti-CD83 y anti-CD209.



10.7 Determinación de la expresión de moléculas de clase II en ratones transgénicos DR4.

La expresión de moléculas de clase II en las células de bazo de ratones transgénicos DR4, fue determinada mediante citometría de flujo utilizando como marcadores anti-DR humano FITC y anti-CD19 APC.



10.8 Distribución de las diluciones de suero en el plato de 96 pozos para la determinación del título de anticuerpos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/640											
B	1/1280											
C	1/2560											
D	1/5120											
E	1/10240											
F	1/20480											
G	0											
H	2A10											

■ Pozos cubiertos con (NANP)₆ 1 µg/mL

■ Pozos cubiertos con BSA 2,5 % como control negativo

2A10 es un anticuerpo que reconoce NANP y fue usado como control positivo.

10.9 Distribución de las células de los ratones transgénicos en los platos de ELISPOT para la re-estimulación

Los platos se distribuyeron como sigue:

Ratones inmunizados con solo adyuvante: R1, R3 and R4.

Ratones inmunizados con T1BT*: R5, R6, R7 y R8.

Ratones inmunizados con T1BT*-Y: R10, R11 y R12.

Plato 1

	R1		R3		R4		R5		R6		R7	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
QNT-6												
QNT-Y												
T*-1												
Sin péptido												
Péptido no relacionado (HA)												

Plato 2

	R8		R10		R11		R12					
	1	2	3	4	5	6	7	8				
QNT-6												
QNT-Y												
T*-1												
Sin péptido												
Péptido no relacionado (HA)												

10.9.1 Preparación sustrato AEC para ELISPOT

Sustrato: AEC (3-amino-9-ethyl carbazole) (Sigma, Cat. No. A-5754)

Solución stock AEC: disolver 100 mg de AEC en 10 ml de N,N-Dimetil formamida (DMF).

Adicionar 333 μ L of solución stock AEC a 10 mL de solución de acetato 0,1 M pH 5. Filtrar usando un filtro de 0,45 μ m. Justo antes de usar, adicionar 5 μ L de H₂O₂ al 30%. Mezclar y usar inmediatamente.

Solución de acetato 0,1 M pH 5: mezclar 148 mL de ácido acético 0.2 M (11.55 mL de ácido acético glacial por 1 L de dH₂O) con 352 mL de acetato de sodio 0,2 M (27,2 g de acetato de sodio para 1 L de dH₂O). Adicionar dH₂O en cantidad suficiente para completar 1 L y ajustar el pH a 5.0.