

**Universidad de Buenos Aires**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**RESPUESTA INMUNE TEMPRANA CONTRA EL VIRUS DE LA**  
**FIEBRE AFTOSA**

Trabajo de Tesis presentado para optar al grado de Doctor de la Universidad  
de Buenos Aires

Autor: Vet. Matías Ostrowski

Directores:

Dr. Osvaldo J. López

Dr. Ernesto Massouh

Instituto de Virología, CICVyA, INTA. Castelar

2006

*A mis padres,*

*por todo su cariño y por haberme dado la posibilidad de crecer en un ambiente de total libertad*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Osvaldo López, por su capacidad de contagiarme el enorme entusiasmo con el que siempre encaró los distintos proyectos en los que hemos trabajado, hecho que me estimuló muchísimo para poder llevarlos a cabo. También, por haberme dado la posibilidad de ingresar a trabajar en su laboratorio cuando yo aún era estudiante, lo que me permitió descubrir que la ciencia era una actividad que me apasionaba. Además, quisiera agradecerle tantas interesantes conversaciones sobre los más diversos temas, así como el haberme dado la posibilidad de viajar a trabajar varias veces a EEUU, entre muchas otras cosas

A Ernesto Massouh, por toda su colaboración y consejos.

A Mónica Vermeulen, por estar siempre dispuesta a colaborar en todo. Desde enseñarme a producir células dendríticas hasta ayudarme a corregir la tesis, pasando por la discusión de resultados entre otras cosas. Su ayuda fue absolutamente imprescindible para poder realizar esta tesis.

A Patricia Zamorano, por haberme dado un lugar en su laboratorio y por haberme apoyado moral y materialmente para que pudiera hacer casi todos los experimentos que se me ocurrieran.

A Ana Sadir, por haberme permitido ingresar a trabajar en el INTA, aún en un momento en que la situación de la institución era sumamente adversa.

A Fernando Fernández y a Andrés Wigdorowitz, por el apoyo que me dieron desde la dirección y coordinación del Instituto de Virología para poder avanzar en mi trabajo de tesis.

A Jorge Geffner, por su colaboración en la discusión de mis resultados y en la escritura de los trabajos. Su punto de vista crítico me ha llevado muchas veces a pensar en cuestiones sobre las que solo no hubiera reparado.

A Osvaldo Zabal, por haberme dado un lugar en la sección de cultivos celulares, y por haberme ayudado con los cultivos de las células.

A Adriana Gruppi, por la muy interesante discusión de los resultados del segundo artículo que publicaremos con datos de esta tesis.

A mis amigos y compañeros del laboratorio. Son muchos, pero sobre todo quisiera agradecerles a Valeria Q, Valeria O, Cecilia, Paula, Ana Laura, Fiorella, Fátima, Verónica, Andrea, María de los Ángeles, Agustín, Carlos, Sebastián P, Ignacio, Sebastián D, Diego y Darío. Fue un placer trabajar en un ambiente tan amigable y divertido. Entre las mejores cosas que me llevo de estos años de tesis doctoral, sin duda están muchos momentos que pasamos juntos.

A Agustín Ostachuk, además de su amistad, por todas las discusiones que tuvimos sobre inmunología; específicamente, su lectura crítica de los resultados del primer trabajo que publicamos.

A Sebastián Pappalardo, también además de su amistad, por discutirme y ayudarme a corregir la introducción de la tesis.

A Agustín, mi hermano, por la minuciosa corrección final de la tesis.

A mi amigo Gastón con quien, con una perspectiva para nada relacionada con la inmunología, tantas veces hemos hablado de esta tesis.

A mis amigos Martín y Andrés por todos los buenos momentos que hace años venimos pasando juntos y por las cirugías de los ratones.

A Oscar Taboga, por estar siempre dispuesto a ayudarme en lo que precisara.

A Marcelo Rivarola, por haberme llevado y traído tantas veces a tantos lugares.

Al Dr. Maradei y el personal que trabaja en el laboratorio de bioseguridad de SENASA por haberme permitido ingresar en su laboratorio a hacer los experimentos con el virus infeccioso.

A los becarios que participaron en los reclamos de aumento de estipendio y mejora de las condiciones laborales. Pasando por los que comenzamos a ir a CONICET en 2002 hasta la amplia constitución de los JCP.

Finalmente, quisiera expresar mi reconocimiento a la Universidad pública y gratuita, así como al CONICET y al INTA, por haberme dado la posibilidad de estudiar y realizar esta tesis.

## ÍNDICE

	PAG
RESUMEN	1
RESUMEN EN INGLES	3
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	
1. La Fiebre Aftosa	7
1.1. Generalidades de la enfermedad y patogenia	8
1.2. El Virus de la Fiebre Aftosa. Organización genómica y proteínas virales	9
1.3. Ciclo infeccioso del Virus de la Fiebre Aftosa	11
1.4. Respuesta inmune contra el Virus de la Fiebre Aftosa en sus huéspedes naturales	12
2. Generalidades de la respuesta inmune contra virus	14
3. Particularidades de la respuesta inmune contra virus citopáticos.	16
Respuesta innata	
3.1. Reconocimiento de la infección por el sistema inmune innato	17
3.2. Interferón de tipo 1	19
3.3. Células NK	19
4. Inducción rápida de anticuerpos neutralizantes contra virus	20
4.1. Subpoblaciones de linfocitos B periféricos	20
4.2. Linfocitos B de tipo innato	22
4.2.1. Antígenos timo-independientes	23
4.2.2. Secreción de anticuerpos naturales por linfocitos B1	25
4.2.3. Linfocitos B de la zona marginal y su papel en la rápida respuesta contra antígenos distribuidos por vía hematológica	27

4.2.3.1.	Circulación sanguínea, composición y flujo de células en la zona marginal	27
4.2.3.2.	Generación de linfocitos B de la zona marginal	29
4.2.3.3.	Características funcionales de los linfocitos B de la zona marginal	30
5.	Células dendríticas y su función en la inducción de las respuestas anti-virales	32
5.1.	Células dendríticas inmaduras y maduras	33
5.2.	Modulación de la respuesta inmune adaptativa por células dendríticas	35
5.3.	Inducción de tolerancia y de linfocitos T reguladores por células dendríticas	36
5.4.	Procesamiento y presentación antigénica	37
5.4.1.	Presentación en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase I	37
5.4.2.	Presentación en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase II	38
6.	Interacción entre células dendríticas y virus	39
6.1.	Reconocimiento de la infección y respuesta innata mediada por células dendríticas	39
6.2.	Respuesta inmune adaptativa contra virus. Inicio y modulación de la funcionalidad de las células dendríticas por infecciones virales	41
6.3.	Estimulación de linfocitos B y de la secreción de anticuerpos anti-virales por células dendríticas	43
7.	Respuesta inmune en el modelo murino de infección con el Virus de la Fiebre Aftosa. Comparación con la respuesta inducida por la vacunación	44
	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>48</b>
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>51</b>

1. Ratones	52
2. Líneas celulares	52
3. Crecimiento de la línea NIH 3T3 y recolección de sobrenadante de cultivo conteniendo GM-CSF murino	52
4. Producción de células dendríticas derivadas de médula ósea	53
5. Virus. Infección y estimulación con LPS de las células dendríticas	53
6. Infección y vacunación de ratones	54
7. RT-PCR	54
8. Determinación de la viabilidad celular y de la apoptosis	55
9. Análisis de la expresión de moléculas de superficie de las células dendríticas mediante citometría de flujo	56
10. Análisis de la expresión de marcadores de superficie de linfocitos B mediante citometría de flujo	56
11. Ensayos de fagocitosis y endocitosis en células dendríticas	56
12. Cuantificación de la adherencia de las células dendríticas al plástico mediante la tinción con cristal violeta	57
13. Estimulación de la proliferación de linfocitos T por células dendríticas	57
14. Determinación de la capacidad de proliferar de linfocitos T mediante la estimulación con Concanavalina A	58
15. Análisis de la secreción de citoquinas y anticuerpos anti-Virus de la Fiebre Aftosa en cocultivos de células dendríticas y esplenocitos o células de linfonódulos	58
16. ELISA para la determinación de la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares	58
17. ELISA para la evaluación de las respuestas de anticuerpos contra el Virus de la Fiebre Aftosa, ovoalbúmina y Dextrán-500	59
18. Seroneutralización para la determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el Virus de la Fiebre Aftosa en muestras de suero o en sobrenadantes de cultivo celular	61
19. Transferencia adoptiva de células dendríticas	62

20. Esplenectomía	62
21. Enriquecimiento de células CD9+ a partir del bazo mediante la utilización de perlas magnéticas	62
22. Eliminación funcional de los linfocitos B de la zona marginal	63
23. Análisis estadístico	63
 RESULTADOS	 64
1. Determinación de la susceptibilidad de las células dendríticas a la infección con el Virus de la Fiebre Aftosa	65
2. Determinación de la viabilidad de las células dendríticas luego de la infección con el Virus de la Fiebre Aftosa	66
3. Fenotipo y morfología de las células dendríticas infectadas por el Virus de la Fiebre Aftosa	68
4. Evaluación de la capacidad estimuladora de linfocitos T de las células dendríticas infectadas con el Virus de la Fiebre Aftosa	72
5. Evaluación de la capacidad de las células dendríticas infectadas con el Virus de la Fiebre Aftosa para estimular linfocitos T <i>in vivo</i>	75
6. Inhibición de las respuestas de anticuerpos contra antígenos timo-dependientes no relacionados por la infección con el Virus de la Fiebre Aftosa	79
7. Células dendríticas infectadas con el Virus de la Fiebre Aftosa inducen una fuerte y rápida respuesta de anticuerpos timo-independientes <i>in vitro</i> con son co-cultivadas con esplenocitos	80
8. IL-10 e IL-6 son necesarias para inducir una rápida respuesta timo-independiente contra el Virus de la Fiebre Aftosa en co-cultivos de células dendríticas infectadas y esplenocitos	84
9. La respuesta de anticuerpos timo-independiente luego de la infección con el Virus de la Fiebre Aftosa es producida en el bazo	87



10. Células CD9+ son las principales productoras de anticuerpos timo-independientes contra el Virus de la Fiebre Aftosa y de la secreción de IL-10 en los bazos de ratones infectados	91
11. La eliminación funcional de los linfocitos B de la zona marginal reduce la producción temprana de IgM e IgG3 contra el Virus de la Fiebre Aftosa	93
DISCUSIÓN	95
CONCLUSIONES	116
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119



## Resumen

### Respuesta Inmune temprana contra el Virus de la Fiebre Aftosa

La infección de ratones con el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) induce una respuesta de anticuerpos neutralizantes en forma timo-independiente (TI), que rápidamente elimina al virus del organismo. Por el contrario, la vacunación con el virus inactivado induce una típica respuesta timo-dependiente (TD). En este trabajo de tesis se demuestra que las células dendríticas (CDs) murinas son susceptibles a la infección con el VFA *in vitro*. Sin embargo, la replicación viral en ellas es abortiva. En células infectadas, la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y CD40 decrece, mientras que la expresión de la molécula CD11b aumenta. Junto con estas alteraciones en el fenotipo, las células infectadas presentan modificaciones en su morfología y en su funcionalidad que, en conjunto, son indicativas de la adquisición de un fenotipo macrofágico. Asimismo, las CDs infectadas son incapaces de estimular la proliferación de linfocitos T *in vitro* y de inducir una respuesta de anticuerpos secundaria *in vivo*. La infección de las CDs induce en ellas la secreción de IL-6 y además induce la secreción de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) y de IL-10 en los co-cultivos CDs y esplenocitos. Estas mismas citoquinas son detectadas en los bazos de ratones infectados con el VFA, pero no en los bazos de ratones vacunados. El pico de la secreción de IFN- $\gamma$  y de IL-10 se produce en forma simultánea con la supresión de la proliferación inducida por Concanavalina-A de los linfocitos T obtenidos de los bazos de ratones infectados.

A pesar de suprimir las TD durante la infección temprana con el VFA, las CDs infectadas estimulan eficientemente a los linfocitos B del bazo, quienes producen anticuerpos TI contra el virus en forma rápida. La secreción de estos anticuerpos es dependiente de la presencia de las citoquinas IL-6 e IL-10. Por el contrario, los linfocitos B de los ganglios linfáticos son incapaces de responder a la estimulación con las CDs infectadas. Los linfocitos B CD9+ localizados en el bazo son los principales productores de los anticuerpos TI contra el VFA y de la secreción de IL-10. En efecto, la esplenectomía de los

ratones produce un cambio en el tipo de respuesta, la cual se vuelve TD. La eliminación funcional de los linfocitos B de la zona marginal inhibe significativamente la secreción de anticuerpos luego de la infección con el VFA, indicando que esta población de linfocitos B cumple un importante papel en la respuesta temprana contra este virus. Contrariamente a lo observado con las CDs infectadas, las CDs que internalizaron al VFA inactivado estimulan linfocitos B con menor eficiencia y no inducen la secreción de IL-10 por los mismos.

En conjunto, estos resultados indican que luego de la infección con el VFA, las CDs adquieren un perfil funcional que les permite la eficiente estimulación de los linfocitos B, mientras que la capacidad de estas células para estimular a los linfocitos T se encuentra inhibida. Por lo tanto, durante la respuesta inmune temprana contra el VFA, se produce una supresión selectiva del compartimiento del sistema inmune involucrado en las respuestas TD, mientras que el compartimiento involucrado en la producción de anticuerpos TI protectores es eficientemente estimulado.

Palabras clave:

Aftosa; células dendríticas; interleuquina 10; respuestas timo-independientes; linfocitos B de la zona marginal

## Resumen en inglés

### Early immune response against Foot and Mouth Disease Virus

Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) is a cytopathic virus that infects mice inducing a thymus-independent (TI) neutralizing antibody response that rapidly clears the virus. In contrast, vaccination with UV-inactivated virus induces a typical thymus-dependent (TD) response. Herein, we show that dendritic cells (DCs) are susceptible to infection with FMDV *in vitro*, although viral replication is abortive. Infected DCs down-regulate the expression of MHC class II and CD40 molecules and up-regulate expression of CD11b. In addition, infected DCs exhibit morphological and functional changes towards a macrophage-like phenotype. FMDV-infected DCs fail to stimulate T-cell proliferation *in vitro* and to boost an antibody response *in vivo*. Moreover, infection of DCs *in vitro* induces the secretion of gamma-interferon (IFN- $\gamma$ ) and IL-10 in cocultures of DCs and splenocytes. High quantities of these cytokines are also detected in the spleens of FMDV-infected mice, but not in the spleens of vaccinated mice. The peak of secretion of gamma-interferon and IL-10 is concurrent with the suppression of Concanavalin A-mediated proliferation of T cells obtained from the spleens of infected mice.

Despite the suppression of TD responses during early infection with FMDV, FMDV-infected DCs efficiently stimulate B lymphocytes from the spleen, which rapidly secrete anti-FMDV TI antibodies. The secretion of these antibodies depends on the presence of IL-6 and IL-10. In contrast, B lymphocytes from lymph-nodes are unable to produce anti-FMDV antibodies upon stimulation with infected DCs. CD9<sup>+</sup> B lymphocytes CD9<sup>+</sup> in the spleen are the main producers of TI anti-FMDV antibodies and of the secretion of IL-10. Indeed, splenectomy switches the mode of activation of the anti-FMDV immune response from a TI to a TD way. Functional depletion of marginal zone B lymphocytes significantly inhibits the secretion of anti-FMDV antibodies after infection, indicating that this subset of B lymphocytes plays a critical role in the early immune response against this virus. In contrast, DCs loaded with

inactivated FMDV are poor stimulators of B lymphocytes. In addition, they do not induce the secretion of IL-10 upon co-culture with splenocytes.

Altogether, these results indicate that while early after infection with FMDV DCs become potent stimulators of B lymphocytes, their ability to stimulate T lymphocytes is impaired. Thus, during the early immune response against FMDV, a selective suppression of the immune compartment involved in TD responses is established. In contrast, the immune compartment in charge of the production of TI protective antibodies is efficiently stimulated.

Keywords:

Foot-and-Mouth-Disease-Virus; Dendritic cells; interleukin-10; thymus-independent response; marginal zone B lymphocytes

## Abreviaturas

ARNdc: ácido ribonucleico de doble cadena

ARNsc: ácido ribonucleico de simple cadena

BCR: receptor de células B

CDs: células dendríticas

Con-A: concanavalina A

CPA: célula presentadora de antígenos

cpm: cuentas por minuto

Dex-500: dextrán 500

DITC<sub>50</sub>: Dosis infectiva en cultivo de tejidos

DLRL50: dosis letal 50% en ratones lactantes

DO: densidad óptica

ev: endovenoso

FA: Fiebre Aftosa

FITC: iosotiocianato de fluoresceína

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

IFN: interferón

IL: interleuquina

IMF: intensidad media de fluorescencia

ip: intra-peritoneal

LB de la ZM: linfocitos B de la zona marginal

LPS: lipopolisacárido

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

moi: multiplicidad de infección

OVA: albúmina de huevo

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: buffer fosfato salino

PBST: buffer fosfato salino adicionado con 0.05% de Tween 20

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PE: ficoeritrina

pi: post-infección

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones

PTx: toxina pertussis

RT: transcripción reversa

SFB: suero fetal bovino

TD: timo-dependiente

Th1: linfocitos T colaboradores tipo 1

Th2: linfocitos T colaboradores tipo 2

TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal

TI: timo-independiente

TLR: receptor tipo Toll

UV: luz ultravioleta

VFA: virus de la fiebre aftosa



## **INTRODUCCIÓN**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. La Fiebre Aftosa**

#### *1.1 Generalidades de la enfermedad y patogenia*

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad infectocontagiosa, aguda y febril que afecta a los artiodáctilos, incluyendo rumiantes domésticos y cerdos, así como a más de 70 especies silvestres (Alexandersen et al., 2003). Una de las características clínicas sobresalientes de la FA es la presencia de lesiones vesiculares localizadas fundamentalmente en la cavidad bucal, lengua y alrededor de las pezuñas. Debido a las importantes pérdidas causadas en la producción animal, así como a las restricciones en el comercio internacional de productos pecuarios que se establecen con los países que presentan la enfermedad, la importancia económica de la misma es sumamente considerable (Alexandersen et al., 2003, Grubman et al., 2004). El agente etiológico es el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA), el cual pertenece al género *Aphthovirus* de la familia *Picornaviridae* (Racaniello 2001).

Los animales susceptibles pueden infectarse por contacto directo con animales infectados, ya sea a través de aerosoles que vehiculizan el virus hasta el tracto respiratorio, o por transferencia mecánica del virus a través de cortes o abrasiones de la piel o de las mucosas. Otra forma de contagio es por contacto indirecto, en el que el virus es vehiculado a través de maquinarias, vehículos o personas. También es importante el contagio por ingestión de alimentos contaminados con el virus (Knowles et al., 2001).

Luego de la transmisión aerógena, el VFA replica durante un período que se extiende de uno a tres días en el epitelio del techo de la faringe y en la superficie dorsal del paladar blando (Oleksiewicz et al., 2001, Mc Vicar et al., 1976, Alexandersen et al., 2001, Burrows et al., 1981). Posteriormente, el virus alcanza la circulación sanguínea y se distribuye sistémicamente, llegando a los sitios de replicación secundaria. La principal amplificación del virus en este momento ocurre en el epitelio escamoso estratificado cornificado de la piel

(especialmente alrededor de las pezuñas) y de la boca (incluyendo la lengua). En animales jóvenes, también replica en el miocardio (Alexandersen et al., 2003).

La viremia tiene una duración que varía de entre tres a cinco días y, tanto en rumiantes como en cerdos, la eliminación del virus de la circulación coincide temporalmente con el comienzo de la detección de anticuerpos neutralizantes en el suero. Los anticuerpos neutralizantes son también responsables de la reducción significativa de la carga viral en la mayoría de los órganos, así como en las secreciones y excreciones, a través de las cuales el virus es eliminado durante la fase virémica (Alexandersen et al., 2003). Una excepción la constituye la región faríngea de los rumiantes, en donde el virus puede establecer una infección persistente, aun en presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes en el suero (Mc Vicar et al., 1976).

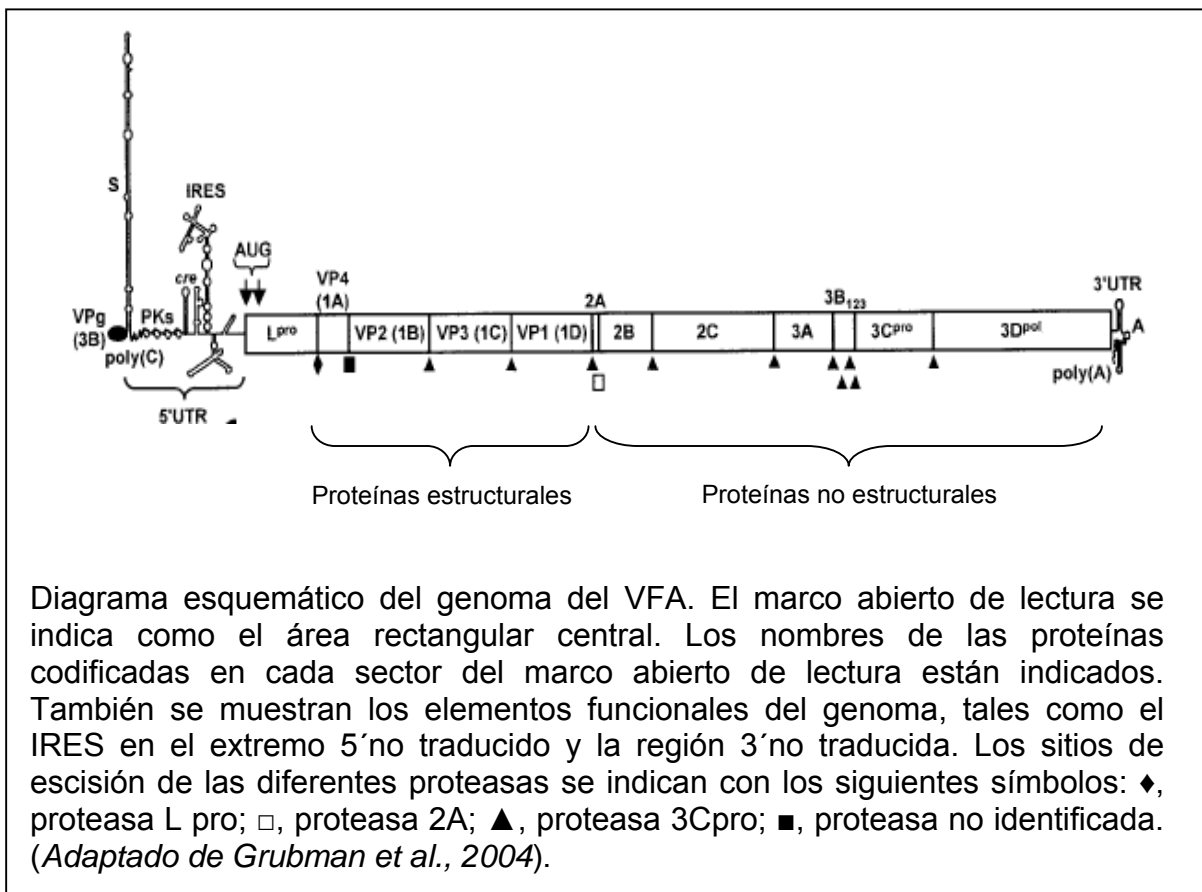
### *1.2 El Virus de la Fiebre Aftosa. Organización genómica y proteínas virales*

Como se mencionó anteriormente, el VFA pertenece al género *Aphthovirus* de la familia *Picornaviridae*. El virión tiene un diámetro aproximado de 25 nm y una densidad de 140S. El VFA contiene una única cadena de ARN de sentido positivo, que actúa como un mensajero para la traducción de proteínas. El genoma viral, de aproximadamente 8.500 bases de largo, se encuentra envuelto en una cápside de geometría icosaédrica. La cápside se compone de 60 copias de cada una de las proteínas estructurales del VFA (VP1, VP2, VP3, VP4) (Racaniello. 2001). La proteína VP1 contiene, entre sus aminoácidos 149-160, al principal sitio antigénico inductor de anticuerpos neutralizantes. Asimismo, esta región contiene al motivo Arg-Gly-Asp (RGD), el cual interactúa con diferentes adhesinas, pertenecientes a la familia de las integrinas localizadas en la superficie de las células blanco. Estas integrinas constituyen el principal receptor utilizado por el virus para el ingreso a las células (Verdaguer et al., 1995).

La organización del genoma de VFA es similar a la de otros *Picornavirus* (Racaniello. 2001). El extremo 5' no traducido se continúa con un único

segmento codificante o marco abierto de lectura (ORF), el cual es proseguido por un fragmento 3' no traducido. El marco abierto de lectura codifica para una única poliproteína, la cual es escindida en varios sitios por proteasas virales, generando de esta forma las distintas proteínas estructurales y no estructurales del VFA (ver esquema).

Los extremos 5' y 3' no traducidos están altamente conservados estructuralmente, y contienen elementos actuantes en cis que están involucrados en la replicación del ARN viral y en la regulación de la expresión del ORF. Dentro de ellos, cabe destacar la presencia del sitio de entrada interna de los ribosomas (IRES), el que permite el inicio de la traducción de las proteínas virales en un proceso independiente del capuchón de 7-metil guanosina, típico de los ARN mensajeros eucariotas (Grubman et al., 2004).



### 1.3 Ciclo infeccioso del virus de la Fiebre Aftosa

Las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$  y  $\alpha_v\beta_6$  son los principales receptores celulares para el VFA (Berinstein et al., 1995, Jackson et al., 2000, Jackson et al., 2002). Estas glicoproteínas, compuestas de dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) interactúan con el motivo tripéptido Arginina-Glicina-Aspártico (RGD) presente en una región altamente expuesta del rulo G-H de la proteína VP1. Asimismo, el VFA puede utilizar otros receptores celulares alternativos. Por ejemplo, puede ingresar a las células formando complejos inmunes con anticuerpos mediante la adsorción mediada por receptores del Fc (Mason et al., 1994). También ha sido descrito que el virus adaptado a cultivo celular luego de sucesivos pasajes en líneas susceptibles, utiliza proteoglicanos de heparán sulfato (PGHS) como principal receptor (Neff et al., 1998, Baranowski et al., 2000).

Luego de la interacción con su receptor, y a diferencia de lo que ocurre con otros *Picornavirus*, el VFA ingresa a la célula y se localiza en el interior de los endosomas. En estos, el virión de 140S se desensambla en subunidades pentaméricas de 12S, liberando así el ARN. Este fenómeno ocurre como consecuencia del ambiente ácido típico del interior de los endosomas (Curry et al., 1995, Ellard et al., 1999).

Una vez desprovisto de la cápside, el ARN viral es liberado en el citoplasma por un mecanismo aún no conocido. Como ha sido mencionado anteriormente, allí tendrá lugar la traducción viral. El ORF viral se traduce en un único polipéptido, el cual es posteriormente escindido proteolíticamente, obteniéndose como productos finales las proteínas estructurales y no estructurales del VFA. Estas reacciones de escisión son llevadas a cabo por las tres proteasas virales:  $L^{pro}$ , 2A y  $3C^{pro}$  (Clarke et al 1988, Vakharia et al 1987, Ryan et al 1991, Bablanian et al 1993) (Fig. 1).

La replicación del ARN viral comienza con la síntesis de ARN de cadena negativa, utilizando como templado la molécula de sentido positivo contenida en los viriones infecciosos. Como resultado, se forma una molécula de doble cadena, denominada forma replicativa (FR). Una vez producida la FR, la

síntesis de nuevas cadenas de sentido positivo puede comenzar. La síntesis del ARN tiene lugar en el citoplasma, en asociación con un complejo replicativo formado por membranas derivadas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi (Grubman et al., 2004).

El último paso en el ciclo de replicación consiste en la encapsidación del ARN de cadena positiva. La formación de la cápside se inicia por la interacción de las proteínas VP0, VP1 y VP3, las cuales se asocian formando un protómero. Cinco protómeros se ensamblan en un pentámero, y doce pentámeros se ensamblan en una partícula denominada provirión que contiene al ARN viral unido de forma covalente a la proteína viral VPg. El último paso hacia la formación de un virión maduro es la escisión de VP0 en VP2 y VP4, la cual ocurre autocatalíticamente (Curry et al., 1997, Hindiyeh et al., 1999) por un mecanismo dependiente de la presencia del ARN viral (Jacobson et al., 1968).

#### *1.4 Respuesta inmune contra el Virus de la Fiebre Aftosa en sus huéspedes naturales*

La producción de interferones de tipo I (IFN  $\alpha$  y  $\beta$ ) constituye un mecanismo de suma importancia para el rápido control del VFA en los primeros momentos luego de la infección. A través de experimentos realizados *in vitro*, se demostró que la infección con VFA de células susceptibles puede ser inhibida si éstas son preincubadas con interferones de tipo I recombinantes porcino o bovinos (Chinsangaram et al 2001). La importancia del interferón en el control inicial del VFA ha sido también demostrada *in vivo*. La inoculación de cerdos con un *Adenovirus* recombinante que expresa IFN  $\alpha$  porcino indujo protección contra la infección con VFA en menos de 24 hs. luego de la inoculación (Chinsangaram et al., 2003).

La producción de interferón de tipo 1 ha sido estudiada en células dendríticas (CDs) de cerdo aisladas de la piel. La expresión constitutiva de IFN- $\alpha$  en estas células es responsable de la resistencia de las mismas a la infección con el virus. Además, luego de la infección *in vitro* de las CDs, se estimula la secreción de IFN- $\beta$ . Por el contrario, células pulsadas con virus inactivado no aumentan la producción de estas citoquinas, indicando que la forma replicativa

del ARN de doble cadena es necesaria para inducir la secreción de las mismas (Bautista et al., 2005).

Como se indicó anteriormente, a partir del tercer día post-infección (pi) de rumiantes o cerdos, comienzan a detectarse en el suero anticuerpos neutralizantes. Estos anticuerpos eliminan el virus de la circulación y además otorgan protección contra la reinfección con virus del mismo serotipo (Bautista et al., 2003).

En bovinos, luego de la producción inicial de IgM, se produce el cambio a IgG, observándose generalmente que la concentración de IgG1 es mayor que la de IgG2 (Saiz et al., 2002, Mulcahy et al., 1990). La rápida cinética de producción de anticuerpos neutralizantes al comienzo de la infección transcurriría en un contexto de falta de colaboración T, ya que la proliferación restringida por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II recién es detectable a los 14 días pi (Childerstone et al., 1999).

Al igual que los linfocitos T CD4+ colaboradores, los linfocitos T CD8+ también son inducidos a partir del día 14 pi de bovinos con VFA (Childerstone et al., 1999). Por lo tanto, si bien durante el desarrollo de la respuesta inmune contra VFA se inducen linfocitos T citotóxicos, los mismos no participan en el control inicial de la infección. Más aun, la expresión de moléculas del CMH de clase I en la superficie de células susceptibles disminuye rápidamente luego de la infección (García-Valcarcel et al., 1996). Esta disminución en la expresión de moléculas del CMH de clase I podría estar mediada por la interferencia del virus en el proceso de ensamblaje del péptido con las moléculas del MHC (García-Valcarcel et al. 1996). Asimismo, la inhibición generalizada de la síntesis de proteínas celulares que se produce como consecuencia de la infección con el virus, también podría explicar la menor expresión de esta molécula presentadora en la superficie celular. Independientemente del mecanismo utilizado, tanto la inducción como la actividad efectora de los linfocitos T citotóxicos estarían impedidas durante la etapa temprana de la infección con VFA (Sanz-Parra et al., 1998), reforzando la observación de que el control inicial de la infección es llevado a cabo principalmente por anticuerpos neutralizantes.

En porcinos, durante los primeros cuatro días pi, se produce una marcada linfopenia y una importante inhibición de la funcionalidad de los linfocitos T, medida como respuesta a la estimulación con Concanavalina-A. Sin embargo, al igual que en los bovinos, la viremia en estos animales tiene una duración de 2-3 días. Por lo tanto, tampoco en este caso la colaboración T sería necesaria para inducir una respuesta protectora contra VFA. Más aun, esta depresión de la funcionalidad T es simultánea con la inducción de anticuerpos neutralizantes anti-VFA (Chinsangaram et al., 2003, Eble et al., 2004).

## **2. Generalidades de la respuesta inmune contra virus**

Los virus son patógenos intracelulares obligados que dependen para su supervivencia de huéspedes susceptibles donde replicar. La co-evolución de los virus y sus huéspedes ha conducido a un balance entre la virulencia y la respuesta inmune inducida (Hilleman et al 2004, Hangartner et al 2006). Por lo tanto, si bien los virus a lo largo de su evolución han adquirido mecanismos que les permiten una replicación eficiente en sus huéspedes, raramente presentan una virulencia tal que provoque la muerte de los mismos. Paralelamente, el sistema inmune del huésped ha evolucionado adquiriendo mecanismos que le permiten responder eficientemente contra los virus, y de esta manera controlar la infección. Sin embargo, la magnitud de la respuesta montada también presenta un límite en su desarrollo, el cual está determinado por la producción de daño inmunopatológico que toda respuesta inmune conlleva (Hangartner et al 2006, Bachmann et al 2002).

Las infecciones virales pueden ser clasificadas en dos grandes grupos de acuerdo a las características citopatogénicas de los virus involucrados: infecciones citopáticas y no citopáticas.

Diferentes grupos de virus citopáticos provocan infecciones agudas, causando rápida necrosis en las células infectadas. Ejemplos de este tipo de infecciones los constituyen el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA), poliovirus, rinovirus (virus del resfrío), el virus de la rabia y el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV). La estrategia de supervivencia de estos virus es la infección



del tipo “golpea y corre”: el virus infecta al huésped, replica rápidamente causando extenso daño celular e induce una rápida respuesta de anticuerpos neutralizantes, la cual condiciona que, antes de ser controlado por el sistema inmune, el virus deba transmitirse a un nuevo huésped susceptible (Hilleman et al., 2004). Por este motivo, los virus citopáticos son altamente y rápidamente contagiosos. Sin embargo, esta estrategia viral presenta el inconveniente de que, con cada transmisión, el número de huéspedes susceptibles (no inmunes) en una población disminuye y consecuentemente, la posibilidad de replicación viral en la población se reduce rápidamente. Por lo tanto, la mayoría de los virus citopáticos escapan a este estado de inmunidad poblacional mediante la formación de serotipos. Los serotipos son variantes virales generadas por mutación que, si bien presentan reacción cruzada con la variante viral original en varios epítopes reconocidos por anticuerpos, no reaccionan cruzadamente en aquellos epítopes involucrados en la neutralización o protección. Como resultado, individuos que presentan inmunidad contra un serotipo viral, no poseerán inmunidad protectora contra virus pertenecientes a serotipos distintos y, por lo tanto, serán susceptibles a la infección con estos últimos.

El otro grupo en el que se clasifican los virus consiste en el de los virus no-citopáticos. Éstos no inducen daño celular directo, sino que es la propia respuesta del huésped la responsable de las lesiones en los tejidos infectados. A las lesiones generadas por los mecanismos efectorales del sistema inmune en los tejidos infectados con virus no-citopáticos se las denomina lesiones inmunopatológicas. Entre los virus con estas características, se mencionan a los de la hepatitis B, hepatitis C, linfocoriomeningitis murina (LCMV), virus elevador de la lactato-deshidrogenasa (LDV) y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). La estrategia de supervivencia de los virus no citopáticos se denomina “golpea y se queda”. Esta estrategia se caracteriza por su residencia prolongada en el huésped infectado, la cual es posible gracias a la baja inmunogenicidad y baja patogenicidad de estos virus, así como a la interferencia activa de los mismos en el desarrollo de la respuesta inmune del huésped. Por estos motivos, los virus no-citopáticos generalmente no son eliminados del organismo del huésped y, por lo tanto, no requieren de una alta tasa de contagio para sobrevivir en la población (Hilleman et al 2004).

Las infecciones con virus citopáticos y no citopáticos suelen inducir los mismos mecanismos de defensa innatos, tales como la producción de interferones de tipo 1 y activación de células NK. Sin embargo, las respuestas inmunes adaptativas contra éstos, presentan características diferenciales notorias. A lo largo de esta introducción, nos centraremos particularmente en el análisis de la respuesta inmune contra los virus citopáticos.

Las respuestas contra virus citopáticos se caracterizan por inducir rápidamente (2-4 días post-infección) altos títulos de anticuerpos neutralizantes, generalmente en forma timo-independiente (TI). Estos anticuerpos son los principales encargados de controlar la infección, al evitar la diseminación del virus a los órganos vitales. Por el contrario, las respuestas de linfocitos T citotóxicos no suelen ser importantes en el control inicial de estas infecciones, ya que las mismas, si bien son inducidas, lo hacen tardíamente, una vez que la replicación viral ha sido controlada por los anticuerpos (Bachmann et al., 1997).

En las infecciones causadas por virus no citopáticos, por el contrario, el control inicial de la infección suele estar a cargo de los linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, estos linfocitos también son los principales responsables del daño inmunopatológico que se observa en el transcurso de estas infecciones. Respecto a la respuesta humoral contra virus no citopáticos, suele observarse que los anticuerpos neutralizantes aparecen en bajos títulos y tardíamente (entre semanas a meses post-infección), lo cual constituye una diferencia notoria con las respuestas a virus citopáticos (Hangartner et al., 2006).

En síntesis, el tipo de respuesta inmune inducido luego de la infección con virus agudamente citopáticos difiere notablemente de la respuesta contra virus no citopáticos, tanto en los mecanismos efectores involucrados como en la cinética en que éstos son inducidos.

### **3. Particularidades de la respuesta inmune contra virus citopáticos.**

#### **Respuesta innata**

Las respuestas inmunes contra virus citopáticos presentan diferencias importantes con respecto a las respuestas inducidas frente a antígenos timo-dependientes (TD) clásicos. El daño tisular causado por la replicación viral con

la consecuente inflamación, la presencia de diferentes moléculas plausibles de ser reconocidas por el sistema inmune innato, la estructura del antígeno y su cinética de distribución así como la interferencia de los virus con los mecanismos del sistema inmune son algunos de los factores que determinan dichas diferencias. Algunos de estos aspectos serán tratados en la presente sección.

### *3.1. Reconocimiento de la infección viral por el sistema inmune innato*

La mayoría de los virus infectan a sus huéspedes ingresando por las superficies mucosas de las vías aéreas, la conjuntiva, el tracto gastrointestinal o el tracto urogenital. Otros lo hacen a través de la piel o por inoculación directa en los tejidos. El primer obstáculo encontrado por los virus para ingresar al organismo susceptible lo constituyen las barreras inespecíficas de las superficies epiteliales, las cuales poseen mecanismos físicos y químicos de protección.

Cuando las barreras inespecíficas son vulneradas y, por lo tanto, los virus comienzan a replicar en los tejidos del huésped, el sistema innato produce una respuesta rápida, encargada del control inmediato del patógeno mientras que la respuesta adaptativa comienza a desarrollarse. El sistema innato detecta la presencia de microorganismos, entre ellos virus, por medio de una serie de receptores celulares distribuidos de manera no clonal que reconocen patrones moleculares presentes en los microbios pero no en los tejidos propios sanos. Estas moléculas, presentes tanto en bacterias, virus, hongos y parásitos, son denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Janeway et al., 2001). Los receptores que las reconocen se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Los PRRs se caracterizan por: presentar una especificidad heredada en el genoma, interactuar con un amplio rango de estructuras moleculares de un tipo determinado y desencadenar una respuesta inmediata. Además de reconocer a los PAMPs microbianos, los PRRs pueden, en algunas situaciones, ser activados por moléculas endógenas. Estas moléculas, cuya localización en condiciones homeostáticas suele ser intracelular, son liberadas al espacio extracelular por

las células necróticas o sometidas a condiciones de estrés. La detección de estas moléculas indicaría indirectamente una situación de “peligro” en los tejidos, los cuales serían quienes determinarían la producción de mecanismos de defensa y el inicio de la respuesta inmune adaptativa (Matzinger et al., 2002).

Dentro de los PRRs, los receptores tipo Toll (TLRs) desempeñan un papel destacado. Los TLRs son una familia de receptores constituida por moléculas codificadas en la línea germinal. Estos receptores, inicialmente identificados en base a su homología con el receptor Toll de *Drosophila* (Medzhitov et al., 1997), participan en el reconocimiento de una gran cantidad de compuestos microbianos (Takeda et al., 2003). Hasta la fecha, 12 TLRs han sido descritos en ratón. Si bien la mayoría de los TLRs se expresan predominantemente en la superficie celular, un grupo de ellos (TLR-7, TLR-8, TLR-9 y en algunos casos TLR-3) es retenido en compartimentos intracelulares.

Con respecto al reconocimiento de patrones moleculares presentes en los virus o generados en el transcurso de una infección viral, cuatro tipos de PAMPs han sido descritos: ARN de doble cadena (ARNdc), ADN rico en motivos CpG, ARN de simple cadena (ARNsc) y glicoproteínas de envoltura viral. Como ejemplos de glicoproteínas con actividad estimuladora de TLRs, se pueden mencionar a la hemaglutinina del Virus del Sarampión y a la proteína fusogénica del Virus Sincicial Respiratorio (RSV), las cuales estimulan al TLR-2 y al heterodímero constituido por TLR-4 y CD14, respectivamente (Bieber et al., 2002; Kurt-Jones et al., 2000). Las infecciones virales también son reconocidas por PRRs que identifican a los ácidos nucleicos virales. Por ejemplo, el ARN de doble cadena, un típico intermediario de la replicación viral, es reconocido por el TLR-3 (Alexopoulou et al., 2001). Asimismo, el ARNsc de origen viral puede ser reconocido en el interior de endosomas a través del TLR7, como en el caso de influenza, virus de la estomatitis vesicular (VSV) y HIV-1 (Lund et al., 2004, Diebold et al., 2004, Heil et al., 2004). Finalmente, aquellos virus cuyo genoma es de ADN, pueden ser reconocidos a través del TLR-9, también expresado en la membrana de las vesículas endosomales (Krug et al., 2004, Lund et al., 2003). Este receptor reconoce secuencias CpG no metiladas que, si bien son poco frecuentes en los genomas de mamíferos,

se encuentran en los genomas de algunos virus, tales como herpes simplex tipo 1 y 2 y citomegalovirus murino. Como principal consecuencia funcional de la estimulación de los receptores TLR-3, TLR-9, TLR-7 y TLR-8, se produce una importante secreción de interferones tipo 1 (Alexopoulou et al., 2001, Diebold et al., 2004, Krug et al., 2004, Heil et al., 2003). A pesar de la importante secreción de interferones que se observa durante la infección con el VFA, hasta el momento la estimulación de TLRs por este virus no ha sido descrita.

### *3.2 Interferón de tipo 1*

Los interferones (IFN) son una familia multigénica de citoquinas inducibles que poseen actividad antiviral. Habitualmente, a esta familia de moléculas se la clasifica en dos grupos: interferón de tipo 1 (interferones virales), e interferón tipo 2 (IFN- $\gamma$  o interferón inmune). Dentro de los interferones virales se incluyen al IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\sigma$  y al IFN- $\tau$  (exclusivo de rumiantes, Martal et al., 1998).

Luego de una infección viral, la expresión de los interferones de tipo 1 es inducida en casi todos los tipos celulares. Sin embargo, las CD<sub>s</sub> plasmacitoides, también llamadas células productoras de interferón, pueden secretar hasta mil veces más interferón  $\alpha/\beta$  que el resto de las células del organismo (Asselin-Paturel et al., 2001, Siegal et al., 1999).

La acción del IFN se produce en forma autócrina o parácrina, luego de la interacción de estas moléculas con sus receptores específicos. Tanto IFN- $\alpha$  como IFN- $\beta$  utilizan el mismo receptor. La unión del IFN a su receptor produce como resultado la activación de genes inducibles por interferón (Taniguchi et al., 2001). Entre ellos, hay varios que codifican para proteínas con acción antiviral (Samuel et al., 2001).

### *3.3 Células NK*

Las células NK participan en etapas tempranas de la respuesta contra las infecciones virales ejerciendo importantes funciones efectoras, tales como

citotoxicidad y secreción de citoquinas. Estas células, a diferencia de los linfocitos T, no expresan receptores con especificidad para antígenos definidos, sino que detectan rápidamente señales inducidas en las células bajo condiciones de estrés, como podría ser una infección viral. Por lo tanto, son típicas células de la inmunidad innata. Sin embargo, debido a su interacción con células de la inmunidad adaptativa, se las considera en la frontera entre estos dos sistemas.

Entre las funciones efectoras de las células NK se incluye principalmente la inducción de muerte celular mediante apoptosis, además de la liberación de citoquinas y la modulación de la respuesta inmune adaptativa mediante la secreción de IFN- $\gamma$  (Paul. 2003).

#### **4. Inducción rápida de anticuerpos neutralizantes contra virus**

Así como las células NK presentan la habilidad de ejercer respuestas citotóxicas en forma rápida, conteniendo la infección mientras los linfocitos T citotóxicos son activados en un proceso más lento, también existe un conjunto de linfocitos B capaces de secretar anticuerpos inmediatamente luego de una infección. Sobre estos linfocitos B, denominados linfocitos B de tipo innato, tratará la presente sección.

##### *4.1 Subpoblaciones de linfocitos B periféricos*

El conjunto de linfocitos B maduros es heterogéneo y está constituido por tres subpoblaciones principales: linfocitos B2 (foliculares), linfocitos B1 y linfocitos B de la zona marginal (LB de la ZM). Estas poblaciones celulares difieren en su localización anatómica, en la expresión de marcadores de superficie y en su funcionalidad.

**Tabla 1: Fenotipo de las subpoblaciones de linfocitos B periféricos**

(Gatto et al., 2005)

Marcador de superficie	Subpoblación de linfocitos B		
	B2 folicular	Zona Marginal	B1
IgM	Bajo	Alto	Alto
IgD	Alto	Bajo	Bajo
CD21	Intermedio	Alto	Bajo
CD23	Alto	Bajo	Bajo
CD5	-	-	+ <sup>1</sup>
CD1d	Intermedio	Alto	Intermedio
CD9	-	+	+ <sup>2</sup>
LFA-1	Intermedio	Alto	
Integrina $\alpha 4\beta 1$	Intermedio	Alto	
Receptor 3 de S1p	Bajo	Alto	

<sup>1</sup> Solamente células B1a; linfocitos B1b son CD5-

<sup>2</sup> En ratones C57BL/6; en ratones Balb/c, se detectan linfocitos B1, tanto CD9+ como CD9-.

Los **linfocitos B2** foliculares constituyen la mayoría de los linfocitos B maduros. Estas células recirculan constantemente a través de los órganos linfáticos secundarios, en donde se ubican principalmente en los folículos B por un período de aproximadamente 24 horas, tras el cual retornan a la circulación sanguínea para dirigirse a otro órgano linfático secundario. Esta recirculación se repite hasta que se produce el contacto con el antígeno específico. Funcionalmente, los linfocitos B2 son los “clásicos linfocitos B”, quienes son responsables de las respuestas contra antígenos proteicos TD clásicos. La estimulación para la secreción de anticuerpos por este grupo de linfocitos B requiere no sólo del reconocimiento a través del BCR, sino que además es

necesaria la cooperación provista por los linfocitos T colaboradores. Éstos, luego de reconocer en la superficie de los linfocitos B2 al péptido antigénico asociado a las moléculas del CMH de clase II, brindan la segunda señal necesaria para la activación de los linfocitos B. La interacción entre las moléculas CD40L en la superficie de los linfocitos T y CD40 en la superficie de los linfocitos B, es uno de los componentes más importantes de esta segunda señal, en conjunto con la provista por citoquinas liberadas por los linfocitos T. Estos eventos determinan la formación del centro germinal, a partir del cual se operan los mecanismos de maduración de la afinidad de los anticuerpos y el cambio de isotipos, lo que concluirá con la formación de los plasmocitos secretores de anticuerpos y las células B de memoria. El tiempo requerido para atravesar esta etapa de inducción implica una demora de al menos cinco días en el inicio de la secreción de anticuerpos.

Los **LB de la ZM constituyen** una población no recirculante, que en roedores se ubica exclusivamente en la zona marginal del bazo. Allí desempeñan un papel crucial en las respuestas tempranas timo-independientes (TI) contra patógenos que se distribuyen por vía hematógena (Martin et al., 2000).

Los **linfocitos B1** también forman una población de localización fija, pero en este caso localizada principalmente en las cavidades pleural y peritoneal, donde constituyen entre el 30 y el 50% de las células B. Sin embargo, los linfocitos B1 también pueden encontrarse en el bazo, donde representan un 2% de los linfocitos B.

#### *4.2 Linfocitos B de tipo innato*

Tanto los linfocitos B1 como los linfocitos B de la ZM constituyen un grupo funcional que se denomina linfocitos B de tipo innato (Kearney et al., 2005). Estas células presentan un fenotipo activado o efector que les permite la rápida producción de anticuerpos ante el desafío antigénico. Es por esto que los linfocitos B de tipo innato representan una interfase entre la inmunidad



innata y adaptativa, ya que si bien poseen la especificidad de la inmunidad adaptativa, presentan la cinética y los requerimientos de activación típicos del sistema innato.

Los linfocitos B de tipo innato se caracterizan por la utilización de receptores del linfocito B (BCRs) con limitada diversidad. La reducida variabilidad de los anticuerpos secretados por este grupo de linfocitos B es el resultado del uso restringido y programado de genes variables, así como de la baja diversidad de unión, producto de la falta de expresión de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) durante el desarrollo de estas células. Este enzima adiciona nucleótidos sin templado durante los rearrreglos que conducen a la diversidad de las cadenas pesadas de anticuerpos y, por lo tanto, es una fuente importante de variabilidad de las inmunoglobulinas.

Los BCRs de los linfocitos B de tipo innato generalmente son sometidos a selección positiva mediada por antígenos, usualmente propios, que en muchos casos presentan reacción cruzada con antígenos presentes en patógenos microbianos. Asimismo, la rapidez en generar una respuesta de anticuerpos que poseen estos linfocitos se debe a que los mismos reaccionan habitualmente contra antígenos TI y, por lo tanto, no requieren de la colaboración de linfocitos T para ser activados (Kearney et al., 2005).

#### 4.2.1 Antígenos timo-independientes

Los antígenos TI son aquellos capaces de inducir una respuesta de anticuerpos *in vivo* en ausencia de colaboración T, tal como sucede en ratones atímicos (nu/nu) o en ratones en los que linfocitos T CD4<sup>+</sup> han sido eliminados por tratamiento con anticuerpos líticos anti-CD4. Los antígenos TI pueden clasificarse en tipo 1 o tipo 2, de acuerdo a la capacidad de inducir anticuerpos en ratones CBA/N, los cuales presentan una mutación en el gen *btk* (Bruton's tyrosine kinase), kinasa necesaria para la señalización a través del BCR.

- **Antígenos TI tipo 1.** Este grupo está constituido por moléculas que actúan como activadores policlonales de linfocitos B y que inducen una

respuesta eficiente en ratones CBA/N. El ejemplo típico de este grupo de antígenos es el LPS bacteriano.

- **Antígenos TI tipo 2.** Este grupo está formado por los antígenos TI incapaces de inducir una respuesta eficiente en los ratones CBA/N. Estos antígenos se caracterizan por la presencia de epitopes ordenadamente repetidos.

Los antígenos TI de tipo 2 clásicos son polisacáridos capsulares bacterianos y polímeros sintéticos. Asimismo, muchos virus citopáticos se comportan como antígenos TI de tipo 2. Entre ellos se pueden mencionar al VFA (Borca MV et al, 1986), virus coxsackie (Burns W et al 1975), encephalomyocarditis (Burns et al., 1975), virus Sindbis (Burns et al., 1975), polyomavirus (Szomolanyi-Tsuda et al., 1996), influenza (Lee et al., 2005), VSV (Battegay et al., 1996) y rotavirus (Franco et al., 1997). La capacidad de estos virus de inducir una respuesta TI ha sido asociada, al menos en parte, con la alta organización de los antígenos presentes en la superficie de los mismos (Bachmann et al., 1997). En efecto, el umbral de activación de las células B es menor para antígenos repetitivos y organizados (separados por una distancia de 5-10 nm) que para antígenos monoméricos no estructurados (Bachmann et al., 1997, Dintzis et al., 1976). Estos requerimientos en la organización antigénica están relacionados con la geometría espacial en la distribución de los BCRs de la superficie de los linfocitos B. Por lo tanto, la estimulación de los linfocitos B específicos con este tipo de antígenos induce el entrecruzamiento multivalente de los BCRs, produciéndose así la primera señal para las respuestas TI tipo 2 (Vos et al., 2000). A pesar de la timo-independencia de este tipo de respuestas, habría segundas señales que serían necesarias para la activación de los linfocitos involucrados. Sin embargo, a diferencia de las respuestas TD, en el caso de las respuestas contra antígenos TI, las segundas señales provendrían directamente del patógeno. Por ejemplo, ha sido demostrado que la señalización a través del TLR-9 presente en los linfocitos B actúa en forma sinérgica con la señalización mediada a través del

BCR, estimulando la proliferación B y la secreción de anticuerpos (Goeckeritz et al., 1999).

Otro factor a tener en cuenta con relación a la independencia de linfocitos T de una respuesta, es la localización del antígeno. En este sentido, ha sido demostrado que luego de la inoculación con antígenos polisacáridos o con algunos de los virus mencionados, el bazo es el principal órgano involucrado en la producción de anticuerpos timo-independientes. Por el contrario, la respuesta en nódulos linfáticos es ineficiente (Garg et al., 1994, Goud et al., 1988, Ochsenbein et al., 2000).

#### *4.2.2 Secreción de anticuerpos naturales por linfocitos B1*

Los anticuerpos naturales están constituidos fundamentalmente por IgMs (y en menor medida por IgG e IgA) polirreactivas y generalmente débilmente autorreactivas que son secretadas, en ausencia de estimulación antigénica aparente, por los linfocitos B1 (Avrameas 1991, Haury et al., 1997). El repertorio de los anticuerpos naturales es más restringido que el producido por los linfocitos B convencionales. Esto se debe tanto a la utilización de genes variables (V) de línea germinal que no presentan mutaciones somáticas, así como a la ausencia de TdT en los precursores de los linfocitos B en etapas tempranas de la ontogenia (Feeney et al., 1990). Asimismo, los linfocitos B1 presentan una frecuencia distintivamente mayor de uso de cadena  $\kappa$ , en comparación con los linfocitos B2 (20% y 5%, respectivamente) (Hayakawa et al., 1986).

Como ha sido mencionado anteriormente, la población de linfocitos B1 se localiza principalmente en las cavidades serosas de la pleura y el peritoneo. Estas células son producidas tempranamente durante la ontogenia, siendo el hígado fetal su principal órgano productor (Kantor et al., 1993). En animales adultos, los linfocitos B1 se auto-renuevan, manteniendo constante el tamaño de la población. Durante su desarrollo, los linfocitos B1 son sometidos a selección positiva por el antígeno. Este fenómeno se evidencia en las especificidades enriquecidas en esta población, así como en la observación repetida de determinados pares de genes V de las cadenas pesadas y livianas

(V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>) (Hardy et al., 1989, Masmoudi et al., 1990, Pennell CA 1989). La selección positiva es llevada a cabo por antígenos conservados, que en muchas ocasiones representan antígenos propios del individuo (Kearney 2005, Hardy et al., 1989, Hayakawa et al., 1990, Cancro et al., 2004, Hayakawa et al., 1999).

A pesar de presentar baja avidéz por sus antígenos y una baja concentración en suero, los anticuerpos naturales cumplen un importante papel en el control de las infecciones bacterianas y virales (Ochsenbein AF et al 2000, Briles et al., 1981, Baumgarth et al., 2000). Los mecanismos involucrados en la protección son varios (Ochsenbein et al., 2000).

1. Los anticuerpos naturales pueden neutralizar directamente a los patógenos, tal como ha sido demostrado en el caso de la infección con VSV y *Streptococcus pneumoniae*.
2. Los complejos inmunes que se forman como resultado de la interacción entre los microorganismos y los anticuerpos naturales son eficientemente filtrados de la circulación en los órganos linfáticos secundarios, principalmente en el bazo. De esta forma, se previene la diseminación hematógena de los microorganismos y la colonización de los órganos blanco. La filtración de estos complejos inmunes en el bazo estaría mediada principalmente por el aumento del tamaño de la partícula.
3. La presencia de anticuerpos naturales en la superficie de los microorganismos permite la activación del complemento por la vía clásica, dando origen a un complejo mayor, formado por antígeno-anticuerpo natural-complemento. La activación del complemento tiene varias consecuencias:
  - 3.a. Puede provocar la lisis de los patógenos directamente, a través de la formación del complejo de ataque a la membrana.
  - 3.b: El componente C3b presente en el complejo puede interactuar con los receptores CR3 y CR4 presentes en la superficie de los macrófagos de zona marginal (MZM), dirigiendo al antígeno hacia esta localización. Por lo tanto, los antígenos se concentran en la zona

marginal, promoviendo la activación de los linfocitos B de esta zona y el desarrollo de respuestas timo-independientes.

3.c: Otra consecuencia de la formación de los complejos inmunes que contienen complemento es el depósito del antígeno, a través de los receptores CR1 y CR2, en la superficie de las células foliculares dendríticas, estimulando de esta manera la formación de centros germinales y las respuestas TD.

3.d: Por último, las respuestas de los linfocitos B ZM y B2 se potencian como consecuencia de una disminución en el umbral de activación que se produce cuando la señalización a través del BCR ocurre en forma simultánea con la señalización a través del complejo CR2(CD21)/CD19/TAPA-1 (Ochsenbein et al., 2000). Este reconocimiento conjunto del antígeno y del complemento unido al mismo se denomina reconocimiento dual del antígeno, y su efecto estimulador en el desarrollo de las respuestas B ha sido ampliamente demostrado (Vos et al., 2000).

#### *4.2.3 Linfocitos B de la zona marginal y su papel en la rápida respuesta contra antígenos distribuidos por vía hematológica*

La zona marginal es una región microanatómica que se ubica entre las pulpas blanca y roja del bazo, contigua al seno venoso marginal. En ella se localizan los linfocitos B de la ZM, los cuales cumplen un papel clave en el control de infecciones con microorganismos que se diseminan por vía hematológica. El gran flujo sanguíneo de la ZM asegura un rápido contacto entre los antígenos presentes en la sangre y los LB ZM, permitiendo que estos últimos respondan con celeridad mediante la producción de anticuerpos TI.

##### *4.2.3.1 Circulación sanguínea, composición y flujo de células en la zona marginal*

La arteria esplénica ingresa al bazo en la región del hilio esplénico, ramificándose luego en arteriolas centrales o penicilares, las cuales se

continúan como arteriolas terminales en la pulpa roja. A lo largo de su recorrido a través de la pulpa blanca, las arteriolas centrales emiten ramificaciones, denominadas arteriolas foliculares, que desembocan en el seno marginal. Este seno venoso separa a la pulpa blanca de la zona marginal (Schmidt et al., 1993; Yamamoto et al., 1982). Al llegar al seno marginal, la sangre arteriolar encuentra menor resistencia al flujo y, por lo tanto, disminuye su velocidad de circulación. Estas características anatómicas e hidrodinámicas de la zona marginal permiten la rápida interacción de los patógenos con las células presentes en la zona marginal.

Muchas de las células sanguíneas que llegan desde la circulación al seno marginal emigran del mismo accediendo de esta manera a la pulpa roja. Entre las células no migratorias de la zona marginal, existe una red de células estromales (reticulares) que incluye una o más poblaciones especializadas de fibroblastos. Estas células y sus fibras constituyen el andamiaje anatómico de esta zona (Pillai et al., 2005). Dentro de esta red celular se ubican los linfocitos B de la ZM, las células dendríticas y dos poblaciones de macrófagos: macrófagos metalofílicos marginales (MMM) y macrófagos de la zona marginal (MZM). Mientras que los MMM se ubican bordeando a la pulpa blanca, los MZM se encuentran distribuidos a través de toda la zona marginal. Funcionalmente, los MZM tienen alta capacidad de capturar antígenos de naturaleza polisacárida de la sangre, que luego de ser concentrados por estas células, estimulan a los LB de la ZM (Dijkstra et al., 1985, Chao et al., 1990). Asimismo, los MZM participan en la retención de los LB de la ZM en este sitio, en un proceso mediado por la enzima fosfatasa de inositol-5 que contiene SH2 (SHIP), expresada en estas células mieloides (Karlsson et al., 2003). Además de este mecanismo, otros receptores han sido claramente involucrados en la retención de los linfocitos B de la ZM en su localización. La alta expresión de las integrinas LFA-1 y  $\alpha_4\beta_1$  en los linfocitos B de la ZM, a través de la interacción con los ligandos ICAM-1 y VCAM-1 expresados en mayor cantidad en la ZM que en otras regiones del bazo, contribuye con la retención de los linfocitos B de la ZM en esta región (Lu et al., 2002). Asimismo, la localización de estos linfocitos B también depende de la señalización a través de los receptores 1 y 2 de fosfato-1 de esfingosina (S1P), que también se expresan

en mayores niveles en la superficie de los linfocitos B de la zona marginal que en los LB foliculares (Cinamon et al., 2004).

#### *4.2.3.2 Generación de linfocitos B de la zona marginal*

A pesar de que los linfocitos B2 y los linfocitos B ZM representan dos grupos diferentes de linfocitos B, ha sido demostrado que células recirculantes, recolectadas del conducto torácico o de linfonódulos, pueden repoblar la ZM. Por lo tanto, ha sido postulado que los precursores inmediatos de los linfocitos B de la ZM serían células recirculantes (Vinuesa et al., 2003). Sin embargo, existen también observaciones que indican que, en condiciones de restricción de flujo de células provenientes de la médula ósea, los linfocitos B de la zona marginal serían autorrenovables. Ésto ha sido demostrado mediante la utilización de ratones genéticamente manipulados, en los que el desarrollo de linfocitos B se restringe al período perinatal por medio de la eliminación condicional del gen RAG-1. En estos animales, al llegar a la adultez, se observa persistencia de linfocitos B de la ZM, mientras que la población de linfocitos B2 disminuye sustancialmente (Hao et al., 2001).

Una importante cantidad de evidencias indica que, al igual que los linfocitos B1, los LB ZM se seleccionan positivamente al reconocer el antígeno a través de su BCR. Ratones transgénicos que expresan cadenas pesadas de anticuerpos autorreactivos (cadena pesada VH1, derivada de un hibridoma anti-fosforilcolina) manifiestan un enriquecimiento de estos clones de LB en la ZM. Por el contrario, en ratones transgénicos que expresan la cadena pesada de anticuerpos contra lisozima de huevo (VH36-60), la mayoría de los LB se diferencia hacia B2 (Martín et al., 2000). En concordancia con estos resultados, ha sido demostrado que en ratones transgénicos que expresan un BCR que reconoce factor reumatoideo humano, la presencia del antígeno (región Fc de IgG humana expresada transgénicamente) conduce a un incremento en el desarrollo de la ZM, así como a un aumento en la secreción de anticuerpos naturales, confirmando que la presencia del antígeno durante el desarrollo enriquece las poblaciones de linfocitos B1 y de ZM (Julien et al., 2002).

Como resultado de la selección positiva, la ZM se enriquece en clones con especificidades determinadas, muchas de las cuales se ha determinado que corresponden a antígenos propios (Lopes-Carvalho et al., 2004). De forma notable, en muchos casos los auto-anticuerpos producidos por estos clones presentan reacción cruzada con epitopes presentes en patógenos (Kearney et al., 2005; Shaw et al., 2000).

#### *4.2.3.3 Características funcionales de los linfocitos B de la zona marginal*

##### *a) Activación y co-estimulación*

Al ser estimulados con un activador policlonal como el LPS o con su antígeno específico, los LB de ZM proliferan y se diferencian a plasmablastos más rápidamente que los linfocitos B2 (Martin et al., 2000; Oliver et al., 1999). Esta característica funcional podría deberse al fenotipo parcialmente activado de estas células, el cual está dado por los elevados niveles de expresión del regulador transcripcional de la diferenciación de células plasmáticas, Blimp-1 (Martin et al., 2000).

En experimentos realizados *in vitro*, se observó que la estimulación de los LB de la ZM con anticuerpos dirigidos contra la IgM de superficie no resultaba suficiente para inducir la proliferación de estas células (Oliver et al., 1997). Por lo tanto, la necesidad de co-señales para inducir una respuesta TI en la ZM ha sido postulada. Estas señales podrían estar dadas por la activación de TLRs presentes en los linfocitos B. En este sentido, ha sido descrito que linfocitos B aislados de ratones con lupus responden a la estimulación con oligonucleótidos que contienen motivos CpG. La respuesta de estos linfocitos B consiste en la producción de IL-10, la secreción policlonal de anticuerpos y el aumento en la expresión de las moléculas CD25 y CD86. El fenotipo de las células que responden a la estimulación es típico de LB de la ZM, determinado por la alta expresión de CD21 y baja expresión de CD23 (Brummel et al., 2005). Alternativamente, una población de CDs sanguíneas podría constituir otra fuente de co-estimulación para los LB de ZM. Células dendríticas inmaduras presentes en la sangre, luego de interactuar con



linfocitos B de la ZM, inducen la diferenciación de éstos hacia plasmablastos. Además, estimulan la supervivencia de estos plasmablastos en el corto plazo. En este caso, la co-estimulación es mediada por la secreción de BAFF y APRIL (Balazs et al., 2002), dos factores estimuladores de la funcionalidad de linfocitos B.

#### *b) Participación en respuestas timo-independientes*

Los linfocitos B de la ZM cumplen un papel de suma importancia en la respuesta contra *Streptococcus pneumoniae*, así como contra bacterias de otros géneros que se distribuyen por sangre.

Luego de la inoculación endovenosa, las bacterias circulantes son captadas en la ZM por los MZM. La importancia crucial de los MZM en la captación de los microorganismos ha sido evidenciada en experimentos en los que, luego de la eliminación selectiva de estos macrófagos, se observó un considerable aumento de la concentración de bacterias en sangre, así como en la diseminación hematológica de las mismas hacia órganos periféricos (Aichele et al., 2003). Además de esta importante función de filtro, la captación de bacterias por los MZM permite el reconocimiento de estos antígenos por los LB de la ZM específicos que se activan y dan comienzo al desarrollo de una rápida respuesta extra-folicular (Martin et al., 2000).

La importancia de los linfocitos B de la ZM en el desarrollo de respuestas TI ha sido también establecida mediante experimentos en los que se utilizaron ratones *Pyk2<sup>-/-</sup>*, que carecen de los mismos. Estos ratones responden defectivamente a la inmunización con TNP-Ficolil y TNP-LPS, dos antígenos TI (Guinamard et al., 2000). Asimismo, ratones *NF- $\kappa$ B p50<sup>-/-</sup>*, otra cepa con defectos en el desarrollo de LB de la ZM, presentan susceptibilidad aumentada luego del desafío con *Streptococcus pneumoniae* (Cariappa et al., 2000). El conjunto de estos experimentos que le otorgan una importancia fundamental a los LB ZM en las respuestas TI está en concordancia con reportes que indican que individuos esplenectomizados tienen mayor susceptibilidad a infecciones con bacterias capsuladas (Amlot et al., 1985; Likhite et al., 1976; Holdsworth et al., 1991). Asimismo, la imposibilidad de los individuos recién nacidos de

generar respuestas TI hasta alrededor de los 2 años en humanos y las 2-3 semanas en ratones coincide con la edad de maduración de la ZM en estas especies (Cowan et al., 1978; Totapally et al., 1998). Por lo tanto, la mayor susceptibilidad de individuos esplenectomizados y recién nacidos a las infecciones bacterianas de diseminación hematógena se debería a la ausencia de la zona marginal.

En el caso de las infecciones virales, también ha sido demostrado que ratones esplenectomizados producen una respuesta humoral defectiva. Por ejemplo, luego de la infección con el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), ratones esplenectomizados producen una respuesta de anticuerpos neutralizantes retrasada, en comparación con los ratones controles infectados. Además, la esplenectomía provoca que la respuesta temprana contra el virus, que se desarrolla normalmente en forma TI, se convierta en TD (Ochsenbein et al., 2000). La importancia de la zona marginal en esta infección ha sido evidenciada por experimentos que demuestran que el VSV es rápidamente atrapado y concentrado en la ZM (Ochsenbein et al., 2000, Bachmann et al., 1996) en un proceso que es dependiente del complemento (Ochsenbein et al., 1999). Ha sido postulado que el complemento permitiría la interacción del VSV con los receptores para el componente C3b1 del complemento (CR3 o CR4) expresados en los MZM, lo que luego posibilitaría la estimulación de los LB ZM para que los mismos secreten rápidamente anticuerpos TI (Ochsenbein et al., 1999).

La respuesta de LB de la ZM contra partículas semejantes a virus (VLPs) ha sido recientemente estudiada. Luego de la inoculación endovenosa (ev) de este antígeno, los linfocitos B de la ZM proliferan rápidamente y secretan IgM e IgG específicas en forma TI (Gatto et al., 2004).

## **5. Células dendríticas y su función en la inducción de respuestas anti-virales**

Los antígenos TI clásicos, tales como los carbohidratos bacterianos purificados o los polímeros sintéticos, carecen de epitopes capaces de ser reconocidos por los linfocitos T. Por el contrario, muchos virus citopáticos

presentan la interesante particularidad de que, a pesar de comportarse como antígenos TI, son antígenos de naturaleza proteica. Por lo tanto, la respuesta inmune contra los virus presenta un componente TD que podría interactuar y modular al componente TI. Las células dendríticas cumplen un importante papel en esta interacción, el cual reside en su capacidad de activar y modular tanto las respuestas de linfocitos T, así como la de los linfocitos B (Steinman et al., 2003; Jego et al., 2005).

Las células dendríticas constituyen un grupo heterogéneo de células que se clasifican en CDs convencionales (CDs) y CDs plasmacitoides (CDp) (Tabla 2) (Ardavin et al., 2003; Shortman et al., 2002).

Las CDs convencionales, incluyen un grupo que actúa como células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales y, por lo tanto, son las encargadas de iniciar las respuestas adaptativas en los órganos linfáticos secundarios. Por otro lado, hay otro grupo de CDs convencionales que, en lugar de inducir inmunidad, participan en la inducción de tolerancia periférica. Las CDp, por su parte, tienen una importante función en el desarrollo de la respuesta inmune innata, ya que son las células con mayor capacidad de secretar IFN de tipo 1 en las respuestas tempranas a las infecciones virales (Asselin-Paturel et al., 2001).

### *5.1 Células dendríticas inmaduras y maduras*

Las células dendríticas (CDs), en su estado inmaduro, se encuentran distribuidas en la mayoría de los tejidos periféricos, principalmente en la piel y en las mucosas, donde constantemente evalúan la presencia de antígenos a través de la emisión de dendritas. Estas células se caracterizan por su alta capacidad endocítica, la que les permite internalizar antígenos presentes en el medio. Los mecanismos de reconocimiento e internalización de antígenos utilizados por las CDs comprenden la fagocitosis, la macropinocitosis y la endocitosis mediada por receptores. En este último mecanismo intervienen, entre otros, los receptores para el Fc de las inmunoglobulinas, los receptores del complemento, receptores para proteínas de choque térmico, receptores scavenger y receptores de la familia de lectinas tipo C. A pesar de la alta

capacidad endocítica de las CDs inmaduras, su capacidad de procesar y presentar antígenos es pequeña. Fenotípicamente, estas células se caracterizan por la baja expresión en la superficie celular de las moléculas CD80, CD86, CD40 y CMH de clase II. Sin embargo, poseen altos niveles de moléculas del CMH de clase II en localización intracelular.

Muchas moléculas, al interactuar con las CDs inmaduras, inducen en ellas una serie de cambios fisiológicos que en conjunto se denominan maduración. Los estímulos que inducen la maduración de las CDs son de diferente naturaleza.

- Compuestos microbianos: Muchos componentes de los microorganismos actúan sobre diferentes TLRs para inducir maduración. Por ejemplo, ARN viral de doble cadena reconocido por TLR3, ADN viral o bacteriano con motivos CpG reconocidos por TLR9, así como ARN viral de simple cadena reconocido por TLR7, son estímulos para la maduración.
- Algunas citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e interferones de tipo I también inducen maduración.
- La señalización por CD40, luego de la interacción con CD40L presente en linfocitos T activados (Caux et al., 1994; Cella et al., 1997), induce maduración a la vez que los linfocitos T reconocen su antígeno específico en la superficie de las CDs.
- Señales liberadas por células en condiciones de estrés, que serían reconocidas por las CDs a través de TLRs (Vabulas et al., 2002; Vabulas et al., 2002) o de CD40 (Becker et al., 2002) también inducen maduración de las CDs.

Como resultado del proceso de maduración, las CDs aumentan la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80, CD86 y las moléculas CMH de clase I y II, hecho que las vuelve excelentes presentadoras del antígeno específico a los linfocitos T vírgenes. Asimismo, coordinadamente se produce una serie de cambios en el citoesqueleto, en la expresión de integrinas y en la expresión de receptores de quimioquinas, que inducen la migración de las células hacia los órganos linfáticos secundarios (Randolph et al., 2005).

En los órganos linfáticos secundarios es donde se produce la presentación de antígenos, comenzando de esta forma el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa. Por lo tanto, una de las funciones centrales de las CD4 es la de actuar como nexo entre los tejidos periféricos y los órganos linfáticos secundarios, mediante el transporte de antígeno. Sin embargo, otro componente importante de dicha conexión consiste en la capacidad de las CD4 de recibir y transmitir información sobre la naturaleza del patógeno y del estado en que se encuentran los tejidos infectados (Paul et al., 2003). Estas características les permiten a las CD4 no sólo iniciar una respuesta inmune adaptativa, sino que además posibilitan que estas células modulen el tipo de respuesta inducida (Guermonprez et al., 2002).

### 5.2 Modulación de la respuesta inmune adaptativa por células dendríticas

Las CD4 cumplen un papel determinante en la modulación del tipo de respuesta inmune adaptativa. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar esta habilidad de las CD4. En primer lugar, diferentes tipos de CD4 pueden inducir diferentes respuestas. La polarización de la respuesta estaría relacionada con el perfil de citoquinas secretadas predominantemente por las mismas. La inducción de respuestas Th1 por CD4 mieloides se debe a la habilidad de este grupo de secretar IL-12, mientras que la falta de secreción de esta citoquina explicaría el desarrollo de respuestas Th2 por éstas (Steinman, 2003; Liu et al., 2001). Sin embargo, la polarización de la respuesta inducida por las CD4 es, a su vez, influenciada y modificada por señales provenientes de otras células, así como por señales provenientes de los microorganismos que determinan los TLRs que se activarán en el momento del reconocimiento antigénico (Liu et al., 2001). A modo de ejemplo, *Candida albicans* en estado de levadura, cuando es incubada con CD4, induce la secreción de IL-12 y el desarrollo de respuestas Th1, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, en el estado de hifa, induce la secreción de IL-4 por linfocitos T (d'Ostiani et al., 2000). Por último, señales específicas de los tejidos donde residen las CD4 también podrían participar en la diferenciación fenotípica de las mismas y por lo tanto, en el tipo de respuesta que inducen. Mientras que CD4 aisladas de

placas de Peyer o de pulmón producen IL-4 e IL-10, y por lo tanto, inducen preferentemente una respuesta Th2, CDs aisladas de bazo inducen preferentemente una respuesta Th1 (Iwasaki et al., 1999, Stumbles et al., 1998).

### *5.3 Inducción de tolerancia y de linfocitos T reguladores por células dendríticas*

Como ha sido mencionado anteriormente, la activación de las CDs induce su migración por vasos linfáticos desde los tejidos hacia los órganos linfáticos secundarios. Sin embargo, las CDs también pueden migrar en estado inmaduro. La ausencia de señales co-estimuladoras en estos casos induce tolerancia periférica al provocar un estado de falta de respuesta en los linfocitos T estimulados (Hawiger D et al., 2001; Bonifaz et al., 2002). Por ejemplo, ha sido demostrado que la internalización de cuerpos apoptóticos no induce maduración de las CDs. Sin embargo, aumentan la expresión de CCR7 (receptor de quimioquinas que induce la migración a las zonas T de los órganos linfáticos secundarios). Por lo tanto, este mecanismo permitiría la inducción de tolerancia contra antígenos propios provenientes de células que mueren por muerte programada (Bonifaz et al., 2002, Verbovetski et al 2002). Otro mecanismo por el que las CDs inmaduras contribuyen al estado de tolerancia es mediante la inducción de linfocitos T reguladores. La estimulación de linfocitos T CD4+ con CDs alogeneicas inmaduras induce producción de IL-10 y disminución de la proliferación de los linfocitos (Jonuleit et al., 2000). Por lo tanto, ha sido propuesto que en condiciones fisiológicas, las CDs inmaduras constantemente inducirían tolerancia contra antígenos propios. Por el contrario, luego de una infección que induce maduración, si bien las CDs presentarán a los linfocitos T antígenos microbianos, así como antígenos propios, el sistema inmune sólo responderá contra los antígenos del microbio ya que los clones que reconocen proteínas propias han sido previamente silenciados o eliminados (Steinman 2003).

Además de inducir un estado de tolerancia contra antígenos propios, las CDs inmaduras cumplen un importante papel en la inducción de linfocitos T regulatorios (TR1), productores de IL-10, contra antígenos microbianos. La

inducción de linfocitos Tr1 ha sido descrita luego de infecciones bacterianas, virales y parasitarias, tales como las causadas por *Bordetella pertussis*, HCV y *Onchocerca volvulus* (McGuirk et al., 2002; MacDonald et al., 2002; Satoguina et al., 2002). La regulación ejercida por linfocitos TR1 está mediada por la secreción de IL-10, y en algunos casos también de TGF- $\beta$ . Estas citoquinas, al actuar sobre las CDs, disminuyen la expresión de las moléculas del CMH así como la de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86. Asimismo, IL-10 disminuye la secreción de IL-12 y de TNF- $\alpha$  (Moore et al., 2001). Por lo tanto, durante el desarrollo de las respuestas contra estos patógenos, la inducción de linfocitos Th1, Th2 y T citotóxicos se encuentra inhibida. La función ejercida por los linfocitos TR sería importante porque controlan el daño inmunopatológico al que se ven sometidos los tejidos del huésped durante el desarrollo de la respuesta inmune contra antígenos microbianos (Mills et al., 2004).

#### *5.4 Procesamiento y presentación antigénica*

Como se mencionó anteriormente, las CDs maduras al llegar a las áreas T de los órganos linfáticos secundarios, presentan el antígeno a los linfocitos vírgenes T CD8+ y T CD4+ específicos.

##### *5.4.1 Presentación en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase I*

El procesamiento de antígenos para ser presentados a linfocitos TCD8+ vírgenes en el contexto de CMH clase I se realiza en las CDs, como en la mayoría de las células nucleadas del organismo, mediante la vía biosintética. Brevemente, proteínas recientemente sintetizadas, luego de ser marcadas con ubiquitina, son degradadas por el proteosoma, generando péptidos antigénicos. Éstos, posteriormente, son conducidos mediante transportadores TAP al interior del retículo endoplásmico, en donde se produce la interacción con moléculas de CMH clase I que están siendo activamente sintetizadas. Los complejos moléculas de CMH clase I/péptidos son luego transferidos al aparato de Golgi y desde allí a la membrana plasmática.

Las CD4 poseen además la posibilidad de presentar péptidos derivados de proteínas localizadas en el espacio extracelular en el contexto de moléculas del CMH de clase I. Este fenómeno ha sido denominado presentación cruzada. La importancia de este mecanismo en el desarrollo de respuestas anti-virales radica en la posibilidad de presentar péptidos provenientes de virus que no infectan a las CD4 en el contexto de MHC clase I, y de esta manera permitir la estimulación de linfocitos T citotóxicos por estas células presentadoras. En efecto, la presentación cruzada de antígenos virales ha sido evidenciada luego de la fagocitosis, por parte de CD4, de otras células infectadas, ya sea luego de que el virus indujo apoptosis, o incluso luego de la fagocitosis de células viables infectadas (Subklewe et al., 2001; Albert et al., 1998, Maranon et al., 2004; Bosnjak et al., 2005; Harshyne et al., 2001). La presentación cruzada es también importante en la presentación en el contexto de moléculas de clase I de péptidos derivados de células tumorales (Russo et al., 2000).

#### *5.4.2 Presentación en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase II*

Otra de las funciones fundamentales de las CD4 es la de presentar péptidos antigénicos a los linfocitos TCD4+. El procesamiento de antígenos para su presentación en el contexto de moléculas de CMH clase II se realiza, en las CD4 al igual que otras células presentadoras (macrófagos y linfocitos B), por la vía endocítica. Los antígenos son internalizados en vesículas endocíticas, en las cuales, al disminuir el pH en su interior, se activan diversas proteasas ácidas. Estas enzimas degradan a los antígenos en péptidos. El ambiente ácido de las vesículas también permite que las moléculas de CMH clase II que provienen del aparato de Golgi se vuelvan competentes para unir a los péptidos. La activación de las proteasas ácidas produce la degradación de la cadena li, la cual hasta entonces ocupaba la hendidura de unión a péptidos presente en las moléculas de CMH de clase II. Por lo tanto, ésta podrá entonces ser ocupada por el péptido. Una vez cargadas con los péptidos, las moléculas son transportadas a la superficie celular (Guermonprez et al., 2002).



## **6. Interacción entre células dendríticas y virus**

### *6.1. Reconocimiento de la infección y respuesta innata mediada por células dendríticas*

Virus pertenecientes a diferentes familias tienen la capacidad de infectar CD, induciendo importantes modificaciones en su funcionalidad y, por lo tanto, modulando el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Asimismo, debido a la constante evaluación del medioambiente tisular en que residen, y gracias a su dotación de PRRs, las CD pueden iniciar el desarrollo de respuestas contra virus que no las infectan directamente, sino que infectan otras células del tejido donde ellas residen.

En los casos de la infección directa de las CD, el ingreso de los virus en las mismas se produce habitualmente luego de la interacción con receptores específicos ubicados en la superficie de las células. Los receptores utilizados con este fin por varios virus, han sido identificados en las CD. Por ejemplo, en CD localizadas en la piel, el VIH interactúa con el receptor de lectinas de tipo C, (Turville et al., 2002). En cambio, en otras poblaciones de CD, este virus interactúa con la moléculas DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2003). Esta misma molécula actúa también como receptor en CD de los virus del dengue (Tassaneeritthep et al., 2003) y del sarampión (de Witte et al., 2006). Por último, coronavirus murino infecta CD mediante la interacción con el receptor murino para coronavirus, CEACAM1 (Turner et al., 2004)

Una vez producido el ingreso del virus en las CD, la infección puede proseguir a través de un curso productivo o abortivo. En el curso productivo, nuevos viriones infecciosos son producidos, indicando que el ciclo de replicación viral se ha desarrollado en forma completa. Por el contrario, en la infección abortiva, el ciclo viral se interrumpe en algún paso previo al de la liberación de viriones capaces de infectar otras células. Infecciones productivas de CD han sido reportadas para varios virus, entre ellos VIH (Pope et al., 1994; Granelli-Piperno et al., 1998), sarampión (Server Delprat et al., 2000), varicella (Morrow et al., 2003), virus herpes simplex (Mikloska et al., 2001), vaccinia en CD inmaduras (Engelmayer et al., 1999), influenza (Bender et al.,

1998) y parainfluenza (Plotnicky-Gilquin et al., 2001). Sin embargo, en muchos de estos casos, la replicación viral ocurre a una tasa controlada, menor a la observada en otras células susceptibles. Este hecho ha sido vinculado con el efecto de los interferones de tipo 1 secretado por las mismas CDs (Ludewig et al., 2000; Ghanekar et al., 1996; Cella et al., 1999). Infecciones no productivas han sido reportadas para los virus papilomavirus humano (Matthews et al., 2003), herpesvirus humano tipo-8 (Larcher et al., 2005), Vaccinia en CDs maduras (Engelmayer et al., 1999) y circovirus porcino (Vincent et al., 2003).

Durante el desarrollo de las infecciones, tanto los ácidos nucleicos virales, las glicoproteínas presentes en algunos virus, así como señales liberadas por células infectadas, pueden ser reconocidos por PRRs localizados en las CDs. Los receptores involucrados en el reconocimiento de estos marcadores virales incluyen a miembros de la familia de los TLRs y a receptores citoplasmáticos que reconocen ARN doble cadena (las ARN helicasas RIG-I y MDA-5), entre otros. Es interesante remarcar que CDs mieloides y plasmacitoides expresan diferentes grupos de TLRs, lo que determina que estas células responden diferencialmente a distintas moléculas generadas durante la infección.

La señalización por los TLRs produce como resultado la secreción de interferones de tipo 1, así como el comienzo de la maduración de las CDs (Doyle et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). Sin embargo, existen mecanismos virales capaces de interferir con la señalización a través de los TLRs (Diebold et al., 2003). Por lo tanto, mientras que algunos compuestos virales purificados pueden inducir activación y maduración de las CDs a través de la señalización de un TLR determinado, el resultado de la infección con el virus puede ser diferente al de sus componentes aislados. A modo de ejemplo, mientras que el ARN de doble cadena viral purificado puede estimular la producción de IFN- $\alpha$  en CDs no plasmacitoides, luego de la infección con influenza estas células secretan muy bajos niveles de interferón, a pesar de que la replicación viral procede normalmente. Ha sido demostrado que la proteína NS1 del virus secuestra al ARN en el citoplasma, y por lo tanto evita el reconocimiento de éste por los PRRs presentes en las células. Por el contrario, la infección con un

virus de influenza al que genéticamente se le eliminó la proteína NS1 del genoma induce altos niveles de interferón (Diebold et al., 2003).

La producción de interferones tipo 1 por las células dendríticas plasmacitoides supera considerablemente a la de las células mieloides. En efecto, las CD plasmacitoides son las principales células responsables de las respuestas de interferón sistémicas luego de las infecciones virales (Colonna et al., 2002). Además de secretar altas cantidades de interferón de tipo 1, el espectro de los genes de interferón expresados en CD plasmacitoides es más amplio que en CD mieloides convencionales (Izaguirre et al., 2003).

Otra de las funciones innatas de las CD consiste en el reclutamiento de otras células efectoras de la inmunidad innata a los tejidos infectados. CD inmaduras, cuando son expuestas a un estímulo maduratorio, secretan quimioquinas proinflamatorias, lo que originaría el reclutamiento de macrófagos, granulocitos y linfocitos T (Sallusto et al., 1999). Asimismo, a través del reclutamiento mediado por quimioquinas, la activación mediada por citoquinas y la activación dependiente de contacto, las CD infectadas cumplen un importante papel en la rápida activación de células NK (Gerosa et al., 2002; Ferlazzo et al., 2002).

## *6.2. Respuesta inmune adaptativa contra virus. Inicio y modulación de la funcionalidad de las células dendríticas por infecciones virales.*

La inducción de una respuesta inmune adaptativa contra virus es otra de las funciones centrales de las CD. Evolutivamente, los virus han desarrollado gran cantidad de mecanismos para modular la funcionalidad de las CD, y de esta forma interferir en el tipo de respuesta a desarrollarse.

La infección viral de CD conduce, en algunas situaciones, a un aumento de su capacidad para estimular linfocitos T. Por ejemplo, luego de la infección con hantavirus, se observa aumento en la expresión de moléculas del CMH, así como un incremento en la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias. La infección de CD con influenza también puede, en algunas condiciones, producir maduración de las CD. En este sentido, la infección de CD con bajas dosis de influenza aumenta la capacidad estimuladora de las

mismas e induce una respuesta con perfil Th1 en los linfocitos estimulados. Sin embargo, la infección con altas dosis produce resultados opuestos. En este último caso, la capacidad de las CDs infectadas de estimular respuestas alorreactivas disminuye. Asimismo, el perfil de la respuesta inducida también se modifica, polarizándose en este caso hacia un perfil Th2 con secreción de IL-4 e IL-10.

A excepción de los dos ejemplos citados en el párrafo precedente (hantavirus e influenza), el resto de las infecciones virales estudiadas conduce a una disminución en la capacidad de las CDs para activar linfocitos T (Pollara et al., 2004). Los mecanismos involucrados en producir dicho efecto son variados:

- En primer lugar, se puede citar la **disminución de la expresión de moléculas presentadoras y co-estimuladoras en la superficie de las CDs infectadas**, así como de la secreción de citoquinas con actividad pro-inflamatoria. Estos efectos han sido descritos en las infecciones con herpes simplex tipo 1 (Salio et al., 1999), citomegalovirus humano (Moutaftsi et al., 2002), ebola (Mahanty et al., 2003), virus de la fiebre de lassa (Mahanty et al., 2003), hepatitis C (Kanto et al., 1999) y vaccinia (Engelmayer et al., 1999). Asimismo, las CDs de pacientes en etapa aguda de la infección con HIV también tienen disminuída la expresión de CD80 y CD86 (Lore et al., 2002).
- Otro mecanismo que ha sido involucrado en la interferencia con la capacidad de las CDs infectadas para estimular linfocitos T efectores consiste en la **expresión en la superficie de las CDs de proteínas virales que impiden su interacción con linfocitos T**. Por ejemplo, durante la infección con el virus del sarampión, la expresión de las glicoproteínas H y F en la superficie de las CDs inhibe la activación de los linfocitos T, a través de un mecanismo que requiere contacto célula-célula (Dubois et al., 2001).
- Otros virus, luego de infectar a las CDs, **modulan el perfil de la respuesta inducida por las CDs**. En muchos casos, los virus interfieren con la producción temprana de IL-12 por parte de CDs y, por lo tanto, con la capacidad de inducir una respuesta Th1 protectora. Por ejemplo,

HSV-1 o HCMV inhiben específicamente la secreción de IL-12, mientras que la secreción de otras citoquinas, tales como IFN- $\alpha$  o TNF- $\alpha$  permanece inalterada (Salio et al., 1999, Moufatsi et al., 2002). La infección de CDs con RSV también impide el desarrollo de linfocitos Th1 productores de IFN- $\gamma$  en cocultivos. Sin embargo, en este caso el efecto no es exclusivo sobre IL-12, sino que además está acompañado de la inhibición de secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Bartz et al., 2003). Por otro lado, infecciones virales pueden alterar el perfil de citoquinas y el tipo de respuesta mediante la inducción de citoquinas supresoras o antiinflamatorias. A modo de ejemplo, la infección de CD con HIV o HCV induce linfocitos T reguladores, los cuales interfieren con la generación de una respuesta T contra estos virus (Granelli-Piperno et al., 2004; MacDonald et al., 2002).

- La **inducción de apoptosis en las CDs infectadas** es otra forma de impedir la activación de linfocitos T. Los virus vaccinia, herpes simplex tipo 1, RSV y el virus de influenza inducen apoptosis de CDs infectadas (Engelmayer et al., 1999; Pollara et al., 2003; Bartz et al., 2003; Cella et al., 1999).
- Por último, otros virus, a pesar de no alterar la expresión de las moléculas presentadoras o co-estimuladoras, ni de inducir citoquinas anti-inflamatorias, **inducen depresión de la funcionalidad de las CDs por mecanismos no dilucidados**. Tal es el caso de la infección de CDs con el virus de parainfluenza (Plotnicky-Gilquin et al., 2001)

### *6.3 Estimulación de linfocitos B y de la secreción de anticuerpos antivirales por las células dendríticas.*

La estimulación de linfocitos B y la inducción de anticuerpos antivirales específicos es otra función de las CDs que reviste gran importancia en el control de las infecciones. En este sentido, ha sido demostrado que las CDs, luego de su interacción en forma directa con los linfocitos B, pueden inducir cambio de isotipo, diferenciación a células plasmáticas y secreción de anticuerpos (Fayette et al., 1998). La estimulación de linfocitos B por CDs da

como resultado la producción de anticuerpos, tanto contra antígenos timo-dependientes, como contra antígenos timo-independientes (Wykes et al., 1998; Dubois et al., 1999; Colino et al., 2002; Balazs et al., 2002). Asimismo, las CD4 han sido involucradas en la rápida inducción de anticuerpos neutralizantes contra virus citopáticos. Por ejemplo, luego de la infección con VSV, las CD4 transportan y liberan virus en órganos linfáticos secundarios, permitiendo la activación de los linfocitos B específicos y la producción de IgM en forma timo-independiente (Ludewig et al., 2000). Asimismo, luego de la infección de CD4 con el virus de la influenza, estas células promueven la diferenciación de linfocitos B activados por CD40, hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos. La estimulación depende de la secreción por parte de las pDCs de IFN- $\alpha$  e IL-6, las cuales actúan secuencialmente. El IFN- $\alpha$  induce la diferenciación a plasmablastos no secretores. Subsecuentemente, la IL-6 induce la diferenciación a células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas, facilitando de esta manera la producción de anticuerpos antivirales (Jego et al., 2003).

## **7. Respuesta inmune en el modelo murino de infección con el Virus de la Fiebre Aftosa. Comparación con la respuesta inducida por la vacunación**

Los ratones adultos no son susceptibles a la infección natural con el VFA. Sin embargo, experimentalmente es posible infectar ratones de las cepas CH3, Swiss, BALB/c y nude por inoculación intraperitoneal de VFA de serotipos O ó A (Fernandez et al., 1986, Collen et al., 1989). En estos casos, a pesar de la importante replicación viral en el páncreas, la enfermedad cursa en forma subclínica. Durante las primeras 48-72 hs. de la infección, se produce una viremia de alto título ( $\sim 10^5$ - $10^6$  DLRL<sub>50</sub>/ml), la cual es rápidamente controlada por anticuerpos neutralizantes (Fernandez et al., 1986). Ante la imposibilidad de producir anticuerpos neutralizantes, como sucede luego del tratamiento inmunosupresor con ciclofosfamida, los ratones infectados con VFA presentan una viremia persistente que indica el papel central desempeñado por el sistema inmune adaptativo en el control de esta infección (Borca et al., 1986).

Una vez superada la fase aguda de la infección, los títulos séricos de anticuerpos neutralizantes se mantienen elevados por largos períodos (Lopez et al., 1990). Por el contrario, la duración de la inmunidad luego de la vacunación con VFA inactivado depende de la dosis de antígeno utilizada y de la formulación de la vacuna. La inmunización con 0.1 ug de VFA en PBS induce una respuesta neutralizante protectora pero de corta duración, en la que los títulos de anticuerpos neutralizantes comienzan a disminuir a partir de los 60 días post-vacunación. En efecto, luego de transcurridos tres meses desde el momento de la vacunación, el nivel de anticuerpos en el suero de estos animales ya no es suficiente para controlar la viremia, y los ratones vuelven a ser susceptibles a la infección. Contrariamente, si la inmunización se realiza con 10 ug de VFA en PBS o con 0.1 ug de VFA en una emulsión de agua en aceite, se induce una respuesta de duración prolongada (Lopez et al., 1990; Piatti et al., 1991).

Las respuestas humorales contra VFA infeccioso o inactivado no sólo presentan diferencias en la duración de la inmunidad generada, sino que además difieren en el grado de dependencia de colaboración de los linfocitos T requerida para inducir la producción de anticuerpos. Mientras que el virus infeccioso se comporta como un antígeno TD, el virus inactivado inoculado a bajas dosis (0.1 ug) se comporta como un típico antígeno timo dependiente, requiriendo de colaboración T para inducir anticuerpos (Piatti et al., 1991). En experimentos de transferencia adoptiva de linfocitos a receptores vírgenes irradiados y luego infectados, se observó que la transferencia de linfocitos B provenientes de dadores infectados (los linfocitos fueron obtenidos a los 8 días post-infección) rápidamente generaba una respuesta neutralizante. Por el contrario, la transferencia de linfocitos B provenientes de dadores vacunados con 0.1 ug de VFA era incapaz de generar una respuesta de anticuerpos neutralizantes. En cambio, si conjuntamente con los linfocitos B provenientes de animales inmunizados se transferían linfocitos T, la respuesta era inducida. En este caso, el mecanismo de eliminación del virus continuaba siendo mediado por linfocitos B, ya que la transferencia de linfocitos T exclusivamente no transfería inmunidad. Por lo tanto, en el caso de la inmunización con virus inactivado, la inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes

requiere colaboración T. Por el contrario, la respuesta generada luego de la infección no precisa de linfocitos T para ser inducida (Piatti et al., 1991).

Las diferencias cualitativas en el tipo de respuesta desencadenada por el virus infeccioso e inactivado también pueden ser evidenciadas por el perfil de isotipos que se produce en cada caso. En ratones infectados, a partir de los siete días posteriores a la infección es posible detectar en suero, además de la IgM neutralizante producida ya desde el tercer día post-infección, a los subisotipos IgG1 e IgG3. Desde el día 14, IgG2a e IgG2b también comienzan a ser producidos, siendo IgG1 e IgG2b las subclases predominantes a partir del día 14 post-infección (Perez Filgueira et al., 1995). Por el contrario, en ratones inoculados con vacunas convencionales (hidróxido de aluminio o emulsión de agua en aceite) IgG1 e IgG2a son las subclases que predominan, acompañados de bajos niveles de IgG2b. La subclase IgG3 no se detecta en animales vacunados (Perez Filgueira et al., 1995).

A pesar de que, como se indicó anteriormente, la producción temprana de anticuerpos anti-VFA puede ser inducida en ausencia de colaboración T, la misma resulta imprescindible para mantener altos títulos de anticuerpos a lo largo del tiempo. Por lo tanto, si bien la respuesta inmune temprana en ratones atímicos es de magnitud similar a la de los controles eutímicos, a partir del décimo día post-infección los títulos séricos de anticuerpos comienzan a descender en los ratones atímicos. Estas observaciones indican la imposibilidad de establecer memoria en ausencia de colaboración T. Asimismo, la duración de la persistencia de anticuerpos neutralizantes en suero se asocia con la presencia de células presentadoras de antígeno capaces de presentar péptidos en moléculas del MHC de clase II (Wigdorovitz et al., 1997), confirmando la necesidad de colaboración T para mantener altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

Recientemente ha sido descrito el desarrollo de una enfermedad aguda, clínicamente manifiesta, en ratones de las cepas Swiss, BALB/c y C57/BL6 infectados experimentalmente con VFA de serotipos C-S8c1 o SAT-1. La enfermedad se caracteriza clínicamente por apatía, pelo erizado, lomo encorvado y moderada pérdida de peso a las 24 hs post-infección. Subsiguientemente se observa sintomatología neurológica, manifestada



principalmente por el desarrollo de ataxia del tren posterior. La muerte ocurre 48-72 hs más tarde (Salguero et al., 2005). Microscópicamente, se detectan importantes alteraciones en el estrato espinoso de la piel de la almohadilla plantar. En un primer momento se observa degeneración de este estrato de la epidermis, seguido luego de edema intercelular y formación de microvesículas, localizadas fundamentalmente cerca de la membrana basal. Estas lesiones son características de la enfermedad causada por VFA en sus huéspedes naturales.

Durante la fase aguda de la infección con este serotipo, se observa una importante linfopenia, así como la eliminación de los linfocitos en los órganos linfoides. Tanto los linfocitos B como los TCD4+ y CD8+ están afectados, hecho que podría asociarse a un estado de inmunosupresión, tal como el que ha sido descrito en la etapa aguda de la infección con VFA en porcinos (Bautista et al., 2003). Los linfocitos B y T CD8+ provenientes de ratones infectados expresan proteínas no estructurales de VFA, lo cual indicaría que la replicación viral se realiza en estas células. Sin embargo, la expresión de estas proteínas no fue detectada en los linfocitos T CD4+, indicando que otro mecanismo no identificado estaría involucrado en la disminución de la cantidad de estos linfocitos en sangre y órganos linfoides de ratones infectados.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La hipótesis principal de este trabajo de tesis es:

**La activación del sistema inmune, luego de la infección con VFA, difiere cualitativamente de la activación inducida luego de la vacunación con el virus inactivado.**

Durante la etapa temprana de la infección con el VFA se producirían señales indicadoras de infección que condicionarían la inducción de un tipo de respuesta diferente de la respuesta inducida por el virus inactivado. Asimismo, las diferencias en la cinética de distribución del virus infeccioso e inactivado determinarían la participación de diferentes órganos linfáticos secundarios y diferentes sub-poblaciones de linfocitos involucradas en cada una de estas respuestas.

Con el objetivo de determinar las bases de las diferencias cualitativas de las respuestas tempranas inducidas por la infección o la vacunación, se plantearon los siguientes **objetivos generales**:

- Determinar la modulación de la funcionalidad de las CD4 por VFA infeccioso, en comparación con el VFA inactivado.
- Determinar la capacidad de las CD4 infectadas con VFA o incubadas con VFA inactivado, para estimular linfocitos T y linfocitos B.
- Determinar la subpoblación de linfocitos B involucrada en la respuesta inmune temprana contra VFA infeccioso e inactivado.

A su vez, con el propósito de cumplir con estos objetivos generales, fue necesario plantear los siguientes **objetivos particulares**:

- Determinar la susceptibilidad de las CD4 murinas a la infección con VFA.
- Determinar la viabilidad de las CD4 luego de la infección.
- Determinar las modificaciones producidas en el fenotipo de las CD4 infectadas, en comparación con el de las CD4 pulsadas con VFA inactivado.
- Determinar la capacidad de las CD4 infectadas o incubadas con virus inactivado de estimular linfocitos T, tanto *in vitro* como *in vivo*.
- Determinar el perfil de citoquinas inducido por la infección con el VFA o por el virus inactivado.
- Determinar la modulación del desarrollo de respuestas contra antígenos timo-dependientes y timo-independientes no relacionados en ratones infectados o vacunados.
- Determinar la capacidad de CD4 infectadas o incubadas con VFA inactivado para estimular linfocitos B a secretar anticuerpos específicos.
- Determinar las citoquinas involucradas en la estimulación de la producción de anticuerpos timo-independientes tempranos contra el VFA infeccioso e inactivado.
- Determinar la localización anatómica y subpoblaciones de los linfocitos B que participan en la respuesta inmune temprana contra VFA infeccioso.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *1. Ratones*

Se utilizaron ratones endocriados BALB/c machos provenientes de la colonia del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar. Asimismo, se utilizaron ratones C57BL/6 y ratones N:NIH(S)nude provenientes del bioterio de la Universidad de La Plata. Todos los animales utilizados tenían entre 8 y 12 semanas de edad.

### *2. Líneas celulares*

Para la amplificación del VFA y para los ensayos de seroneutralización se utilizó la línea susceptible BHK-21, fibroblastos provenientes de riñón de hamster neonato.

Para la obtención del GM-CSF recombinante se utilizó la línea NIH 3T3 establemente transfectada con este factor de crecimiento.

### *3. Crecimiento de la línea NIH 3T3 y recolección de sobrenadante de cultivo conteniendo GM-CSF murino.*

La línea NIH 3T3 fue crecida en medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), suplementado con 10% de SFB. A las 48 hs. de ser descongeladas, las células transfectadas con el plásmido que codifica para el GM-CSF fueron seleccionadas mediante incubación durante 48 hs. con el antibiótico geneticina (400 ug/ml). Luego de la selección con el antibiótico, las células fueron lavadas y amplificadas. Para la obtención del sobrenadante de cultivo enriquecido en GM-CSF, las células fueron crecidas durante una semana sin cambio de medio de cultivo, y cuando comenzó a detectarse muerte celular, se recolectó sobrenadante libre de células. El mismo fue conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### *4. Producción de células dendríticas derivadas de médula ósea*

Las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones fueron obtenidas como ha sido previamente descrito (Inaba et al., 1992), con algunas modificaciones menores. Las epífisis de los huesos fémur y tibia fueron cortadas y las médulas fueron extraídas mediante lavado con medio RPMI 1640. Los eritrocitos fueron lisados utilizando cloruro de amonio al 0.083%. Luego de lavar las células, las mismas fueron resuspendidas a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino,  $5.5 \times 10^{-5}$  mercaptoetanol (Sigma Aldrich) y 30% de medio condicionado proveniente del sobrenadante del cultivo de células NIH 3T3 productoras del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF). Las células provenientes de la médula ósea se cultivaron durante 9 días, realizando cambios de medio cada 48 hs. Al noveno día de cultivo, más del 85% de las células recolectadas expresaba moléculas de MHC de clase II, CD40, CD86 y CD11c, pero no expresaba Gr-1.

#### *5. Virus, infección y estimulación con LPS de las células dendríticas*

El VFA serotipo O1 Campos (O1C), gentilmente provisto por el Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agropecuaria, fue utilizado en los experimentos de esta tesis. Este virus proviene de vesículas de bovinos infectados con VFA y ha sido amplificado una única vez sobre la línea celular susceptible BHK-21.

La infección de las CDs con el VFA fue realizada a una multiplicidad de infección (moi; cantidad de partículas infecciosas por célula) de 10 durante 4 horas a 37°C.

El VFA no-infeccioso (UV-VFA) fue preparado mediante irradiación de la suspensión viral con luz ultravioleta. La suspensión de VFA fue colocada en una placa de petri (profundidad < 5mm) y posteriormente fue irradiado durante 7 minutos, con leve agitación cada 2 minutos, bajo una lámpara de luz ultravioleta de 8-W colocada a 10 cm. de la suspensión viral. Este tratamiento produjo virus que resultó no infeccioso cuando fue titulado sobre la línea celular

BHK-21, la cual es altamente susceptible a la infección con VFA. Para la captación de virus inactivado, las CDs fueron incubadas con UV-VFA a una m.o.i. de 10 por 4 horas a 37°C.

Las CDs control (no infectadas) fueron incubadas con sobrenadante de cultivo de la línea celular BHK-21 por 4 horas a 37°C.

Luego de haber sido sometidas a cualquiera de los tres tratamientos mencionados, las CDs fueron lavadas dos veces con PBS pH 5.5 (incubación de 1 minuto), para inactivar al virus no internalizado. Seguidamente, se realizaron 6 lavados con medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino, con el objetivo de eliminar partículas virales no internalizadas.

En los experimentos en que se indica, las CDs control, cargadas con VFA inactivado o infectadas con VFA, fueron estimuladas por 48 hs. con 10 ug/ml de LPS proveniente de *E. coli* serotipo O55:B5 (Sigma) en medio RPMI adicionado con 10% de suero fetal bovino y  $5.5 \times 10^{-5}$  de 2-mercaptoetanol (RPMI completo). Luego de este tratamiento, las CDs fueron analizadas para determinar el nivel de expresión de las moléculas de MHC de clase II, CD40 y CD80 por citometría de flujo.

## *6. Infección y vacunación de ratones*

Los ratones fueron infectados o vacunados con  $10^5$  Dosis Infecciosas en Cultivo Tisular 50% (DITC50%) de VFA infeccioso o inactivado, respectivamente, por vía intraperitoneal (ip). Los ratones control (no infectados) fueron inoculados con sobrenadante de cultivo de células BHK-21 no infectadas. En donde se indica, los ratones fueron también vacunados con 1 ug de albúmina de huevo (OVA; Sigma) o 10 ug de Dextran 500 (Sigma) por vía ip.

## *7. RT-PCR para la detección de infección en las células dendríticas*

El ARN total fue extraído a partir de  $2 \times 10^6$  CDs infectadas o control (no infectadas), así como de células BHK-21, utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones que acompañan al mismo. La reacción de transcripción reversa (RT) se realizó utilizando 300 ng de ARN total.



Se utilizaron 50 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega) en un buffer conteniendo: 50 mM de Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM de KCl; 50 mM de MgCl<sub>2</sub> y 50 mM de dithiothreitol. Los primers utilizados para la síntesis de cDNA fueron FMDVRev (ACC ACT TCT GCG GGC GAG TC), el cual es un primer anti-sentido para la cadena positiva del ARN de VFA que aparece en las posiciones 3254-3273 del genoma de VFA. Alternativamente, se utilizó el primer FMDVFor1 (TTGAAGGAGGTAGGCAGCGTC), el cual es un primer anti-sentido para la cadena negativa del ARN de VFA que aparece en las posiciones 3724-3744 del genoma. La reacción de PCR fue realizada utilizando primer FMDVFor1 y FMDVRev para amplificar tanto la cadena positiva como la negativa. Se utilizó un equipo GeneAmp (Applied Biosystems), con un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1.5 minutos. Finalmente, se realizó un paso final de elongación a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por un transiluminador ultravioleta.

#### *8. Determinación de la viabilidad celular y de la apoptosis*

Los porcentajes de células viables y apoptóticas fueron determinados utilizando el kit de anexina V conjugada con FITC (Immunotech) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente,  $5 \times 10^5$  células fueron centrifugadas y resuspendidas en 250  $\mu$ l de buffer de unión, en presencia de 2  $\mu$ l de anexina V conjugada con FITC. Luego de una incubación de 10 minutos realizada sobre hielo, se agregaron 2.5  $\mu$ l de ioduro de propidio (PI), y las células fueron analizadas mediante citometría de flujo de dos colores (FACScan flow cytometer, BD), utilizando el software de análisis CellQuest.

Las células utilizadas como un control positivo de apoptosis fueron incubadas a 42°C durante 10 minutos y luego incubadas por 24 hs. adicionales a 37°C. Este procedimiento dio como resultado alta cantidad de células apoptóticas.

### *9. Análisis de la expresión de moléculas de superficie de las células dendríticas mediante citometría de flujo*

A fin de evaluar la expresión de moléculas en la superficie de las CDs, los siguientes anticuerpos conjugados a FITC fueron utilizados: anti-CD11c, anti-IA<sup>d</sup> (MHC clase II), anti-CD40, anti-CD86 y anti-CD11b (BD Pharmingen). Las suspensiones celulares ( $5 \times 10^5$  células) fueron incubadas con 1 ug de los anticuerpos indicados, diluidos en PBS a 4°C durante 30 minutos. Luego, las células fueron lavadas dos veces con PBS y finalmente resuspendidas en 400 ul de buffer Isoflow (Beckman). Los controles de isotipo se utilizaron como controles negativos de marcación específica.

El análisis fue realizado utilizando un citómetro FACScan y el software CellQuest (Becton Dickinson). Los resultados se expresan como la intensidad media de fluorescencia (IMF).

### *10. Análisis de la expresión de marcadores de superficie de linfocitos B mediante citometría de flujo*

La población de linfocitos B de ZM fue analizada según la expresión de las moléculas B220 y CD1d. Alternativamente, esta población de linfocitos B fue caracterizada según la expresión de las moléculas CD21 y CD23. La marcación y el análisis se realizaron tal como fue indicado en la sección anterior.

### *11. Ensayos de fagocitosis y endocitosis en células dendríticas*

Para cuantificar la actividad fagocítica de las CDs, éstas fueron incubadas con 10 ug/ml de zymosan conjugado con FITC (Zy-FITC) durante 1 hora a 37°C, en medio RPMI 1640. Para evaluar la capacidad de endocitosis, las células fueron incubadas con 100 ug/ml de OVA conjugada con FITC (OVA-FITC) durante 1 hora a 37°C en medio RPMI 1640. Luego de las incubaciones, las células fueron lavadas tres veces con PBS frío, y la internalización de Zy-FITC o de OVA-FITC fue evaluada por citometría de flujo. El nivel básico de

fluorescencia (células incubadas con OVA-FITC a 4°C, o Zy-FITC en presencia de citocalasina, un inhibidor de la fagocitosis) fue sustraído de los valores obtenidos. Los resultados obtenidos se expresan como valores de IMF.

#### *12. Cuantificación de la adherencia de las células dendríticas al plástico mediante la tinción con cristal violeta*

Las CDs infectadas o las CDs controles fueron colocadas en una microplaca de 96 pocillos de cultivo celular a una densidad  $1.5 \times 10^5$  células/pocillo y cultivadas a 37°C. Luego de 48 hs, las células no adherentes fueron removidas y los pocillos fueron lavados dos veces con PBS. Luego, una suspensión de cristal violeta (Sigma) al 0.1% fue agregada por 1 minuto a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas tres veces con agua y, posteriormente, el cristal violeta fue solubilizado en ácido acético al 3%. El nivel de adhesión fue cuantificado midiendo las densidades ópticas a 550 nm en un espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystems).

#### *13. Estimulación de la proliferación de linfocitos T por células dendríticas*

La capacidad de las CDs infectadas con VFA o incubadas con VFA inactivado de estimular la proliferación de linfocitos T fue evaluada *in vitro* mediante un cultivo mixto de linfocitos y mediante la estimulación de esplenocitos provenientes de ratones previamente inmunizados con el VFA.

Para la realización del cultivo mixto de linfocitos (CML),  $2.5 \times 10^5$  esplenocitos provenientes de ratones C57BL/6 vírgenes fueron co-cultivados en microplacas de 96 pocillos con  $5 \times 10^4$  CDs (provenientes de ratones BALB/c) infectadas con VFA (moi:10), incubadas con VFA inactivado (moi:10) o control. Las células fueron co-cultivadas durante 4 días en medio RPMI completo. Al tercer día de cultivo, las células fueron pulsadas durante 18 hs. con [<sup>3</sup>H]timidina (1 µCi/well, DuPont). Luego, las células fueron recolectadas utilizando un cosechador semiautomático (Skaron Instruments), y la cantidad de [<sup>3</sup>H]timidina incorporada fue determinada en un contador de centelleo (Wallac 14, Perkin Elmer Life Sciences).

Para la realización del ensayo de proliferación antígeno-específico autólogo,  $2.5 \times 10^5$  esplenocitos provenientes de ratones BALB/c previamente vacunados con dos dosis de 1 ug de VFA inactivado a un intervalo de 3 semanas de duración fueron co-cultivados con  $5 \times 10^4$  CDs autólogas control, infectadas con VFA (moi:10) o pulsadas con UV-VFA (moi:10). La incorporación de [ $^3\text{H}$ ]timidina fue determinada como se describió arriba.

#### *14. Determinación de la capacidad proliferativa de los linfocitos T mediante la estimulación con Concanavalina A*

Esplenocitos provenientes de ratones infectados o vacunados con VFA inactivado fueron cultivados en medio RPMI completo y estimulados con 5 ug/ml del mitógeno de linfocitos T, Concanavalina A (Con A, Sigma) durante 96 hs. La incorporación de [ $^3\text{H}$ ]timidina fue determinada como se describió en el párrafo anterior.

#### *15. Análisis de la secreción de citoquinas y anticuerpos anti-Virus de la Fiebre Aftosa en cocultivos de células dendríticas y esplenocitos o células de linfonódulos*

Los co-cultivos de CDs ( $5 \times 10^4$  CDs/pocillo) y esplenocitos o células de linfonódulos ( $2.5 \times 10^5$  células/pocillo) fueron realizados en medio RPMI 1640 completo. En las situaciones donde se indica, se utilizó el doble de CDs y de células efectoras. Los sobrenadantes de cultivos fueron recolectados a los 2, 3 o 7 días luego del inicio de los co-cultivos, para evaluar la secreción de citoquinas o de anticuerpos anti-VFA.

#### *16. ELISA para la determinación de la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares*

La concentración de citoquinas fue determinada en los sobrenadantes de cultivos de CDs en ausencia o presencia de esplenocitos a las 48 o 72 hs., según se indique, luego de iniciados los cultivos. La presencia de citoquinas fue

detectada mediante la realización de un ELISA sandwich. Las placas de ELISA (Maxisorp) fueron cubiertas con anticuerpos de rata anti IL-2, IL-4 (Pharmingen), IL-10 o IFN- $\gamma$  (eBioscience) diluidos en buffer carbonato-bicarbonato (0.05 M, pH 9.6) e incubadas durante una noche a 4°C. Luego, las placas fueron lavadas tres veces con PBS adicionado con 0.05% Tween 20 (PBST) y bloqueadas con PBS suplementado con 0.5% gelatina durante 1 hora a temperatura ambiente. Los sobrenadantes de cultivo y los estándares de cada citoquina fueron agregados a las placas en duplicados e incubados durante 2 hs. a temperatura ambiente. Luego de lavar tres veces como se indicó anteriormente, el correspondiente anticuerpo anti-citoquina conjugado con biotina fue agregado e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas fueron lavadas e incubadas con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar, el sustrato 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) fue agregado. La absorbancia a 450 nm fue medida en un espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystems). Las concentraciones de las citoquinas fueron calculadas en base a las densidades ópticas obtenidas con los estándares.

#### *17. ELISAs para la evaluación de las respuestas de anticuerpos contra el Virus de la Fiebre Aftosa, Ovoalbúmina y Dextran-500*

A fin de medir los títulos de anticuerpos totales contra VFA, se realizó un ELISA de fase líquida, tal como ha sido previamente descrito (Dus Santos et al 2000). Brevemente, placas Immulon 2HB fueron cubiertas durante una noche a 4°C con un suero de conejo anti-VFA O1C diluido a la concentración óptima en buffer carbonato-bicarbonato (pH 9.6). Luego de lavar las placas tres veces con PBST, las mismas fueron bloqueadas con PBST adicionado con 1% OVA (buffer de bloqueo) por 30 minutos a 37°C. Las muestras de sueros de los ratones fueron diluidas seriadamente en buffer de bloqueo y luego se les agregó una cantidad fija de VFA inactivado. Luego de una incubación de 1 hora a 37°C con agitación constante, las mezclas de virus-suero fueron transferidas a las placas bloqueadas e incubadas por 1 hora a 37° C. Luego de lavar, una dilución óptima de suero de cobayo anti-VFA diluido en PBS adicionado con

2% de suero normal de conejo fue agregada e incubada por 1 hora a 37°C. Las placas fueron lavadas y luego se agregaron anticuerpos de cabra anti-IgG de cobayo conjugados con peroxidasa (KPL) diluido en el mismo buffer. Luego de una incubación de 1 hora a 37°C, se agregó el sustrato O-phenyldiamine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las absorbancias a 490 nm fueron medidas en un espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystem). Sueros controles positivos y negativos fueron incluidos en cada ensayo. Los títulos de anticuerpos se expresan como el logaritmo negativo de la máxima dilución de suero que inhibe el desarrollo de color más de un 50% que el valor promedio obtenido en ausencia de suero. Alternativamente, la presencia de anticuerpos totales anti-VFA en sobrenadantes de cultivos celulares fue evaluada mediante un ELISA sandwich. Brevemente, placas Immulon 2HB fueron cubiertas durante una noche a 4°C con un suero de conejo anti-VFA O1C diluido a la concentración óptima en buffer carbonato-bicarbonato (pH 9.6). Luego de lavar las placas tres veces con PBST, las mismas fueron bloqueadas con PBST adicionado con 1% OVA (buffer de bloqueo) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se agregó VFA inactivado y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Las placas fueron posteriormente lavadas y los sobrenadantes de cultivo celular fueron agregados en una dilución 1:3 e incubados durante 2 hs. a temperatura ambiente. Luego de lavar, una dilución óptima de anticuerpos de cabra anti-IgG total, anti-IgM o anti-subclases de IgG de ratón conjugados con biotina fue agregada e incubada por 1 hora a 37°C. Las placas fueron lavadas y luego se agregó estreptavidina conjugada con peroxidasa (KPL). Después de una incubación de 1 hora a 37°C, se agregó el sustrato O-phenyldiamine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las absorbancias a 490 nm fueron medidas en un espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystem).

Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-OVA, placas Immulon 2HB fueron incubadas durante una noche con una solución de OVA (10 ug/ml) en buffer carbonato. El bloque y los pasos subsiguientes fueron realizados con PBST adicionado con gelatina (Sigma) al 0.5%. Los sueros fueron agregados a una dilución 1/50 e incubados por una hora a 37° C. Anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (KPL) fueron luego agregados e incubados por 30 minutos a 37°C. El sustrato O-phenylenediamine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue

luego agregado y la absorbancia fue medida a 490 nm en un espectrofotómetro (Multiskna EX, Labsystems).

Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-Dextran 500, placas Immulon 1B fueron incubadas durante una noche con una solución de Dextran 500 (50 ug/ml) en buffer carbonato. El bloque y los pasos subsiguientes fueron realizados con PBST adicionado con gelatina (Sigma) al 0.5%. Los sueros fueron agregados a una dilución 1/50 e incubados por una hora a 37° C. Anticuerpos de cabra anti-IgM de ratón conjugados con peroxidasa (KPL) fueron luego agregados e incubados por 30 minutos a 37°C. El sustrato O-phenylenediamine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue luego agregado y la absorbancia fue medida a 490 nm en un espectrofotómetro (Multiskna EX, Labsystems).

*18. Seroneutralización para la determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el Virus de la Fiebre Aftosa en muestras de suero o en sobrenadantes de cultivo celular*

Para determinar la presencia de anticuerpos con actividad neutralizante del VFA en muestras de sueros murinos, éstos fueron previamente inactivados por incubación a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente, los sueros fueron diluidos 1:25 en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) adicionado con 10% SFB e incubados durante 1 hora a 37° C con diluciones seriadas en base 10 del VFA. Luego, las mezclas VFA-suero fueron transferidas a placas de 96 pocillos conteniendo células BHK-21 en un 80% de confluencia. Tras una incubación de 1 hora a 37° C, las mezclas fueron removidas y reemplazadas por medio fresco. La aparición de efecto citopático fue evaluada a las 48 hs. de incubación a 37° C mediante observación en el microscopio.

Para determinar la actividad neutralizante de los anticuerpos presentes en los sobrenadantes de co-cultivos de CDs y esplenocitos, éstos fueron utilizados a una dilución 1:3. Se utilizó el mismo procedimiento que para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero.

### *19. Transferencia adoptiva de células dendríticas*

Ratones BALB/c fueron vacunados con 0.5 ug de VFA inactivado. Esta dosis de virus inactivado induce una respuesta de anticuerpos de corta duración que comienza a decaer a partir del día 30 post-vacunación. A los 60 días, los ratones fueron seleccionados de acuerdo a sus títulos de anticuerpos anti-VFA. Solamente aquellos ratones cuyos títulos se ubicaban alrededor de 1.2 fueron usados como receptores de CDs. A estos ratones se les transfirió, por vía ip, un total de  $5 \times 10^5$  CDs control, infectadas con VFA (moi:10) o pulsadas con VFA inactivado por UV (moi:10). El desarrollo de una respuesta de anticuerpos secundaria anti-VFA fue evaluada mediante la técnica de ELISA, 1 semana después de la transferencia de las CDs.

### *20. Esplenectomía*

Los ratones fueron anestesiados con Ketamina y xylazina inoculadas por vía ip. La arteria aferente del bazo fue ligada con una sutura 4-0 y el bazo fue removido. La cavidad peritoneal y la piel fueron suturados con suturas 4-0. Los ratones fueron inoculados a los 12 días luego de la cirugía.

### *21. Enriquecimiento de células CD9+ a partir del bazo mediante la utilización de perlas magnéticas*

Células de bazo provenientes de ratones vírgenes fueron separadas de acuerdo a la expresión de la molécula de superficie CD9. Para ello,  $4 \times 10^7$  esplenocitos fueron incubados con 5 ug de un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD9 murino (gentilmente suministrado por el Dr. JF. Kearney) durante 30 minutos a 4°C. Luego de lavar las células, se agregaron 5 ug de un anticuerpo de cabra anti-IgG de rata, conjugado con biotina (KPL). Luego de una nueva incubación por 30 minutos a 4° C, las células fueron lavadas, y posteriormente se agregaron microesferas magnéticas sensibilizadas con avidina (Miltenyi). Luego de una incubación de 15 minutos a 4° C, la separación fue realizada



utilizando una columna MS (Miltenyi), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Una vez finalizados los lavados, las células fueron puestas en cultivo en medio RPMI completo y estimuladas con CDs infectadas o incubadas con VFA inactivado.

## *22. Eliminación funcional de los linfocitos B de la zona marginal*

Para la eliminación *in vivo* de los linfocitos B de ZM, los ratones fueron inoculados, tal como ha sido previamente descrito (Guinamard et al., 2000), por vía endovenosa (ev) con 100 ng de toxina pertussis (PTx, List Biological Laboratories) 2 días antes de ser inoculados con VFA. La eliminación de los linfocitos B de ZM fue evaluada mediante análisis por citometría de flujo de la expresión de las moléculas B220 y CD1d, como se indicó en el punto 10.

## *23. Análisis estadístico*

Las diferencias entre los tratamientos (infección con VFA, carga con VFA inactivado con UV y control) fueron determinadas mediante el análisis de la varianza de un criterio, seguido de comparaciones “a posteriori” utilizando el método de Bonferroni.

Las diferencias entre los tratamientos a lo largo del tiempo fueron analizadas mediante el análisis de la varianza para medidas repetidas, utilizando la corrección de Greenhouse y Geise para el nivel de significancia (fijado al 1%).

Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado indicador de diferencias significativas.

## **RESULTADOS**

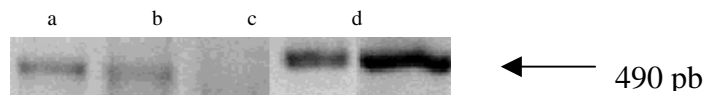
## 1. Determinación de la susceptibilidad de las células dendríticas a la infección con el Virus de la Fiebre Aftosa

### a) Detección del ARN viral por amplificación utilizando RT-PCR

La replicación del VFA en CDs murinas diferenciadas a partir de precursores mieloides fue inicialmente evaluada a través de la amplificación por RT-PCR de la cadena de sentido negativo del ARN viral. Dado que el VFA es un virus cuyo genoma consiste en una molécula de ARN de sentido positivo, la detección de moléculas de sentido negativo en las células es indicativa de replicación del ARN viral.

Las CDs fueron incubadas con el VFA a una moi de 10 durante 4 hs. a 37° C. Luego, las células fueron lavadas con PBS (pH 5,5), seguido por 4 lavados con PBS (pH 7.4). Este proceso permite la inactivación y remoción de las partículas virales que no fueron internalizadas. Por lo tanto, en el sobrenadante del último lavado, no fue posible detectar VFA infeccioso mediante la realización de dos pasajes ciegos sobre la línea BHK-21, la cual es altamente susceptible a la infección con VFA. Luego de los lavados, el ARN total fue extraído y subsiguientemente utilizado como templado para la reacción de RT-PCR, utilizando primers específicos para el gen codificante para la proteína VP1 del VFA (cadena negativa).

A partir del ARN extraído tanto a las 5 como a las 24 hs pi, se obtuvo un producto de amplificación de la longitud esperada (490 pb), indicando que el VFA replica su ARN en las CDs (Figura 1).



**Figura 1.** Infección de CDs con VFA. Análisis en gel de agarosa (1%) de los productos de RT-PCR del gen codificante para la proteína VP1 de VFA. Se extrajo RNA total a partir de  $2 \times 10^6$  células, y se usó como templado para la amplificación por RT-PCR del RNA de cadena negativa del gen VP1. Calle a, CD infectadas con VFA (moi:10) 5 hs pi; calle b, CD infectadas con VFA (moi:10) 24 hs pi; calle c; CDs control; calle d, células BHK-21 infectadas con VFA (moi:10). La amplificación de la cadena positiva de ARN de VFA a partir de CDs infectadas fue utilizada como un control positivo (calle e).

b) Detección de la producción de partículas virales infecciosas

La capacidad del VFA de replicar productivamente en las CDs produciendo nuevos viriones infecciosos, fue evaluada. Para ello, las CDs fueron infectadas a una moi de 10 y posteriormente fueron lavadas con PBS (pH 5.5) seguido de 4 lavados con PBS (pH 7.4). Las CDs fueron entonces cultivadas a una densidad de  $3 \times 10^6$  CDs/ml. A las 3; 6; 24 y 48 hs. pi se recolectó sobrenadante de los cultivos, y la presencia de virus infeccioso fue determinada en éstos, mediante titulación sobre la línea celular susceptible, BHK-21. Luego de dos pasajes ciegos sobre esta línea celular, no se detectó el efecto citopático del VFA en ninguno de los pocillos que contenían los sobrenadantes analizados. Estos resultados indican la ausencia de virus infectivo en los sobrenadantes analizados. Por lo tanto, si bien se produce replicación de ARN del VFA en las CDs infectadas, la infección prosigue un curso abortivo, en el cual no hay liberación de nuevas partículas virales infecciosas desde las células.

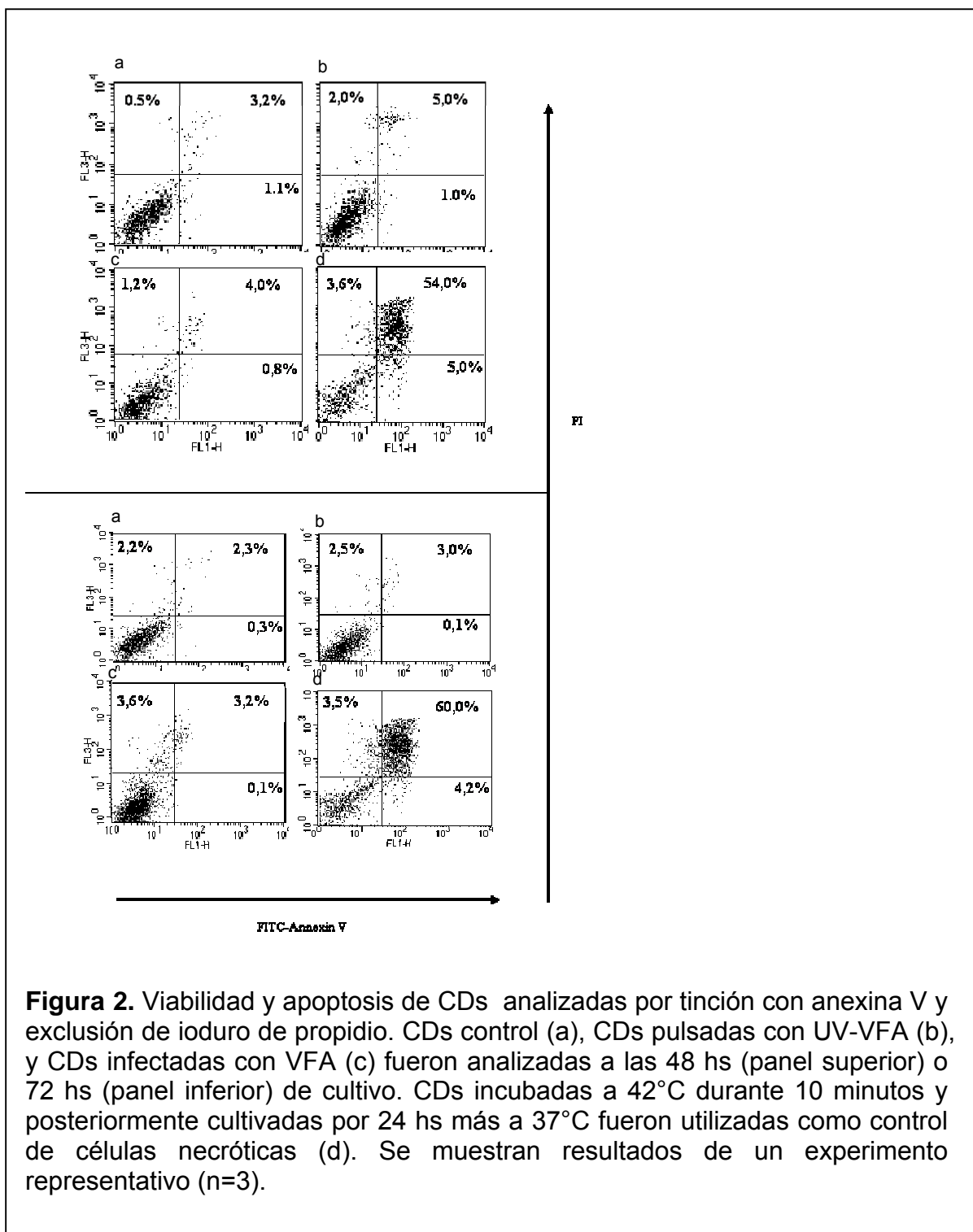
**2. Determinación de la viabilidad de las células dendríticas luego de la infección con el Virus de la Fiebre Aftosa**

El porcentaje de células viables, así como el de células en proceso de apoptosis luego de la infección con VFA, fue evaluado a través de la marcación con yoduro de propidio y la tinción con anexina V. Mediante esta técnica, las células necróticas y en apoptosis tardía se evidencian por la captación del yoduro de propidio, mientras que las células en proceso de apoptosis, ya sea temprana o tardía, se marcan positivamente con la anexina V.

Las CDs fueron infectadas con el VFA (moi:10) o incubadas con VFA inactivado, y a distintos momentos pi fueron analizadas mediante citometría de flujo. La infección con VFA no modificó los porcentajes de células positivas ni para la marcación con el yoduro de propidio ni para la anexina V, evaluados a las 48 y a las 72 hs. pi, en comparación con la viabilidad observada en las CDs no infectadas. El virus inactivado con UV tampoco modificó la viabilidad de las CDs en el período estudiado (Fig. 2a). Estas observaciones indican que la

infección de CDs con VFA no disminuye la viabilidad de las mismas, al menos en el período de 72 hs., que fue el último momento evaluado.

En conjunto, estos resultados indican que la replicación abortiva de VFA en las CDs no causa efecto citopático y por lo tanto, no disminuye la viabilidad de las CDs infectadas.



**Figura 2.** Viabilidad y apoptosis de CDs analizadas por tinción con anexina V y exclusión de ioduro de propidio. CDs control (a), CDs pulsadas con UV-VFA (b), y CDs infectadas con VFA (c) fueron analizadas a las 48 hs (panel superior) o 72 hs (panel inferior) de cultivo. CDs incubadas a 42°C durante 10 minutos y posteriormente cultivadas por 24 hs más a 37°C fueron utilizadas como control de células necróticas (d). Se muestran resultados de un experimento representativo (n=3).

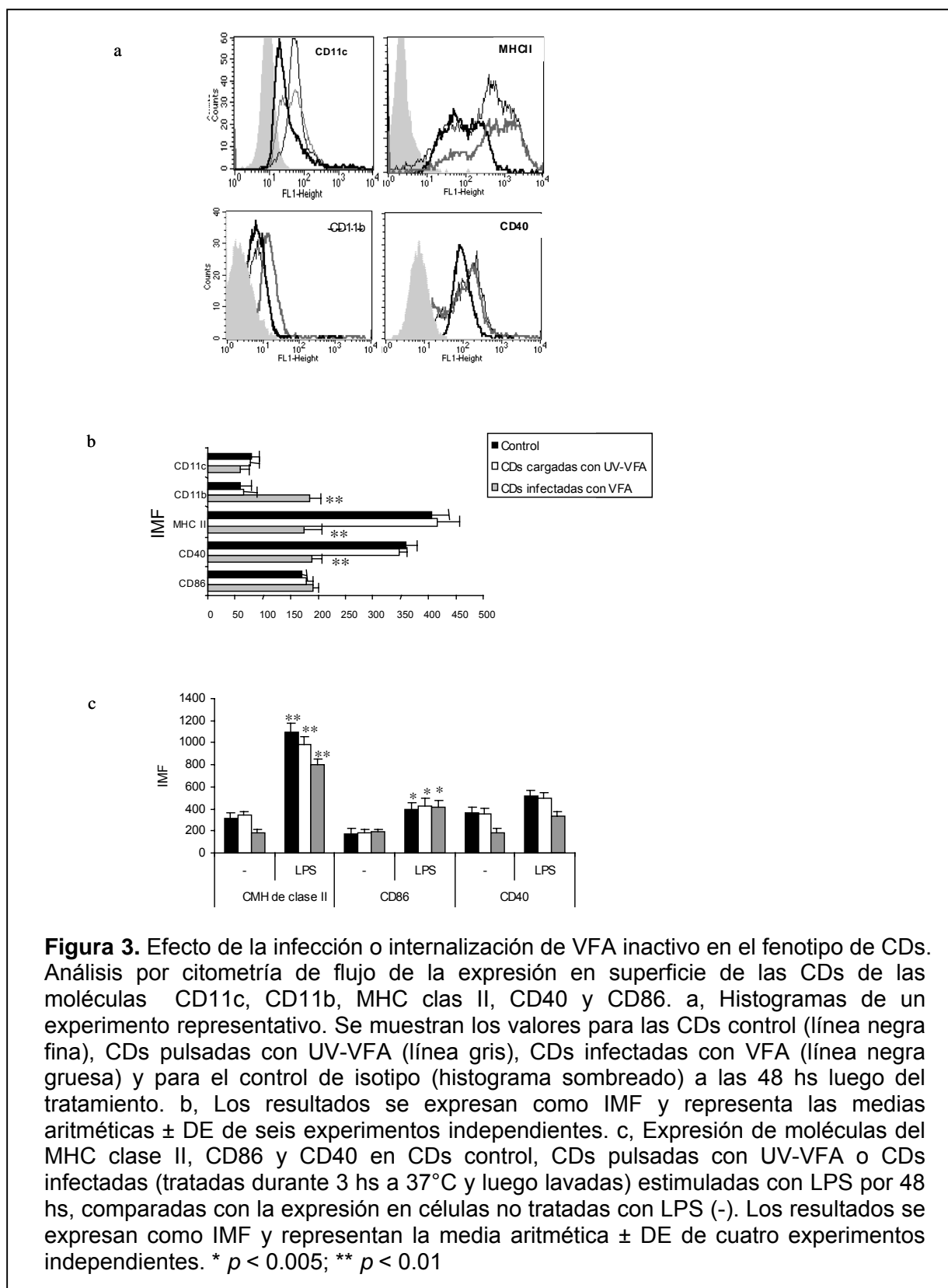
### **3. Fenotipo y morfología de las células dendríticas infectadas por el Virus de la Fiebre Aftosa**

Como ha sido descrito en la introducción de esta tesis, la infección de ratones con el VFA induce una respuesta inmune que presenta importantes diferencias con respecto a la respuesta inducida luego de la vacunación con virus inactivado. Con el objetivo de determinar las bases inmunológicas de dichas diferencias, se procedió a estudiar *in vitro* la modulación de la funcionalidad de las CDs luego de ser infectadas con VFA, así como luego de ser incubadas con VFA inactivado con luz UV.

La primera aproximación al estudio de la modulación de la funcionalidad de las CDs por los antígenos mencionados, fue mediante el análisis del fenotipo de las CDs. Se realizó la marcación con anticuerpos dirigidos contra moléculas involucradas en la presentación de antígenos o en la co-estimulación de linfocitos T, y luego se analizó la expresión de estas moléculas en la superficie celular mediante citometría de flujo. A las 48 hs. posteriores a la infección de las CDs con VFA, la expresión en superficie de las moléculas CD40 y MHC clase II disminuyó significativamente, en comparación con las células control no infectadas. Por el contrario, la expresión de CD86 no se modificó luego de la infección (Fig. 3 a y b). El análisis de la expresión de estas moléculas en las CDs que fueron incubadas con el VFA inactivado, demostró que este tratamiento no produce modificaciones en la expresión de ninguna de ellas. Estas observaciones indican que solamente el virus infeccioso, pero no el inactivado, induce disminución de la expresión de los marcadores mencionados (Figura 3 a y b).

Con el objetivo de evaluar si la disminución de la expresión de las moléculas del CMH de clase II y de CD40 en las CDs infectadas representa un fenómeno reversible, la expresión de estas moléculas fue evaluada en CDs que luego de haber sido infectadas con VFA, fueron estimuladas con LPS durante 48 hs. En esta caso, la expresión de moléculas del CMH de clase II y CD40, así como la de CD86, aumentó en las CDs infectadas de una forma similar a la de las CDs que no fueron infectadas pero que fueron estimuladas con LPS (Fig. 3c). Estos resultados indican que, a pesar de que la infección con VFA deprime

la expresión de moléculas involucradas en la presentación antigénica y en la co-estimulación de linfocitos T, este efecto puede ser revertido por un estímulo activador fuerte, tal como el LPS.



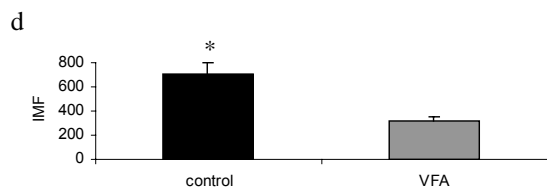
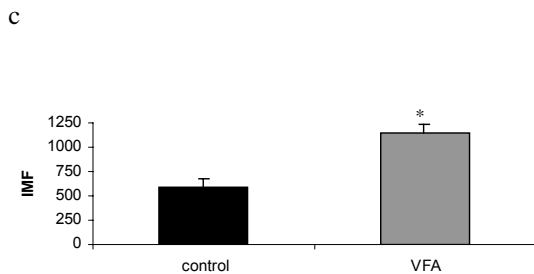
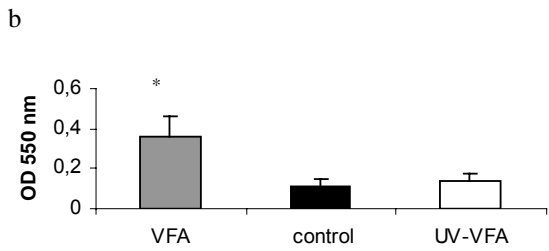
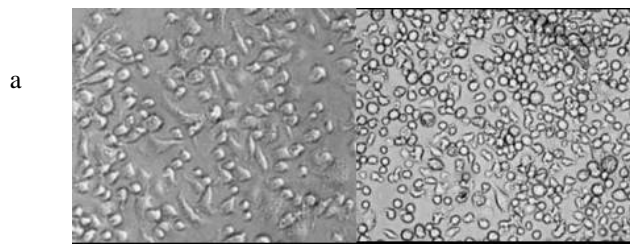
Los cambios en el fenotipo de las CDs infectadas fueron acompañados de cambios en la morfología de estas células. En este sentido, se observó que luego de la infección con VFA, las CDs adquirieron una morfología elongada, aumentando su tamaño así como la adherencia al plástico. Debido a esta morfología, característica de los macrófagos, a estas células las denominamos CDs “macrofágicas”. Por el contrario, las células no infectadas y las células incubadas con VFA inactivado permanecieron en su mayoría redondeadas y en suspensión, formando pequeños racimos de células, como es típico de CDs en cultivo (Fig. 4 a).

La adherencia al plástico de las CDs infectadas fue confirmada mediante la tinción de las mismas con cristal violeta y la posterior cuantificación del colorante en un espectrofotómetro. Por esta técnica se confirmó lo visto por microscopía: las CDs infectadas permanecieron significativamente más adheridas al plástico que las células control y que las células pulsadas con VFA inactivado (Fig. 4 b).

La adquisición de un perfil macrofágico en las CDs infectadas fue también corroborada a nivel fenotípico. La expresión del marcador de macrófagos CD11b aumentó significativamente en las CDs infectadas, en comparación con su expresión en las células no infectadas o pulsadas con UV-VFA. Por el contrario, la expresión de CD11c, un marcador típico de CDs murinas, disminuyó, aunque no significativamente, en las células infectadas (Fig. 3 a y b).

Posteriormente, se evaluó la funcionalidad de las CDs en relación a la captación antigénica. Las CDs incorporan los antígenos presentes en el medio extracelular a través de dos mecanismos: la fagocitosis y la endocitosis. Cuando se estudió la fagocitosis de partículas de Zy-FITC y la endocitosis de OVA-FITC, se encontró que las CDs infectadas con VFA aumentaron la fagocitosis de las primeras. Por el contrario, estas células disminuyeron su capacidad de endocitar OVA-FITC (Fig 4 c y d). Estas modificaciones también son características de células que adquieren un fenotipo macrofágico, ya que en los macrófagos el mecanismo de fagocitosis es de mayor relevancia que el de endocitosis.





**Figura 4.** Cambios morfológicos y funcionales en CDs infectadas con VFA. a, Fotografías microscópicas de CDs infectadas (panel izquierdo) o control (panel derecho) tomadas 48 hs luego de la infección (magnificación original, X 80). b, Células adherentes al plástico fueron cuantificadas por internalización de cristal violeta y la posterior medición de la densidad óptica a 550 nm del colorante disuelto en ácido acético 3%. c, Internalización de zymosan-FITC luego de la incubación por 30 minutos a 37°C, medida por citometría de flujo. Los resultados se expresan como IMF  $\pm$  DE correspondiente a la muestra menos la IMF obtenida con células tratadas con citocalasina B. d, internalización de OVA-FITC luego de la incubación por 30 minutos a 37°C, medida por citometría de flujo. Los resultados se expresan como IMF  $\pm$  DE correspondiente a la muestra menos la IMF obtenida con células incubadas a 4°C. Se indican las diferencias significativas (\* $p < 0.05$ ).

En conjunto, los datos presentados en esta sección indican que la infección con VFA induce cambios en los marcadores de superficie, en la morfología celular y en la capacidad endocítica y fagocítica de las CDs. Estos cambios sugieren que la infección de las CDs murinas con el VFA induce una diferenciación de las mismas hacia un perfil macrofágico.

#### **4. Evaluación de la capacidad estimuladora de linfocitos T de las células dendríticas infectadas con el Virus de la Fiebre Aftosa**

La habilidad de las CDs luego de su interacción con el VFA, para estimular la proliferación de linfocitos T, fue inicialmente evaluada en experimentos realizados *in vitro*. En primer lugar, las CDs infectadas o pulsadas con virus inactivado fueron co-cultivadas con esplenocitos autólogos provenientes de ratones previamente inmunizados con el VFA. Las CDs infectadas con VFA no estimularon la proliferación de linfocitos T, evaluada mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina. Por el contrario, las CDs incubadas con VFA inactivado estimularon una respuesta proliferativa significativamente mayor a la observada en las CDs control (Fig. 5 a). Estas observaciones indican que la capacidad de las CDs para estimular linfocitos T específicos para el VFA disminuye luego de la infección de las mismas. Por el contrario, esta capacidad se encuentra aumentada en CDs que fueron incubadas con VFA inactivado.

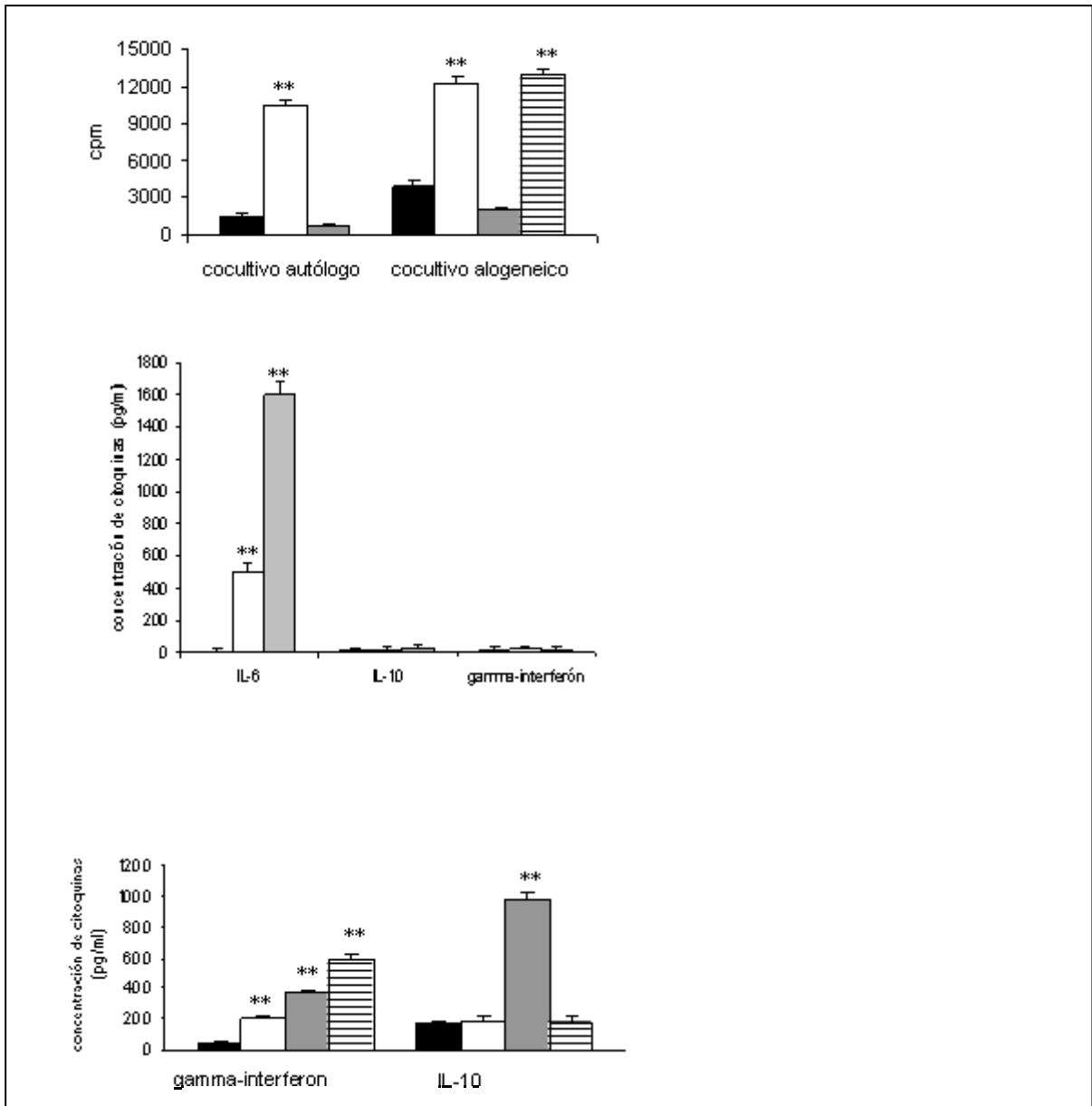
La habilidad de las CDs para estimular la proliferación de linfocitos T fue posteriormente evaluada en un cultivo mixto de leucocitos (CML). Las CDs provenientes de ratones BALB/C fueron infectadas con VFA o incubadas con VFA inactivado, y luego fueron co-cultivadas con esplenocitos alogeneicos provenientes de ratones C57BL/6 vírgenes. Las CDs infectadas suprimieron el CML. Por el contrario, las CDs pulsadas con UV-VFA presentaron una capacidad estimuladora superior a la de las CDs no infectadas y comparable a la inducida por CDs activadas con LPS (Fig. 5 b). Estos resultados indican que

la incapacidad de las CDs infectadas con VFA de estimular a los linfocitos T no se trata de un fenómeno restringido a los clones de linfocitos específicos para el VFA, sino que es generalizado e inespecífico.

Los experimentos presentados en esta sección, junto con los precedentes, sugieren que los cambios fenotípicos que tienen lugar en las CDs infectadas podrían ser la causa de la supresión de la respuesta proliferativa de los linfocitos T observada *in vitro*. Con el objetivo de examinar mecanismos adicionales asociados a la inhibición de las respuestas T, la producción de citoquinas fue analizada en los sobrenadantes de cultivos de CDs, así como en co-cultivos de CDs y esplenocitos. De las citoquinas evaluadas (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-6 e IL-12), las CDs infectadas únicamente secretaron IL-6, la cual fue detectada en los sobrenadantes de los cultivos puros de CDs (Fig 5 b). En cambio, en los sobrenadantes de los co-cultivos de CD infectadas y esplenocitos, se encontró, además de IL-6, una alta producción de IL-10 y de IFN- $\gamma$  (Fig 5 c).

En los cultivos de CDs incubadas con VFA inactivado, si bien se detectó la secreción de IL-6, la misma fue significativamente menor, en comparación con la observada en los cultivos de CDs infectadas (Fig 5 b). Asimismo, en los co-cultivos de CDs pulsadas con el virus inactivado y esplenocitos, se determinaron pequeñas cantidades de IFN- $\gamma$  (significativamente menores a las secretadas en los co-cultivos con CDs infectadas), y cantidades no detectables de IL-10 (Fig. 5 c). La secreción de IL-12 y de IL-4 no fue detectada en ninguno de los sobrenadantes analizados.

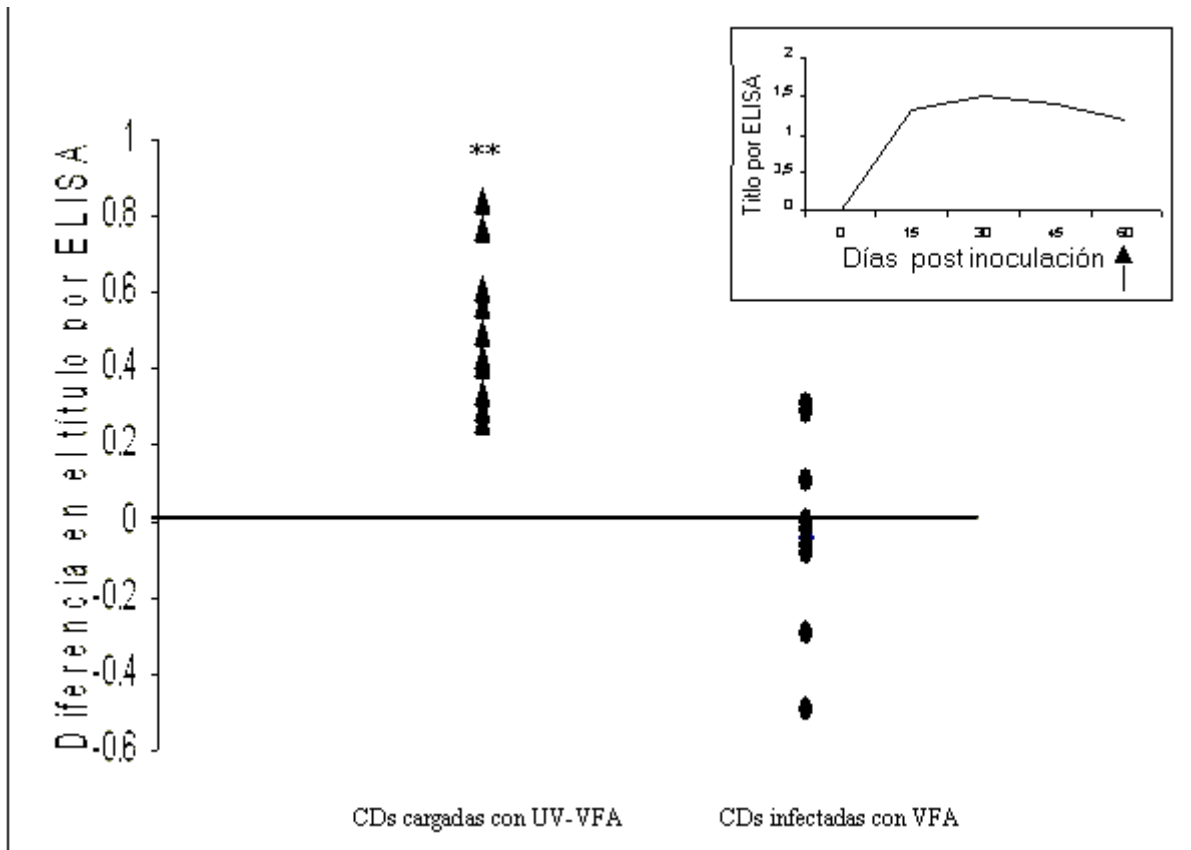
Estos resultados indican que tanto el VFA infeccioso como el inactivado inducen la secreción de IL-6 por las CDs, aunque en cantidades significativamente mayores en el caso de la infección. Asimismo, tanto las CDs infectadas como las incubadas con VFA inactivado con UV inducen la secreción de IFN- $\gamma$  luego de ser co-cultivadas con esplenocitos. En cambio, sólo las CDs infectadas, pero no las incubadas con virus inactivado, inducen la secreción de la citoquina regulatoria IL-10 cuando son co-cultivadas con esplenocitos.



**Figura 5.** Diferencias en la capacidad de estimular linfocitos T de CDs infectadas o pulsadas con UV-VFA. CDs control (■), pulsadas con UV-VFA (moi:10; ◻) o infectadas con VFA (moi:10; ◼) fueron lavadas y cocultivadas con esplenocitos de ratones autólogos previamente inmunizados con VFA, o con esplenocitos alogeneicos ( $5 \times 10^4$  CDs/well vs.  $2.5 \times 10^5$  esplenocitos/well). CDs estimuladas por 48 hs con LPS fueron incluidas como control positivo (barra rayada). a, La proliferación de linfocitos T fue medida 72 hs luego de iniciado el cocultivo por la incorporación de [ $^3$ H] timidina. Los resultados se expresan como la media de las cpm de incorporación de [ $^3$ H] timidina y son representativos de 5 experimentos independientes. \*,  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . b, La secreción de IL-6, IL-10 y gamma interferón fue evaluada en los sobrenadantes de los cultivos de CDs control, infectadas con VFA o pulsadas con UV-VFA. c, Cuarenta y ocho horas luego del inicio de los cocultivos, se recolectaron sobrenadantes y la producción de interferón gamma e IL-10 fue analizada a través de un ELISA cuantitativo. La figura muestra las concentraciones medias (picogramos por mililitro). \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ .

## **5. Evaluación de la capacidad de las células dendríticas infectadas con el Virus de la Fiebre Aftosa para estimular linfocitos T *in vivo***

Con el objetivo de determinar si la inhibición de la funcionalidad de los linfocitos T, inducida *in vitro* por las CDs infectadas con VFA, es un fenómeno que ocurre también *in vivo*, se analizó la capacidad de las CDs infectadas de inducir una respuesta de anticuerpos secundaria realizando experimentos de transferencia adoptiva de células. Para ello, se inocularon ratones con 1 ug de VFA y los niveles de anticuerpos séricos fueron determinados a distintos momentos post-vacunación. A los 60 días, cuando el título medio de anticuerpos se ubicaba en aproximadamente 1.2, CDs infectadas o incubadas con VFA inactivado fueron transferidas a estos ratones por vía intra-peritoneal. Una semana más tarde, se volvieron a medir los títulos de anticuerpos en el suero de los animales transferidos. Mientras que las CDs infectadas con VFA no indujeron un aumento del título de anticuerpos, las CDs pulsadas con el VFA inactivado estimularon una respuesta secundaria, con un aumento significativo de la concentración de anticuerpos anti-VFA ( $p < 0.001$ ) (Fig. 6). Estos resultados, en concordancia con los resultados de los experimentos realizados *in vitro*, indican que la infección con VFA inhibe la capacidad de las CDs de estimular linfocitos T y, por lo tanto, de reforzar una respuesta de anticuerpos secundaria.



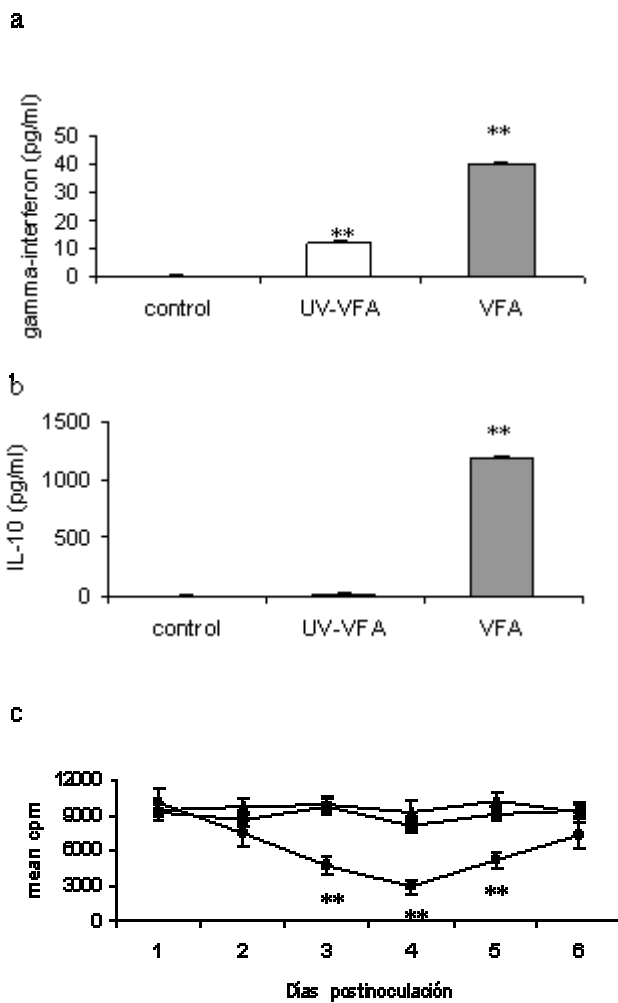
**Figura 6.** Respuesta humoral secundaria anti-VFA inducida por transferencia adoptiva de CDs. Un total de  $5 \times 10^5$  CDs pulsadas con UV-VFA ( $\blacktriangle$ ; moi, 10) o CDs infectadas con VFA ( $\bullet$ ; moi, 10) fueron transferidas (por vía ip) a ratones vacunados 60 días antes con 0.5  $\mu$ g de VFA inactivado. Los títulos de anticuerpos anti-VFA fueron determinados por ELISA de fase líquida, 7 días luego de la transferencia de CDs. Los títulos del ELISA fueron calculados como se indica en *Materiales y Métodos*, y las diferencias en los títulos de ELISA fueron calculadas como el título de cada ratón a la semana de ser transferido con las CDs menos el título de cada ratón al momento de la transferencia. Los resultados provienen de dos experimentos independientes ( $n=10$ ). \*\*,  $p < 0.01$ . La respuesta de anticuerpos a la vacuna de los ratones receptores se muestra en el cuadro superior derecho. El día en que se transfirieron las CDs se indica con una flecha.

Posteriormente se estudió si el perfil de citoquinas detectado en los cultivos realizados *in vitro* entre CDs y esplenocitos (Fig. 5c) se correspondía con el de las citoquinas secretadas *in vivo* durante el desarrollo de la respuesta contra la infección o la vacunación con VFA. Para ello, se infectaron o vacunaron ratones y, 48 hs. más tarde, se les extrajeron los esplenocitos, los cuales fueron cultivados *in vitro* durante 72 hs. sin ningún estímulo adicional. La presencia de las citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos fue entonces analizada mediante ELISA.

Al igual que lo observado *in vitro*, las células de bazo provenientes de ratones infectados produjeron altas cantidades de IL-10 y de IFN- $\gamma$ . Por el contrario, los esplenocitos de ratones vacunados con virus inactivado sólo produjeron IFN- $\gamma$ . (Fig 7 a y b). En conjunto, estos resultados indican que los mecanismos involucrados en la supresión de las respuestas T *in vitro* también tienen lugar durante el desarrollo de la respuesta *in vivo*.

Con el objetivo de estudiar la cinética de la inhibición de la funcionalidad de linfocitos T *in vivo*, se infectaron ratones con VFA y a distintos días post-infección se extrajeron los esplenocitos, los cuales fueron re-estimulados *in vitro* con Con-A, un mitógeno de células T. Entre los 3 y los 5 días pi se observó una reducción significativa en la proliferación de los linfocitos T provenientes de ratones infectados con VFA, en comparación con la proliferación de linfocitos T provenientes de ratones control. Por el contrario, los linfocitos provenientes de ratones vacunados con UV-VFA tuvieron una respuesta proliferativa comparable a la de los animales control (Fig. 7c).

El conjunto de datos presentado en esta sección indica que la infección de ratones con VFA suprime transitoriamente (por un período de 3 a 5 días) la proliferación de linfocitos T *in vivo*. Este proceso se asocia con la disminución en la expresión de las moléculas CD40 y del CMH de clase II en las CDs infectadas, y con una alta secreción de IL-10.



**Figura 7.** Supresión de respuestas de linfocitos T luego de la infección de ratones con VFA. Se utilizaron ratones control (■), vacunados (10 ug de UV-VFA; ▴) o infectados ( $1 \times 10^5$  DITC50; ●). A los 3 días post-infección o vacunación se les extrajeron células de bazo y se cultivaron por 48 hs ( $2.5 \times 10^6$  células/ml de medio completo). La secreción de interferón gamma (a) y de IL-10 (b) fue evaluada a través de un ELISA cuantitativo. La figura muestra las concentraciones medias (picogramos por mililitro). \*\*,  $p < 0.01$ . c, Proliferación de linfocitos T estimulados con Con-A, durante la infección aguda con VFA o luego de la vacunación con VFA inactivado. Esplenocitos de ratones infectados (●), ratones vacunados con UV-VFA (▲) o ratones control (■) fueron obtenidos a diferentes días luego de la inoculación y estimulados con 5 ug/ml de Con-A por 96 hs. La proliferación fue medida por incorporación de [ $^3$ H] timidina. Los datos se expresan como la media de las cpm de incorporación de [ $^3$ H] timidina y son representativos de tres experimentos independientes realizados con 5 ratones por tratamiento. \*\*,  $p < 0.01$ .



## **6. Inhibición de las respuestas de anticuerpos contra antígenos timo-dependientes no relacionados por la infección con el Virus de la Fiebre Aftosa**

Los resultados precedentes, referentes a las modificaciones en la funcionalidad de las CD4 y de los linfocitos T durante la infección aguda de ratones con el VFA, sugieren que la inhibición en el desarrollo de respuestas TD se produce en forma inespecífica y generalizada. Por lo tanto, las respuestas contra antígenos timo-dependientes no relacionados estarían inhibidas en los animales infectados con el VFA.

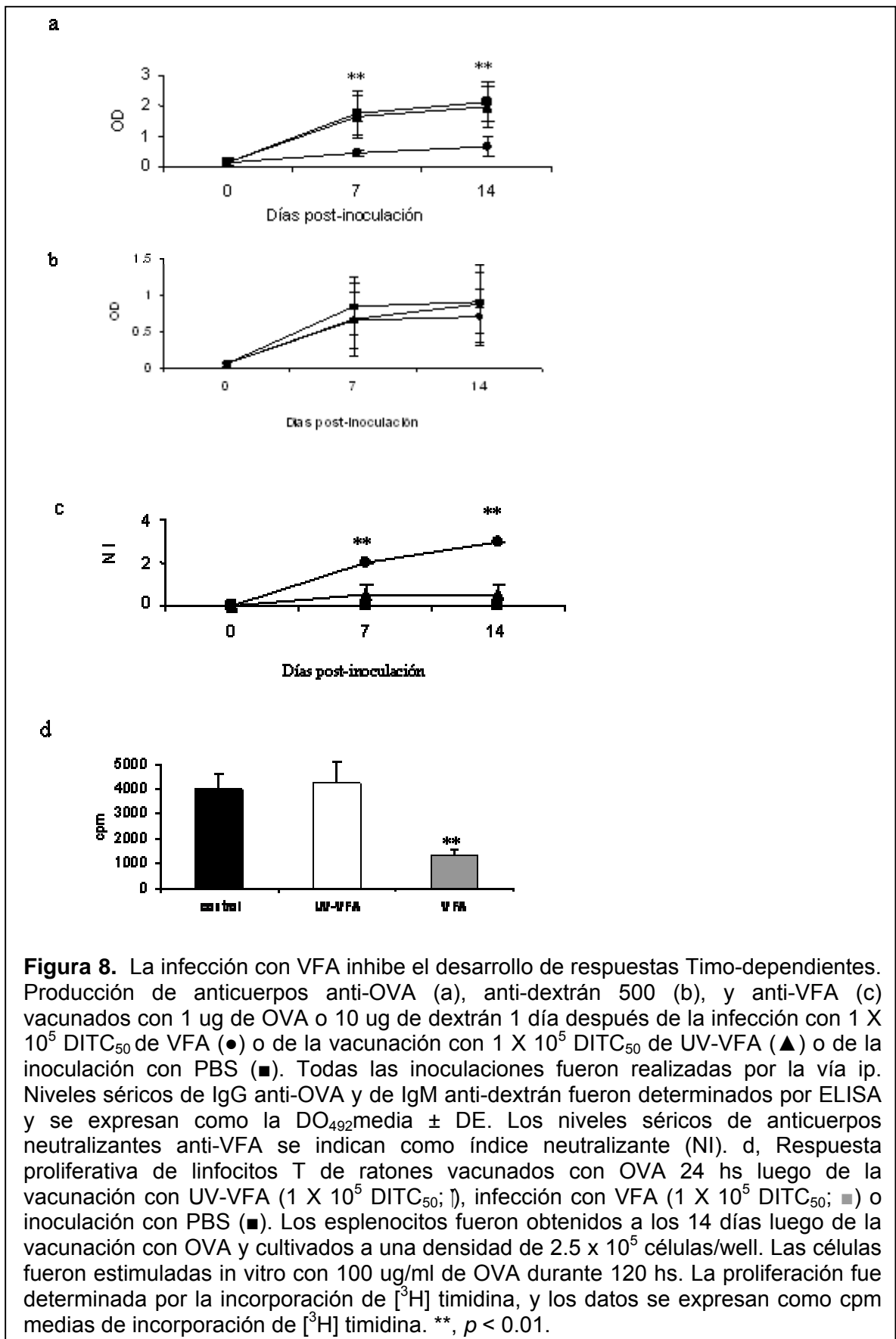
Con el objetivo de contrastar esta hipótesis, las respuestas contra antígenos TI y TD inoculados a las 24 hs. siguientes a la infección con VFA, fueron evaluadas. Los ratones fueron infectados o inoculados con VFA inactivado con UV y a las 24 hs pi, en coincidencia con el momento de máxima viremia, se los inoculó con OVA, un antígeno TD, o con Dextrán-500 (DEX-500), un antígeno TI del tipo 2. La producción de anticuerpos contra estos antígenos fue evaluada mediante la técnica de ELISA. Tanto a los 7 como a los 14 días post-inoculación, los títulos de IgG anti-OVA fueron significativamente menores en el suero de ratones infectados, en comparación con los títulos de los ratones controles (no infectados) vacunados con OVA (Fig. 8 a). Por el contrario, los ratones infectados respondieron normalmente contra DEX-500 (Fig. 8 b). Estos resultados indican que mientras las respuestas TD se encuentran deprimidas en ratones infectados, la respuesta TI anti-DEX-500 se desarrolla normalmente. Más aun, los animales infectados rápidamente desarrollaron anticuerpos neutralizantes contra VFA (Fig. 8 c), los cuales, como ha sido mencionado en la introducción, también se inducen en forma TI.

Por el contrario, ratones vacunados con VFA inactivado produjeron una respuesta contra OVA y contra DEX-500 de magnitud similar a la de los ratones controles (Fig. 8 a y b), indicando que la vacunación no provoca depresión de las respuestas TD. En concordancia con resultados previamente publicados, la producción de anticuerpos neutralizantes anti-VFA en los ratones vacunados se desarrolló más lentamente y fue de menor magnitud que en los ratones infectados (Fig. 8 c).

Con el objetivo de corroborar que la inhibición de la producción de anticuerpos contra OVA en ratones infectados con el VFA era debida a la disfuncionalidad de los linfocitos T producida como consecuencia de la infección, se evaluó la proliferación de linfocitos T específicos a los 14 días post-vacunación. Los esplenocitos de ratones infectados o vacunados con VFA e inmunizados con OVA a las 24 hs., fueron re-estimulados *in vitro* con OVA y la proliferación de los linfocitos T fue evaluada mediante la incorporación de timidina tritiada. Los linfocitos T provenientes de ratones infectados con VFA y vacunados 24 hs. más tarde con OVA exhibieron una respuesta proliferativa específica a OVA significativamente menor que la de los linfocitos T provenientes de ratones control (no infectados) vacunados con OVA. En cambio, ratones vacunados con VFA inactivado y luego inmunizados con OVA tuvieron una respuesta comparable a la de los ratones control (Fig. 8 d). Estos resultados indican que, durante la fase virémica de la infección con VFA, el desarrollo de respuestas contra antígenos TD se encuentra severamente inhibido debido a un estado de supresión generalizada de la funcionalidad de los linfocitos T.

### **7. Células dendríticas infectadas con el Virus de la Fiebre Aftosa inducen una fuerte y rápida respuesta de anticuerpos timo-independiente *in vitro* cuando son cocultivadas con esplenocitos**

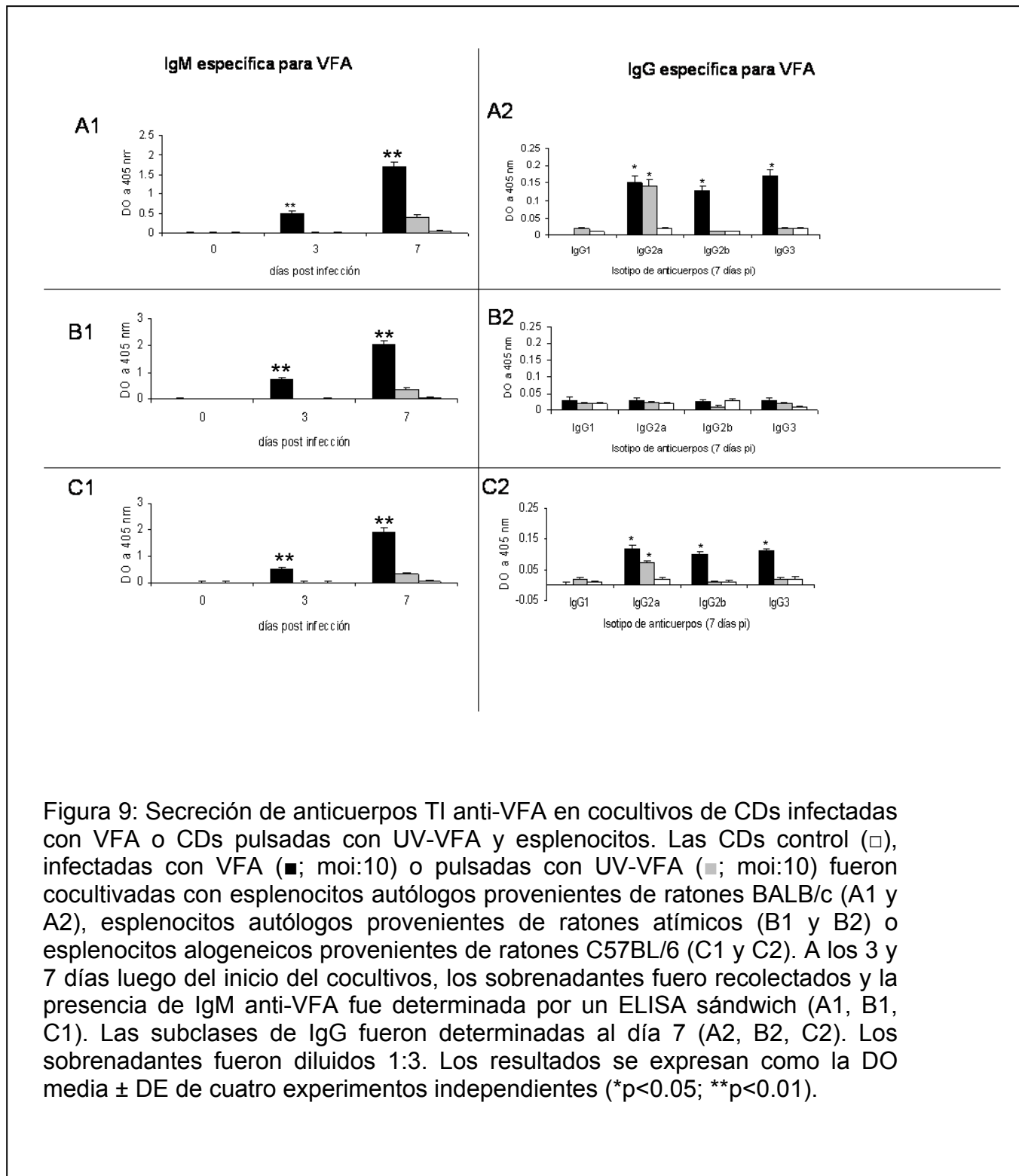
Habiendo establecido que, como consecuencia de la interacción entre CDs infectadas con el VFA y los linfocitos T, se produce inhibición de las respuestas TD, se procedió a analizar la capacidad de las CDs infectadas o incubadas con VFA inactivado de interactuar con linfocitos B y de inducir la producción de anticuerpos específicos contra el virus. Las CDs fueron infectadas o cultivadas con VFA inactivado (moi:10). Luego, las células fueron lavadas y co-cultivadas con esplenocitos provenientes de ratones eufímicos y atímicos. La producción de IgM y de las diferentes sub-clases de IgG fue evaluada en los sobrenadantes a los 3 y 7 días luego del comienzo de los co-cultivos. Las CDs infectadas con VFA estimularon esplenocitos autólogos, tanto de ratones



eutímicos (Fig. 9, A1) como de ratones atímicos (Fig. 9, B1), a producir IgM anti-VFA, la cual fue detectada a los 3 días de iniciado el co-cultivo. Contrariamente, no se detectó IgG en este momento (datos no mostrados). En cambio, a los 7 días del inicio del cocultivo, tanto IgM (Fig. 9, A1) como bajos niveles de IgG2a, IgG2b e IgG3 (Fig. 9, A2) fueron detectados en los cocultivos que involucraron esplenocitos de ratones eutímicos. Por el contrario, la IgM fue el único isotipo producido por los esplenocitos de ratones atímicos aun a los 7 días de iniciado el co-cultivo (Fig. 9, A1; B2). Estos resultados indican que, si bien las CDs infectadas con VFA pueden interactuar directamente con linfocitos B para inducir la secreción de IgM en forma TI, la presencia de linfocitos T es necesaria para inducir el cambio de isotipo a IgG.

La capacidad de producir anticuerpos anti-VFA fue posteriormente evaluada en un cultivo mixto de leucocitos. CDs diferenciadas a partir de ratones BALB/c fueron infectadas con VFA y co-cultivadas con esplenocitos alogeneicos de ratones C57BL/6 (Fig. 9, C1 and C2). Tal como se observó en el co-cultivo autólogo con esplenocitos provenientes de ratones eutímicos, tanto IgM como bajos niveles de IgG2a, IgG2b e IgG3 fueron detectados a los 7 días del cultivo, indicando que, si bien la colaboración de linfocitos T es necesaria para inducir una respuesta de anticuerpos IgG anti-VFA, la misma no se encuentra restringida por moléculas del CMH de clase II.

La capacidad de CDs incubadas con el VFA inactivado de estimular la producción de anticuerpos anti-VFA fue significativamente menor a la de las CDs infectadas. Bajos niveles de anticuerpos IgM fueron detectados únicamente a partir del séptimo día del inicio del co-cultivo (Fig. 9 A1; B1 y C1), y la única subclase de IgG inducida en este momento fue IgG2a, tanto en los co-cultivos realizados con esplenocitos autólogos así como con alogeneicos (Fig 9; A2; B2 y C2). Es importante destacar que en todos los casos mencionados, los anticuerpos secretados presentaban actividad neutralizante contra el VFA.



En conjunto, estos resultados demuestran que las CDs infectadas con VFA tienen la capacidad de estimular una rápida producción de IgM, la cual es secretada en forma TI por los linfocitos B del bazo. Más aun, las CDs infectadas estimulan una respuesta de IgG que no está restringida por moléculas del CMH de clase II. Sin embargo, la producción de IgG no tiene lugar en los ratones atímicos, indicando la necesidad de colaboración T para inducir este proceso. En comparación a la respuesta inducida por CDs pulsadas con UV-VFA, las CDs infectadas inducen una respuesta de mayor magnitud y cualitativamente diferente (evaluada por el perfil de isotipos).

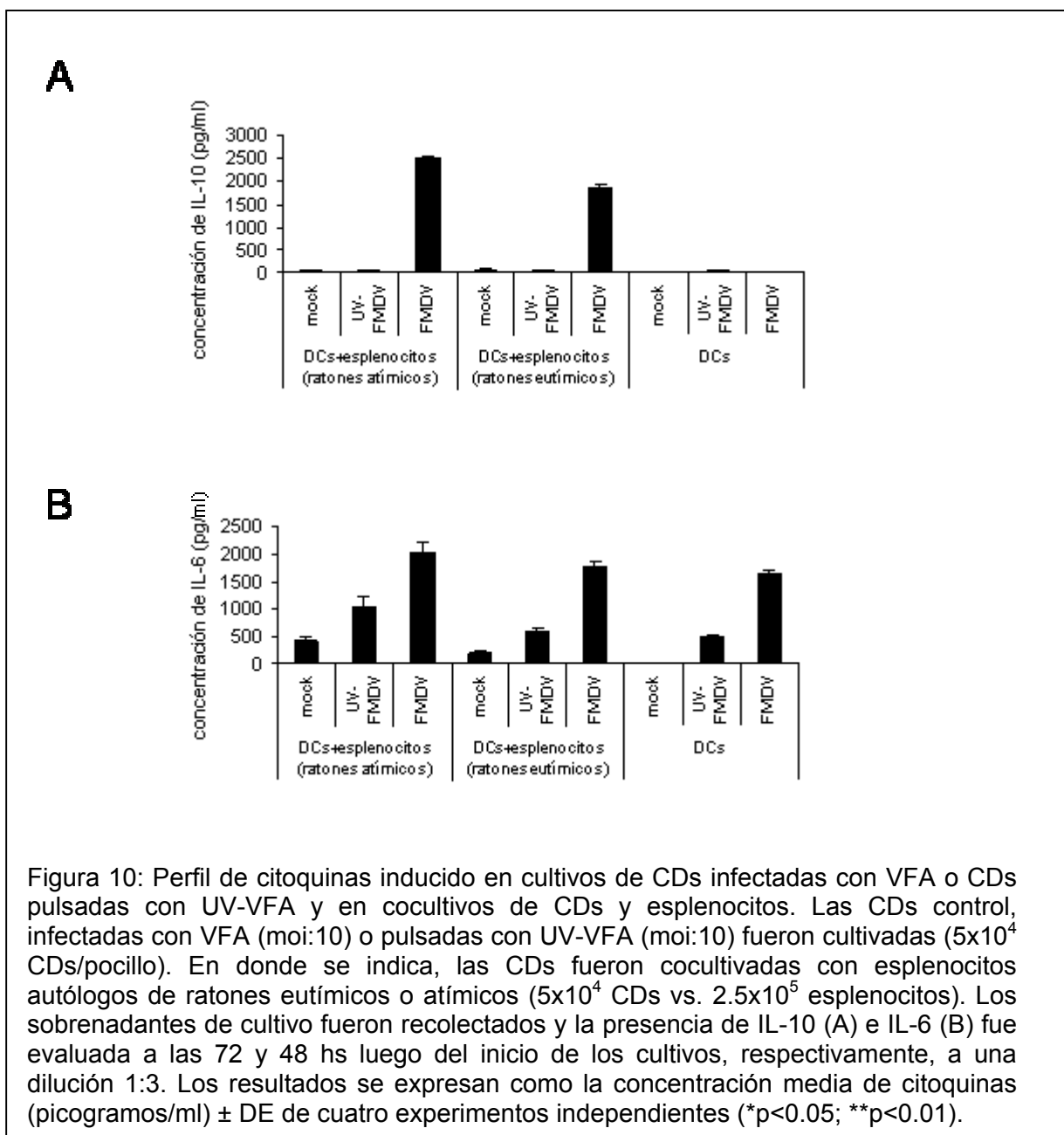
### **8. IL-10 e IL-6 son necesarias para inducir una rápida respuesta timo-independiente contra el Virus de la Fiebre Aftosa en co-cultivos de CDs infectadas y esplenocitos**

Con el objetivo de determinar si las diferencias en la magnitud de la respuesta de anticuerpos inducida por CDs infectadas con VFA o CDs incubadas con VFA inactivado se deben a un perfil de secreción de citoquinas diferencial, la producción de IL-10 e IL-6, dos citoquinas estimuladoras de linfocitos B y de la producción de anticuerpos, fue evaluada en sobrenadantes obtenidos de co-cultivos de CDs y esplenocitos, provenientes tanto de ratones eutímicos como de ratones atímicos.

La IL-10 fue detectada en los sobrenadantes de co-cultivos de CDs infectadas y esplenocitos, tanto de ratones eutímicos y de los atímicos (Fig. 10 a). Estos resultados indican que, a pesar de que las CDs infectadas con VFA no producen IL-10 (Fig. 5 b), estimulan la producción de esta citoquina por esplenocitos. Habiendo observado que los esplenocitos provenientes tanto de ratones eutímicos como atímicos produjeron niveles similares de IL-10, resulta evidente que esta citoquina no es producida por los linfocitos T sino por otra población celular presente en el bazo.

Tal como fue descrito anteriormente (Fig. 5b), las CDs infectadas secretan IL-6. Dado que la producción de esta citoquina no aumenta en los sobrenadantes provenientes de los co-cultivos tanto de ratones eutímicos como atímicos (Fig 10 b), esta observación indicaría que las CDs infectadas

con VFA son la principal fuente de IL-6 en los mismos. Como fue mencionado anteriormente, en los co-cultivos de CDs pulsadas con UV-VFA, no se indujo la producción de IL-10 por los esplenocitos (Fig 10 a).



El papel desempeñado por la IL-10 y la IL-6 en la inducción de la respuesta de anticuerpos TI contra VFA fue posteriormente evaluada. Con este fin, anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante anti-IL-10 y anti-IL-6 fueron agregados a los co-cultivos. Posteriormente, la producción de anticuerpos anti-VFA de isotipo IgM en los sobrenadantes fue dosada mediante

un ELISA. La neutralización de estas citoquinas inhibió significativamente la secreción de anticuerpos anti-VFA inducida por CDs infectadas (Fig. 11). En cambio, la neutralización de IFN- $\gamma$ , otra citoquina presente en los co-cultivos de CDs infectadas y esplenocitos (Fig. 5c), no tuvo efecto sobre la producción de anticuerpos específicos.

Por el contrario, cuando los co-cultivos fueron estimulados con el VFA inactivado, la neutralización de la IL-6 redujo la secreción de anticuerpos, mientras que la neutralización de la IL-10 no tuvo ningún efecto.

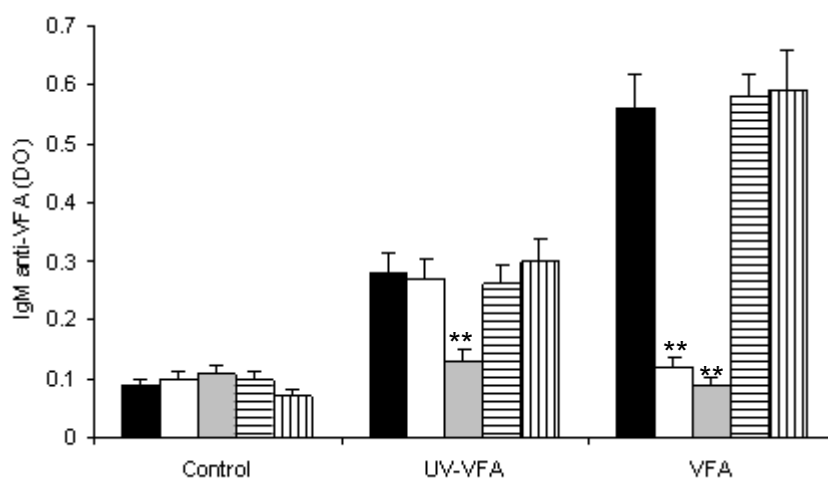


Figura 11: Papel desempeñado por IL-10 e IL-6 en la estimulación de la secreción de anticuerpos anti-VFA inducidos por CDs infectadas con VFA o pulsadas con UV-VFA cocultivadas con esplenocitos. Las CDs control, infectadas con VFA (moi:10) o pulsadas con UV-VFA (moi:10) fueron cocultivadas con esplenocitos autólogos provenientes de ratones BALB/c ( $5 \times 10^4$  CDs vs.  $2.5 \times 10^5$  esplenocitos). Medio de cultivo (■) o anticuerpos neutralizantes anti IL-10 (□), anti IL-6 (■) o anti IFN- $\gamma$  (barra con líneas horizontales), así como los respectivos controles de isotipos (barra con líneas verticales) fueron agregados al comienzo del cocultivo (10 ug/ml). Los sobrenadantes de los cultivos fueron recolectados al día 7 luego del inicio del cocultivo y la presencia de anticuerpos IgM anti-VFA fue evaluada por un ELISA sándwich. Los resultados se expresan como la DO media  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



En conjunto, estos resultados indican que la IL-6, producida por las CDs luego de ser infectadas o de haber internalizado el virus inactivado por radiación UV, y la IL-10, secretada por las células de bazo en presencia de CDs infectadas con VFA, estimulan a los linfocitos B a producir anticuerpos IgM específicos. En cambio, en los co-cultivos de esplenocitos y CDs pulsadas con UV-VFA, solamente la IL-6 juega un papel inductor de la respuesta de anticuerpos. Por el contrario, la IL-10 no participa en la producción de anticuerpos contra el virus inactivado, indicando que esta citoquina estaría involucrada únicamente en la respuesta humoral generada en condiciones de infección, pero no en condiciones de vacunación con virus inactivado.

### **9. La respuesta de anticuerpos timo-independiente luego de la infección con el Virus de la Fiebre Aftosa es producida en el bazo**

La capacidad de producir anticuerpos TI contra antígenos polisacáridos de tipo 2 es considerablemente mayor en el bazo que en los ganglios linfáticos (Garg et al., 1994). Con el objetivo de determinar si la producción de anticuerpos TI contra VFA también se encuentra restringida al bazo, esplenocitos o células de los ganglios inguinales fueron co-cultivados *in vitro* con CDs infectadas con VFA o con CDs incubadas con virus inactivado. La producción de anticuerpos se evaluó en los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante la técnica de ELISA.

La producción de IgM específica fue significativamente mayor cuando los co-cultivos involucraron a las células esplénicas que a las de ganglio, tanto cuando se utilizaron como estimuladoras a las CDs infectadas así como a las incubadas con VFA inactivado con UV. (Fig. 12, A1 y B1). Aun cuando la cantidad de células provenientes de los ganglios axilares se duplicó, la secreción de IgM continuó siendo menor que en los co-cultivos con esplenocitos, indicando que los resultados anteriores no se deben a diferencias en la proporción de linfocitos B presentes en cada órgano.

La producción de IL-10 en los co-cultivos de CDs con esplenocitos o células de ganglios linfáticos fue subsecuentemente evaluada. Mientras que las CDs infectadas con VFA estimularon la producción de altas cantidades de IL-10

en los sobrenadantes de co-cultivos realizados con esplenocitos, esta citoquina no fue detectada en co-cultivos realizados con células de ganglio axilares (Fig. 12, A2 y B2). Finalmente, ni los esplenocitos ni las células de ganglio produjeron IL-10 luego de ser estimuladas con CDs pulsadas con UV-VFA.

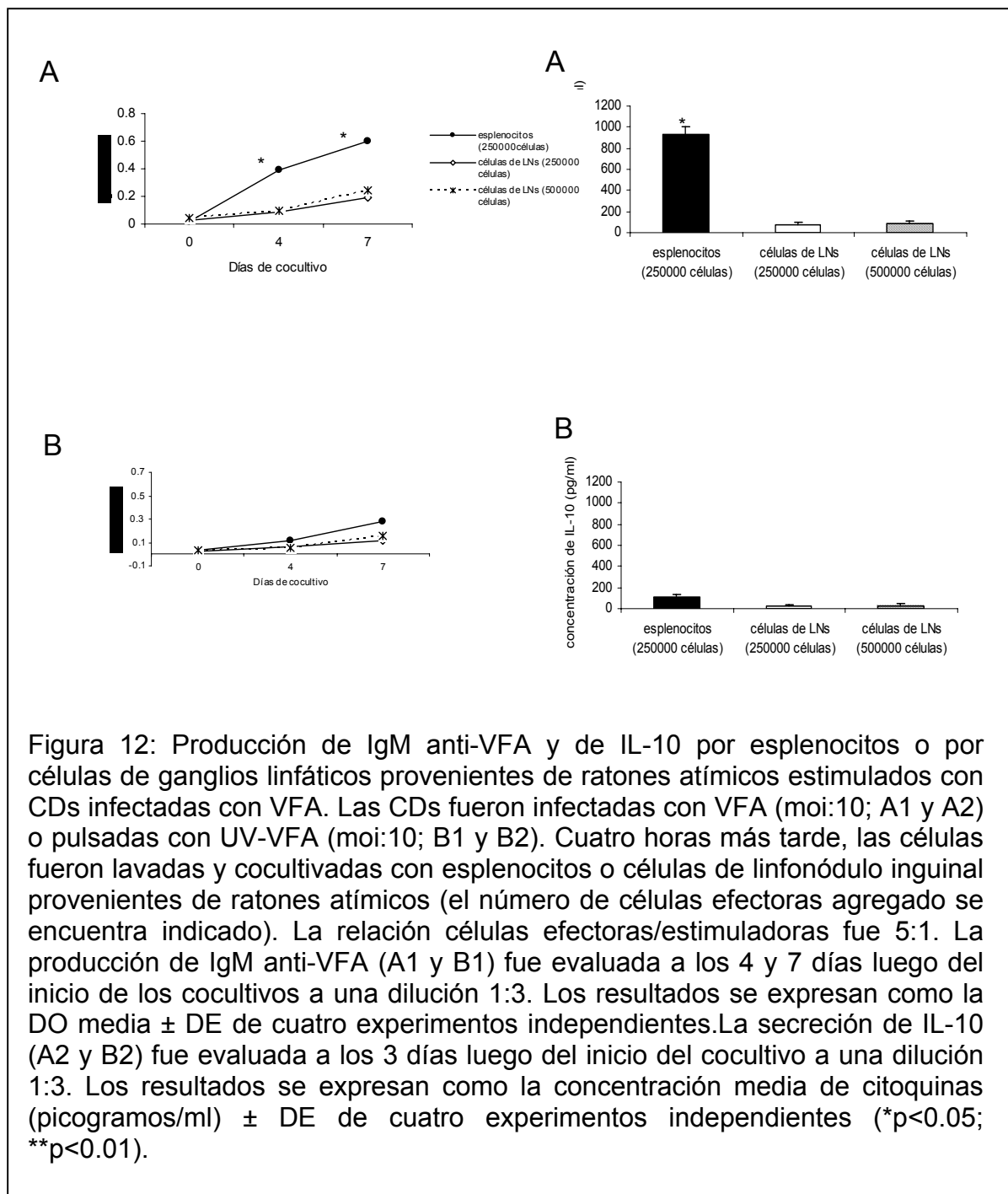


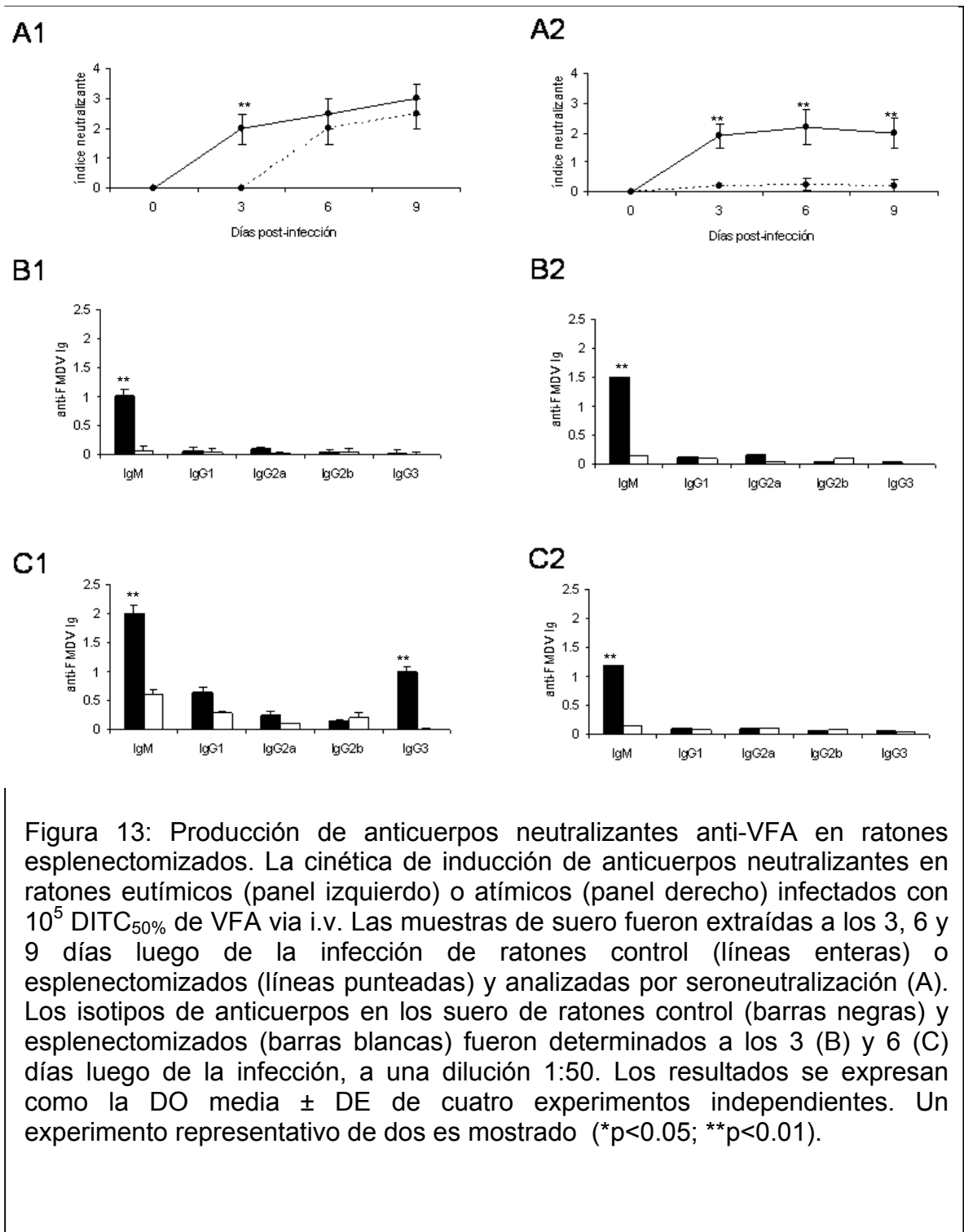
Figura 12: Producción de IgM anti-VFA y de IL-10 por esplenocitos o por células de ganglios linfáticos provenientes de ratones atímicos estimulados con CDs infectadas con VFA. Las CDs fueron infectadas con VFA (moi:10; A1 y A2) o pulsadas con UV-VFA (moi:10; B1 y B2). Cuatro horas más tarde, las células fueron lavadas y cocultivadas con esplenocitos o células de linfonódulo inguinal provenientes de ratones atímicos (el número de células efectoras agregado se encuentra indicado). La relación células efectoras/estimuladoras fue 5:1. La producción de IgM anti-VFA (A1 y B1) fue evaluada a los 4 y 7 días luego del inicio de los cocultivos a una dilución 1:3. Los resultados se expresan como la DO media  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes. La secreción de IL-10 (A2 y B2) fue evaluada a los 3 días luego del inicio del cocultivo a una dilución 1:3. Los resultados se expresan como la concentración media de citoquinas (picogramos/ml)  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

En conjunto, estos resultados indican que los linfocitos B del bazo, pero no los presentes en los ganglios linfáticos, tienen la capacidad de producir anticuerpos TI contra el VFA. Este hecho podría estar asociado a la incapacidad de las células provenientes de los ganglios linfáticos de secretar IL-10 luego de ser estimuladas con CDs infectadas con el VFA.

El papel desempeñado por los distintos órganos linfáticos secundarios en el desarrollo de la respuesta temprana contra VFA luego de la infección fue entonces evaluado *in vivo* utilizando ratones esplenectomizados y posteriormente infectados con VFA. Se utilizaron tanto ratones eutímicos como atímicos.

Mientras que en los ratones eutímicos control (no esplenectomizados) se detectaron anticuerpos neutralizantes del VFA a partir del día 3 post-infección, en los ratones eutímicos esplenectomizados no se produjeron anticuerpos neutralizantes hasta el día 6 luego de la infección (Fig 13, A1). La esplenectomía no sólo retrasó la producción de anticuerpos neutralizantes, sino que también modificó el perfil de isotipos inducido en la respuesta. En este sentido, los ratones control infectados produjeron IgM a los 3 días pi (Fig 13, B1) e IgM, IgG1 e IgG3 a los 6 días (Fig 13, C1). En cambio, sólo IgM e IgG1 fueron producidas por ratones esplenectomizados, no así IgG3, (Fig. 13, C1).

La relevancia del papel desempeñado por el bazo en la producción de la respuesta de anticuerpos TI contra el VFA fue confirmada mediante el estudio de la respuesta de anticuerpos producida luego de la infección de ratones atímicos esplenectomizados. Tal como había sido reportado anteriormente (Borca et al., 1986), ratones atímicos control (no esplenectomizados) produjeron anticuerpos anti-VFA neutralizantes que fueron detectados a partir del tercer día luego de la infección. En cambio, los ratones atímicos esplenectomizados no produjeron anticuerpos neutralizantes, ni aun al día 9 pi. (Fig. 13, A2). El único isotipo detectado en los ratones atímicos control fue IgM, tanto a los 3 (Fig. 13, B2) como a los 6 (Fig. 13, C2) días pi.



En conjunto, estos resultados indican que el bazo es el principal órgano linfático secundario con la capacidad de generar una rápida respuesta de anticuerpos TI contra el VFA. En cambio, la producción de anticuerpos en otros órganos linfáticos secundarios requiere la colaboración de células T. Por lo tanto, los ratones eutímicos esplenectomizados producen anticuerpos en forma

retrasada y los atímicos esplenectomizados no responden. Finalmente, los isotipos de los anticuerpos producidos son diferentes, dependiendo del órgano linfático secundario donde es inducida la respuesta.

#### **10. Células CD9+ son las principales productoras de anticuerpos timo-independientes contra el Virus de la Fiebre Aftosa y de la secreción de IL-10 en los bazos de ratones infectados**

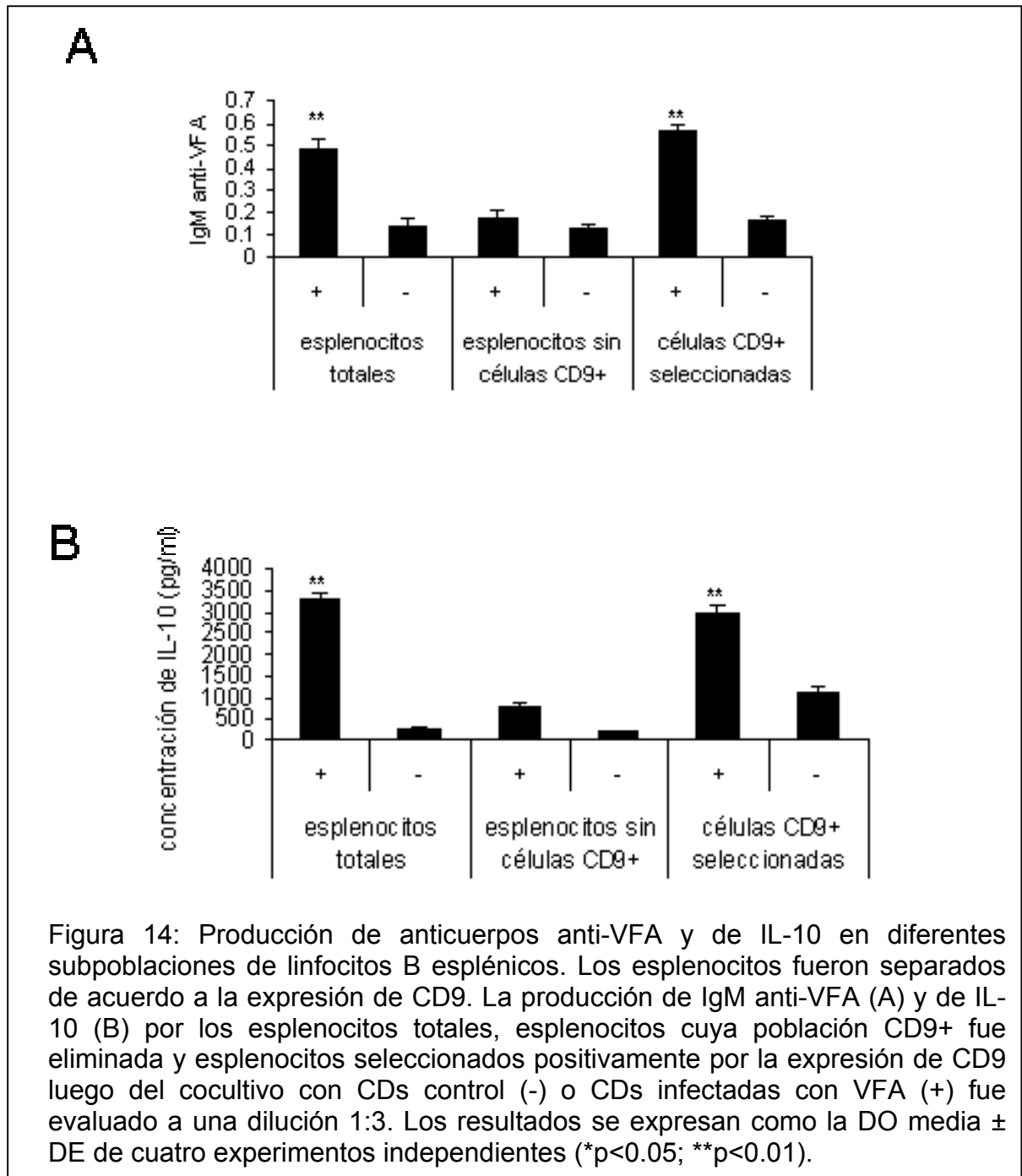
Con el objetivo de determinar la subpoblación de linfocitos B involucrada en la producción de anticuerpos TI contra VFA, se procedió a un estudio más detallado de la participación de los linfocitos B1 y linfocitos B de la ZM del bazo en el desarrollo de esta respuesta. Estas subpoblaciones constituyen los linfocitos B de tipo innato, y ambas han sido involucradas en la respuesta temprana contra otros patógenos.

Las subpoblaciones de linfocitos B de la ZM y B1 fueron separadas de los linfocitos B2 mediante la utilización de un anticuerpo dirigido contra la molécula CD9, presente solamente en la superficie de los linfocitos B1 y BZM (Won et al., 2002). Las poblaciones celulares obtenidas luego de la purificación a través de microesferas inmunomagnéticas, fueron seguidamente estimuladas con CDs infectadas con el VFA. Posteriormente, se evaluó la producción de anticuerpos anti-VFA en los sobrenadantes de los cultivos (Fig 14 A). En concordancia con los resultados mostrados en la Figura 9, los esplenocitos totales rápidamente produjeron IgM anti-VFA. Una respuesta similar fue observada cuando la población seleccionada positivamente para la expresión de CD9 fue co-cultivada con CDs infectadas. En cambio, los esplenocitos de la población seleccionada negativamente para la expresión del CD9 (esplenocitos sin los linfocitos B1 o de ZM), no secretaron anticuerpos anti-VFA luego de la estimulación.

La secreción de IL-10 en estos grupos de células fue luego analizada (Fig 14 B), encontrándose que esta citoquina fue producida por la población de esplenocitos totales y por la población que fue positivamente seleccionada

(CD9+). Por el contrario, no fue secretada por la población en donde las células CD9+ fueron removidas por selección negativa.

Estos resultados indican que los linfocitos B CD9+, pero no los linfocitos B2, participan en la respuesta rápida de anticuerpos TI contra el VFA. Más aun, las células CD9+ son la principal fuente de IL-10 luego de la estimulación con CDs infectadas con el virus.



## **11. La eliminación funcional de los linfocitos B de la zona marginal reduce la producción temprana de IgM e IgG3 contra el Virus de la Fiebre Aftosa**

Los linfocitos B de la zona marginal se eliminaron funcionalmente por inoculación endovenosa de la toxina pertussis (PTx). La eliminación de estos linfocitos fue confirmada por la reducción en el porcentaje de células con el fenotipo B220<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>, analizada por citometría de flujo (Fig. 15 A). A las 48 hs. posteriores al tratamiento con la toxina, los ratones fueron infectados o vacunados con VFA inactivado, y la respuesta de anticuerpos anti-VFA fue evaluada a los 5 días pi. Los ratones tratados con PTx e infectados produjeron significativamente menos IgM (Fig. 15 B) e IgG3 séricas (Fig. 15 C) que los ratones infectados pero no tratados con PTx. En cambio, no se detectaron diferencias en los títulos de anticuerpos cuando se comparó la respuesta de los ratones vacunados con VFA inactivado. Estos resultados indican que el VFA inactivado y el infeccioso impactan en diferentes compartimentos del sistema inmune, y que los linfocitos B de la zona marginal están involucrados en la producción temprana de anticuerpos anti-VFA luego de la infección pero no de la vacunación.

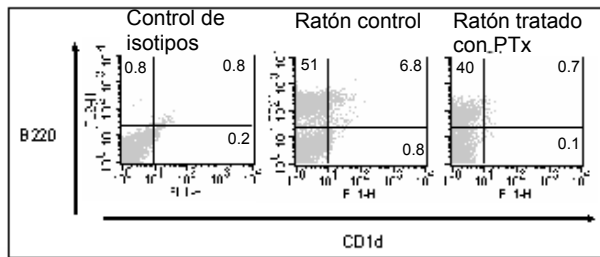
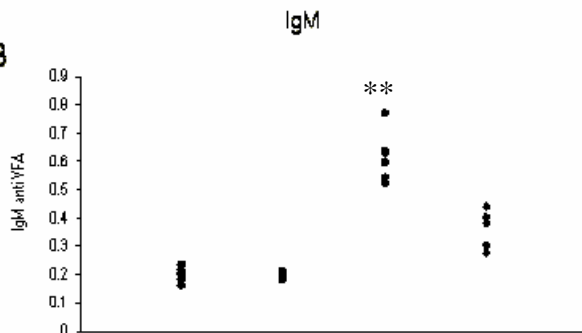
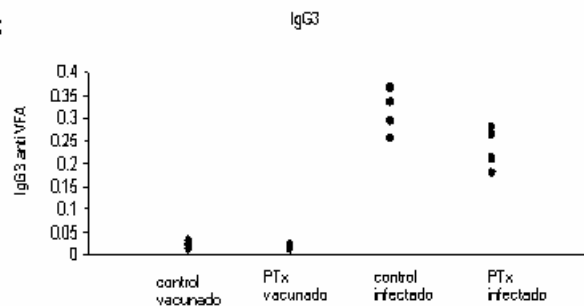
**A****B****C**

Figura 15: Papel desempeñado por los linfocitos B de ZM en la producción de anticuerpos anti-VFA in vivo. Ratones fueron inoculados con PTx para eliminar funcionalmente los linfocitos B de ZM, o con PBS como control. A las 48 hs del tratamiento, la eliminación de los linfocitos B de ZM fue confirmada mediante citometría de flujo, analizando la expresión de B220 y CD1d (a). Los ratones fueron entonces infectados con VFA o vacunados con VFA inactivado. La producción de IgM (b) y de IgG3 séricas fue evaluada a los 5 días luego de la inoculación, utilizando una dilución 1:50 de los sueros. Los resultados se expresan como DO. Se muestra un experimento representativo de 4 (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



## **DISCUSIÓN**

## **DISCUSIÓN**

### **Diferencias en la respuesta inmune contra VFA infeccioso e inactivado**

La respuesta inmune inducida luego de la infección de ratones con el VFA prosigue un desarrollo que presenta importantes diferencias con respecto a la respuesta inducida luego de la vacunación con virus inactivado. Previo al inicio de este trabajo de tesis, había sido descrito que las principales discrepancias se establecían en tres aspectos centrales: el grado de independencia de colaboración T para la producción de anticuerpos protectores, el perfil de isotipos inducido, y la duración de la memoria inmunológica.

- Grado de independencia de colaboración T para la producción de anticuerpos protectores.

Mientras que la respuesta humoral inducida por la infección con el VFA comienza a desarrollarse en forma TI, permitiendo la producción de anticuerpos protectores a los dos días post-infección, la respuesta contra virus inactivado requiere de la colaboración de linfocitos T desde el inicio y, por lo tanto, la aparición de anticuerpos capaces de controlar la infección demanda más tiempo (Lopez et al., 1990; Piatti et al 1991).

- Perfil de isotipos inducido

La infección se caracteriza por la inducción de IgG1 e IgG3 desde los 7 días post-infección y de altos niveles de IgG2b (y menores de IgG2a) a partir de los 14 días pi. Contrariamente, la vacunación induce principalmente IgG1 e IgG2a (Perez Filgueira et al., 1997).

- Duración de la memoria inmunológica

Mientras la infección induce inmunidad de larga duración, la cual se manifiesta por la presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes en suero, la vacunación sólo genera memoria de corto plazo (Lopez et al., 1990; Wigdorowitz et al., 1997).

La existencia de estas diferencias sugiere que la activación del sistema inmune luego de la infección o de la vacunación con VFA inactivado se produce por distintas vías. En consideración del importante papel que desempeñan las CD4 en la activación y definición del perfil que adquirirán las respuestas inmunes adaptativas, uno de los objetivos principales de esta tesis consistió en estudiar la modulación de la funcionalidad de estas células luego de la interacción con el virus infeccioso o inactivado. Asimismo, se comparó la capacidad de las CD4 infectadas con VFA y de las CD4 incubadas con VFA inactivado para estimular y modular la función de los linfocitos T y de distintas subpoblaciones de linfocitos B.

#### *Interacción entre VFA y CD4. Inhibición de las respuestas timo-dependientes*

En los resultados presentados en esta tesis, se demuestra que el VFA ingresa en las CD4 y replica su ARN produciendo la forma replicativa, la cual contiene a la cadena de ARN de sentido negativo (Fig. 1). Sin embargo, la producción de nuevos viriones infecciosos no fue detectada en los sobrenadantes de CD4 infectadas, indicando que la replicación prosigue un curso abortivo en estas células. A diferencia de lo observado en líneas celulares epiteliales, en las que el VFA es altamente citopático, en las CD4 no se ha observado un aumento de la mortalidad celular, evaluada tanto por inducción de necrosis como de apoptosis (Fig. 2).

El VFA utiliza principalmente tres integrinas  $\alpha_v$  integrinas ( $\alpha_v\beta1$ ,  $\alpha_v\beta3$  y  $\alpha_v\beta6$ ) como receptores para el ingreso a las células (Jackson et al., 2002; Berinstein et al., 1995; Jackson et al., 2000). La expresión de la integrina  $\alpha_v\beta5$  ha sido determinada en CD4 murinas (Schulz et al., 2002). Por lo tanto, es

posible que el VFA inicie la infección de las CD4 a través de la interacción con esta integrina. Sin embargo, otros mecanismos de ingreso del virus a la célula, tales como el ingreso por macropinocitosis, no pueden ser descartados.

La inhibición de la replicación viral en CD4 se observa frecuentemente en la infección con diversos tipos de virus. Por ejemplo, ha sido descrito que CD4 pueden inhibir la replicación de los virus vaccinia (Engelmayer et al., 1999), influenza (Cella et al., 1999), HIV (Granelli-Piperno et al., 1998) y VSV (Ludewig et al., 2000). El principal mecanismo celular involucrado en el control de las infecciones es la producción de interferones tipo 1 (Ludewig et al 2000; Ghanekar et al., 1996; Chinsangaram et al., 2001). En el caso del VFA, recientemente ha sido descrito que este virus infecta abortivamente CD4 porcinas, siendo la secreción constitutiva de IFN- $\alpha$  el principal mecanismo involucrado en la contención de la infección (Bautista et al., 2005).

Los datos mostrados en la presente tesis indican que, luego de la infección con VFA, las CD4 se diferencian hacia un fenotipo macrofágico. Dicha diferenciación ha sido evidenciada a través de cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales en las células infectadas (Fig. 3 y 4). La conversión de CD4 hacia células con características de macrófagos ha sido previamente descrita para CD4 humanas luego de la remoción de GM-CSF e IL-4 del medio de cultivo (Palucka et al., 1998). Asimismo, diferentes estímulos, tales como IL-6 (Chomarat et al., 2000), M-CSF (Menetrier-Caux et al., 1998), factor de crecimiento del endotelio vascular (Gabrilovich et al., 1996), IFN- $\gamma$  (Delneste et al., 2003) y antagonistas del receptor AT1 de angiotensina II (Nahmod et al., 2003), inducen un cambio en la vía de diferenciación de células progenitoras, las cuales ven favorecida su diferenciación hacia células macrofágicas en detrimento de la diferenciación hacia CD4. Como consecuencia, las células producidas resultan pobres estimuladoras de la proliferación de linfocitos T. Los resultados presentados aquí demuestran que la infección con VFA también es un estímulo que induce la diferenciación de CD4 hacia células con características de macrófagos, con la subsiguiente disminución en la habilidad de las mismas para estimular linfocitos T (Fig. 5).

La incapacidad de las CD4 infectadas con VFA para activar linfocitos T se asocia con la producción de IL-10 en co-cultivos de CD4 y esplenocitos

realizados *in vitro*. La inhibición de respuestas de linfocitos T por IL-10 ha sido ampliamente caracterizada (de Waal Malefyt et al., 1998), y ha sido reportada en varias infecciones virales. Por ejemplo, en co-cultivos de linfocitos T y CDs infectadas con HIV, se induce la producción de IL-10, la cual subsecuentemente produce depresión de la proliferación de linfocitos T alogeneicos en cultivos mixtos de linfocitos (Granelli-Piperno et al., 2004).

La supresión de la funcionalidad de los linfocitos T por CDs infectadas con VFA también fue demostrada *in vivo*. Luego de la transferencia adoptiva por vía intra-peritoneal de CDs infectadas a ratones receptores previamente inmunizados con VFA, no es posible estimular una respuesta secundaria (Fig. 6). Asimismo, durante la infección aguda con VFA, la producción de anticuerpos contra OVA, un antígeno TD, también se encuentra inhibida. Contrariamente, la producción de anticuerpos contra antígenos TI, tales como Dextrán-500 o el propio VFA, no se encuentra afectada por la infección (Fig. 8). Por último, entre los días 3 y 5 post-infección con VFA, se observa una inhibición generalizada de la funcionalidad de los linfocitos T esplénicos, los cuales no responden a la estimulación con Con A, un mitógeno de linfocitos T (Fig. 7). La falta de respuesta a la estimulación con Con A coincide temporalmente con el pico de secreción de IFN- $\gamma$  e IL-10 por los esplenocitos de ratones infectados (Fig. 7).

En conjunto, la serie de datos presentada anteriormente indica que el desarrollo de una rápida respuesta de anticuerpos TI contra VFA se produce en un contexto de depresión de la funcionalidad de linfocitos T. La revisión de la bibliografía referente a la respuesta inmune inducida por el VFA en sus huéspedes naturales sugiere que una situación similar también ocurriría en porcinos y bovinos infectados. Por ejemplo, cerdos infectados con el VFA rápidamente eliminan la viremia mediante la producción de anticuerpos neutralizantes (Chinsangaram et al., 2003), los cuales son producidos simultáneamente con un estado transitorio de inmunosupresión de las respuestas T (Bautista et al., 2003). Asimismo, ha sido postulado que en etapas tempranas de la infección de bovinos con el VFA, la importante respuesta de anticuerpos inducida no guarda relación con la pequeña respuesta celular observada (García-Valarcel et al., 1996). Por lo tanto, es

posible que los mecanismos postulados en este trabajo de tesis como reguladores de la rápida producción de anticuerpos TI anti-VFA en forma simultánea con una inhibición generalizada de respuestas TD sean similares a aquellos que tienen lugar en los huéspedes naturales de VFA.

#### *Inducción de la producción de anticuerpos timo-independientes por CDs infectadas con VFA*

A pesar de la disminuida capacidad de las CDs infectadas con VFA para estimular linfocitos T, nuestros resultados indican que la habilidad de estas células para estimular la producción de anticuerpos TI *in vitro* es significativamente superior a la de las CDs pulsadas con el virus inactivado. La respuesta inducida por las CDs infectadas es más rápida y de mayor intensidad, en comparación a la respuesta inducida por CDs que han internalizado al virus inactivado (Fig. 9). Dado que el VFA no replica productivamente en las CDs, y considerando que la cantidad de partículas virales añadidas en ambos tratamientos fue la misma (10 DITC50/célula), las diferencias observadas entre las respuestas de anticuerpos inducidas por los dos tratamientos no podrían ser explicadas por diferencias en la cantidad de antígeno. En cambio, estas diferencias probablemente reflejen la activación de linfocitos B por distintos mecanismos, o bien, la estimulación de diferentes subpoblaciones de linfocitos B. En este sentido, la producción de IL-10 exclusivamente en los co-cultivos estimulados con CDs infectadas con VFA, pero no en los co-cultivos estimulados con CDs que internalizaron VFA inactivado (Fig. 5 y 10), podría ser responsable de las diferencias en la cinética y en el perfil de isotipos inducidos por estas CDs. En efecto, IL-10, además de regular negativamente el desarrollo de respuestas TD, es un importante estimulador de las respuestas humorales. Por ejemplo, IL-10 actúa como un factor de crecimiento para linfocitos B (Go et al., 1990), induce el desarrollo de células plasmáticas (Choe et al., 1998; Zhang et al., 2001) y regula el cambio de isotipos (Malisan et al., 1996; Shparago et al., 1996). En relación con la inducción de anticuerpos anti-VFA, los datos presentados en la Figura 11 indican que la neutralización funcional de la IL-10

reduce considerablemente la secreción de anticuerpos contra este virus, señalando que esta citoquina cumple un papel central en la inducción de esta respuesta anti-viral. Asimismo, nuestros datos demuestran que otra citoquina responsable de la mayor y más rápida respuesta de anticuerpos observada luego de la estimulación de esplenocitos con CDs infectadas que con CDs pulsadas con VFA inactivado, es la IL-6. La infección de CDs conduce a la secreción de mayor cantidad de IL-6, en comparación a la secretada luego de incubar las CDs con virus inactivado. El importante papel desempeñado por esta citoquina en la inducción de la respuesta de anticuerpos anti-VFA *in vitro* también ha sido demostrado mediante la neutralización funcional de la misma, cuyo resultado es una profunda inhibición de la secreción de anticuerpos (Fig. 11). Estos resultados están en concordancia con reportes previos que le adjudican a esta citoquina una alta capacidad estimuladora de la diferenciación de células plasmáticas y de la secreción de anticuerpos (Kawano et al., 1995; Morse et al., 1997, Jego et al., 2003).

La estimulación de esplenocitos con CDs infectadas, además de inducir la rápida secreción de IgM neutralizante, también induce cambio de isotipos hacia IgG (Fig. 9). La producción de anticuerpos anti-VFA de isotipo IgG en los co-cultivos de CDs con esplenocitos alogeneicos provenientes de ratones eutímicos, pero no en los cultivos con esplenocitos autólogos provenientes de ratones atímicos, indica que, en la etapa inicial de la respuesta a VFA, el cambio de isotipo es inducido por colaboración de células T, pero dicha colaboración no se encuentra restringida por moléculas del CMH de clase II. Linfocitos T  $\gamma\delta$  presentes en los esplenocitos alogeneicos provenientes de ratones eutímicos podrían colaborar en la inducción del cambio de isotipos en este caso. Dado que la mayor parte de la población de linfocitos T  $\gamma\delta$  periférica no se encuentra presente en los bazo de ratones atímicos jóvenes (Pardoll et al., 1988), la ausencia de estas células podría ser la causa de la falta de cambio de isotipo observado en estos co-cultivos. En este sentido, el cambio de isotipo hacia IgG mediado por linfocitos T  $\gamma\delta$  durante el desarrollo de una respuesta anti-viral ha sido descrito en el caso de la infección con VSV (Maloy et al., 1998).

La ausencia de secreción de IL-10 en los co-cultivos de CDs infectadas con VFA y células de ganglios linfáticos se asocia con una menor producción de anticuerpos, así como con una cinética de producción retardada, en comparación a la de los co-cultivos de CDs infectadas con VFA y esplenocitos (Fig. 12). Asimismo, esta observación coincide con los datos obtenidos en experimentos realizados *in vivo*, que demuestran que ratones eutímicos esplenectomizados producen una respuesta anti-VFA con cinética retardada y que ratones atímicos esplenectomizados son incapaces de generar anticuerpos anti-VFA (Fig. 13). Por lo tanto, en ausencia del bazo, el desarrollo de la respuesta inmune temprana contra el VFA se encuentra severamente afectado. A pesar de que otros órganos linfáticos pueden desarrollar una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el virus, esta respuesta es estrictamente dependiente de colaboración de linfocitos T, y por lo tanto, demanda mayor tiempo de inducción.

A diferencia del bazo, órgano en el cual se localizan las dos subpoblaciones de linfocitos B de tipo innato, los ganglios linfáticos carecen de estas poblaciones de linfocitos B (Pillai et al., 2005; Berland et al., 2002). La observación de que los linfocitos B presentes en los ganglios linfáticos no producen anticuerpos anti-VFA en forma TI concuerda con reportes previos que indican que las respuestas contra antígenos TI tipo 2 polisacáridos son producidas por esplenocitos pero no por células de ganglios linfáticos (Garg et al., 1994, Goud et al., 1988).

Los linfocitos B de la zona marginal del bazo constituyen la principal población de células B involucrada en la rápida respuesta TI contra bacterias que se diseminan por vía sanguínea (Martin et al., 2001). Asimismo, los linfocitos B de la zona marginal cumplen un importante papel en la producción temprana de anticuerpos neutralizantes luego de la infección con VSV (Ochsenbein et al., 1999) y contra partículas tipo virus (Gatto et al., 2004). El bajo umbral de activación, el enriquecimiento de clones específicos para el reconocimiento de antígenos TI y la ubicación particular de estas células dentro del sistema circulatorio esplénico (la cual les permite el rápido encuentro con antígenos distribuidos por vía sanguínea) explicaría el papel central de este subgrupo de linfocitos B en la inducción de las respuestas de anticuerpos TI



(Balazs et al., 2002, Martin et al., 2000). Sin embargo, ha sido demostrado mediante experimentos realizados *in vitro* que el entrecruzamiento del BCR con anticuerpos anti-IgM no es suficiente para inducir la proliferación de los linfocitos B de la zona marginal (Oliver et al., 1997). En cambio, para activar estas células, la señalización a través del BCR debe asociarse con señales co-estimuladoras (Martin et al., 2001). Dicha co-estimulación puede ser producida por ligandos de TLRs (Pillai et al., 2005). Por ejemplo, linfocitos B de la ZM en ratones que padecen lupus son activados por oligodeoxinucleótidos que contienen motivos CpG, un ligando del TLR-9. Esta estimulación produce como resultado la secreción de IL-10, el aumento de la expresión de CD86 y CD25 y la secreción policlonal de anticuerpos (Brummel et al., 2005). Alternativamente, las señales co-estimuladoras para los linfocitos B podrían provenir de las CDs. A modo de ejemplo, ha sido reportado que los linfocitos B de la ZM se diferencian rápidamente a células plasmáticas luego de la estimulación con el factor activador de células B (BAFF) y con el ligando inductor de proliferación (APRIL) secretados por CDs sanguíneas (Balazs et al., 2002). Estas células poseen un fenotipo caracterizado por la baja expresión de CD11c, MHC clase II y CD40 y la alta expresión de CD11b, y funcionalmente se caracterizan por su alta capacidad fagocítica (Balazs 2002). Interesantemente, las CDs derivadas de médula ósea adquieren un fenotipo muy similar luego de la infección con VFA.

Los resultados mostrados en esta tesis indican que las CDs infectadas con VFA, pero no las células cargadas con UV-VFA, estimulan linfocitos B CD9+ a producir rápidamente anticuerpos TI contra el virus, así como IL-10 (Fig. 14). Por lo tanto, el estado de activación de las CDs determinaría el tipo de respuesta que los linfocitos B desarrollarán contra el VFA infeccioso o inactivado. Por otro lado, nuestros datos indican que no todas las subpoblaciones de linfocitos B responden de igual manera frente al VFA infeccioso. La eliminación funcional de los linfocitos B de zona marginal mediante el tratamiento con PTx produce como resultado una disminución de la respuesta de anticuerpos contra VFA infeccioso *in vivo* (Fig. 15), indicando que la población de linfocitos B de la ZM cumple un importante papel en el desarrollo de esta rápida respuesta. Por el contrario, los linfocitos B2 foliculares,

no afectados por este tratamiento, participan en un grado notoriamente menor en el establecimiento de la respuesta inmune inicial contra el VFA. La respuesta de anticuerpos remanente que se observa en los ratones tratados con la PTx y luego infectados con VFA podría ser producida por la otra subpoblación de linfocitos B de tipo innato,, los linfocitos B1 de las cavidades serosas. Sin embargo, esta hipótesis aún requiere ser comprobada.

En síntesis, la observación de que el VFA infeccioso modula la funcionalidad de las CDs de forma diferente a como lo hace el VFA inactivado, conjuntamente con los datos que indican la participación diferencial de distintas subpoblaciones de linfocitos B en la respuesta contra estos dos antígenos, podrían constituir el fundamento inmunológico de la mayor y más rápida producción de anticuerpos anti-VFA que se observa en ratones infectados, en comparación con los ratones vacunados con VFA inactivado.

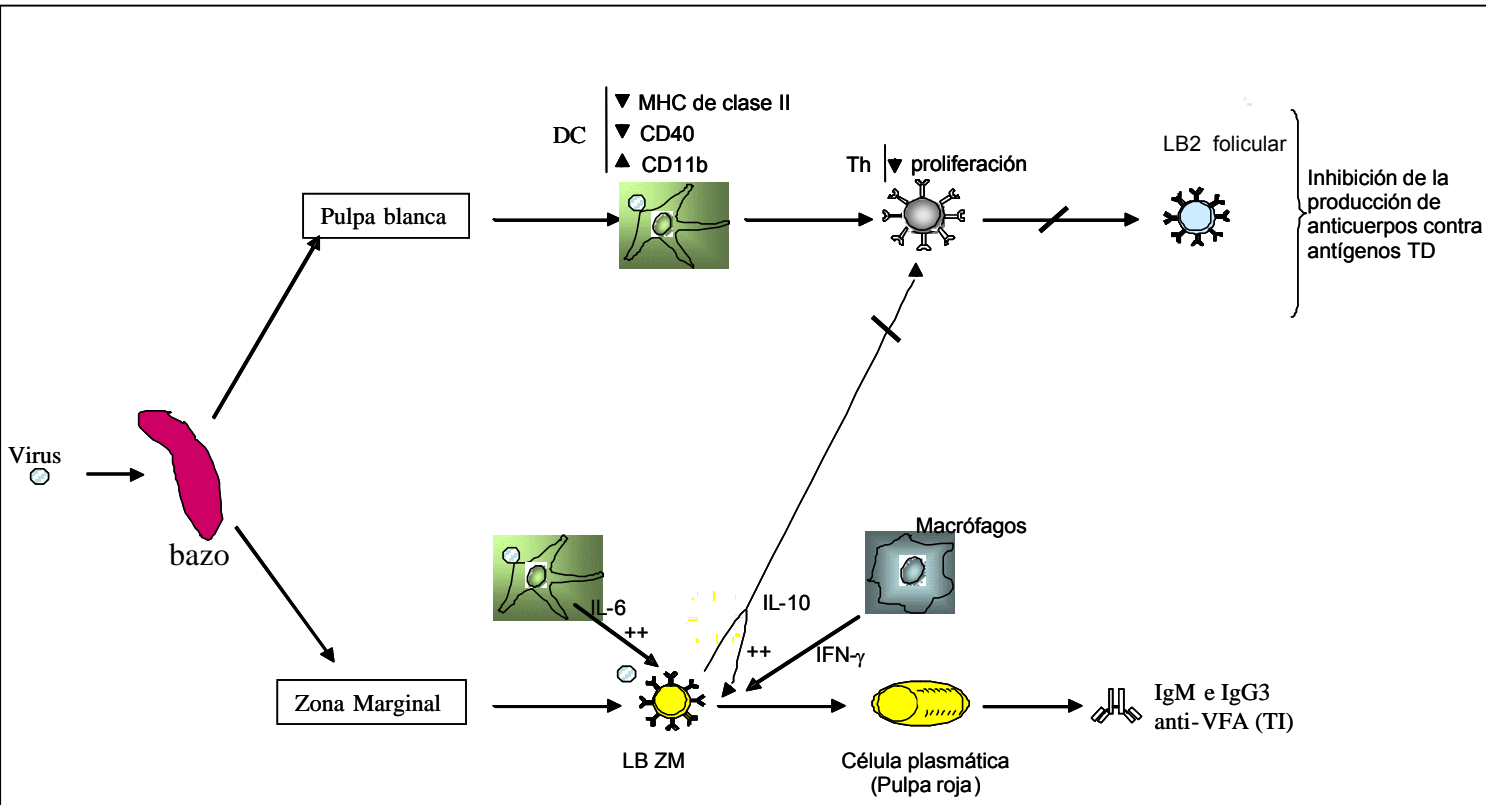
*Modelo de trabajo: la respuesta inmune contra VFA se desarrolla en dos etapas*

Los datos presentados en este trabajo de tesis, conjuntamente con información previa referente a la respuesta inmune contra el VFA en el modelo experimental murino, sugieren que la respuesta inmune inducida por la infección con VFA se desarrolla en dos etapas diferenciadas y sucesivas, aunque solapadas. La primera etapa transcurre durante los primeros seis días post-infección y se caracteriza por la producción de anticuerpos neutralizantes en forma TI. Esta respuesta se desarrolla en un contexto de depresión de la funcionalidad de linfocitos T y, por lo tanto, de inhibición del desarrollo de respuestas TD. En la segunda etapa, la funcionalidad de los linfocitos T se recupera. Simultáneamente, se produce un cambio en la respuesta humoral, la cual a partir de este momento comienza a requerir de colaboración T para sostener la secreción de anticuerpos, cuyos títulos en suero se mantienen a lo largo del tiempo. En efecto, el establecimiento de la memoria inmunológica contra VFA (presencia de niveles protectivos de anticuerpos neutralizantes en suero) sólo se produce en presencia de linfocitos T colaboradores específicos.

### *Etapa temprana (Figura 16)*

Los linfocitos B de tipo innato, particularmente los linfocitos B de la ZM, representan la principal población celular involucrada en el control inicial de la infección con VFA por el sistema inmune adaptativo. La rápida y eficiente producción de anticuerpos neutralizantes por los linfocitos B de tipo innato permite el control de la replicación viral a partir de los 2-3 días post-infección. Esta respuesta temprana se desarrolla en forma independiente de la colaboración de linfocitos T. Sin embargo, es dependiente de la IL-10 producida por los mismos linfocitos de la ZM, citoquina que en este caso actuaría en forma autócrina, así como de IL-6 producida por las CD infectadas.

Las modificaciones fenotípicas, funcionales y morfológicas inducidas en las CD luego de la infección con VFA son responsables, al menos en parte, de la inhibición de la funcionalidad de linfocitos T que se observa en este momento. Sin embargo, a la incapacidad de las CD infectadas de estimular linfocitos T, se contrapone el aumento en su capacidad para estimular linfocitos B en forma TI. Por lo tanto, la infección con VFA produce un desvío en la funcionalidad de las CD, convirtiéndolas en potentes células estimuladoras de linfocitos B, tal como se demuestra en las Figuras 9 y 14. Al mismo tiempo, la infección provoca la disminución de la capacidad de las CD para actuar como células presentadoras de antígenos para linfocitos T (Fig. 5). La reprogramación transcripcional de CD hacia la adquisición de una funcionalidad activadora de linfocitos B ha sido demostrada, en otras situaciones, mediante utilización de la tecnología de microarreglo de ARNc. Por ejemplo, la estimulación de CD con IL-10, o con IL-10 conjuntamente con LPS, induce la expresión de genes



**Figura 16: Respuesta temprana contra VFA.** Durante los primeros días post-infección con el VFA se produce una inhibición selectiva de las respuestas TD, mientras que se promueve el rápido desarrollo de respuestas TI. Las modificaciones inducidas en las CDs luego de la infección con VFA producen como resultado una inhibición en la capacidad de las mismas para inducir la activación de los linfocitos T colaboradores (Th) localizados en la pulpa blanca. Por lo tanto, los linfocitos B2 foliculares no reciben colaboración T, y las respuestas humorales TD se inhiben. Simultáneamente, las CDs infectadas estimulan a los linfocitos B de ZM, los cuales rápidamente se diferencian a células plasmáticas secretoras de anticuerpos TI. La producción de IL-10 por este subgrupo de linfocitos B actúa en forma autócrina para estimular la secreción de anticuerpos. Asimismo, IL-10 participa en la inhibición de las respuestas TD en la pulpa blanca. La secreción de IL-6 por CDs infectadas y de IFN- $\gamma$  por macrófagos favorece el desarrollo de la respuesta humoral TI.

involucrados en la estimulación de la diferenciación y la funcionalidad de linfocitos B (Perrier et al., 2004). Durante la infección con VFA, las CD8 infectadas adquieren la capacidad de estimular linfocitos B CD9+, induciendo en ellos la secreción de anticuerpos contra el virus, así como la secreción de IL-10. Esta citoquina sería la piedra angular del complejo proceso cuyo resultado es la inhibición de la funcionalidad de linfocitos T y la simultánea estimulación de la secreción de anticuerpos TI por linfocitos B de tipo innato.

La infección con virus no citopáticos, tales como el VIH o el Virus de la Hepatitis C, generalmente induce la producción de IL-10 por células del sistema inmune del huésped, principalmente por linfocitos T con un fenotipo regulador (Granelli-Piperno et al., 2004; Taoufik et al., 1997; MacDonald et al., 2002). Asimismo, otros virus, como citomegalovirus y algunos poxvirus, expresan genes que son estructural y funcionalmente similares al gen que codifica para la IL-10 de sus huéspedes (Kotenko et al., 2000; Lockridge et al., 2000; Fleming et al., 1997). En estos casos que, por tratarse de virus no citopáticos, el control de la infección depende principalmente de la respuesta inmune celular, la depresión de la funcionalidad de las respuestas TD inducida como consecuencia de la secreción de IL-10 ha sido clásicamente interpretada como un mecanismo que resulta beneficioso para la replicación viral. En efecto, la depresión de las respuestas celulares permite la replicación de estos virus generando las condiciones necesarias para el establecimiento de una infección persistente en el huésped. Alternativamente, ha sido postulado que la depresión de la funcionalidad de las células T durante la respuesta contra infecciones virales crónicas podría tratarse de un mecanismo beneficioso para el huésped, ya que disminuiría el desarrollo de lesiones inflamatorias inmunopatológicas (Rouse et al., 2004). Por ejemplo, en un modelo murino de queratitis inducida por HSV, una enfermedad de los humanos que puede producir ceguera, la eliminación selectiva de linfocitos Treg productores de IL-10 produjo como resultado el desarrollo de lesiones más severas que en los animales control. Por el contrario, la transferencia de células Treg a huéspedes inmunocomprometidos previno la progresión de las lesiones. Sin embargo, a pesar del beneficio de suprimir el daño inmunopatológico, la regulación de la respuesta por IL-10 implica la incapacidad de desarrollar una respuesta T

citotóxica lo suficientemente potente como para eliminar al virus del organismo, permitiendo la persistencia de la infección por largos períodos (Suvas et al., 2003).

En el caso de la infección con el citopático VFA, la depresión de la funcionalidad de las respuestas TD durante la etapa aguda de la infección parecería no interferir con el rápido control de la replicación viral. En efecto, el virus es eliminado del organismo con igual cinética en ratones eutímicos y atímicos, siendo, en ambos casos, indetectable a partir del tercer día luego de la infección (Borca et al., 1986). Reforzando esta observación, es importante destacar que durante la infección con VFA, la inducción de anticuerpos neutralizantes y la eliminación viral coinciden temporalmente con el momento de máxima depresión de la funcionalidad de los linfocitos T (tercer día *pi* aproximadamente), (Fig. 8). Por lo tanto, nuestras observaciones indican que durante la respuesta inducida luego de la infección con el VFA, el sistema inmune se comportaría como un conjunto de compartimentos anatómo-funcionales que, si bien se regulan entre sí, funcionan con alto grado de autonomía. La rápida activación de los linfocitos B de tipo innato, encargados de producir anticuerpos protectores, es simultánea a la inhibición del compartimiento de linfocitos T. La IL-10, a través de sus funciones pleiotrópicas capaces de estimular la secreción TI de anticuerpos protectores y de inhibir la funcionalidad de los linfocitos T, articularía la activación e inhibición funcional de los distintos compartimentos del sistema.

El desarrollo de las respuestas de anticuerpos contra agentes virales suele ir acompañada de la producción de anticuerpos dirigidos contra antígenos propios del huésped (Hansen et al., 1998). A pesar de que, en la mayoría de los casos, estos anticuerpos no causan daño tisular directo, ciertas condiciones pueden provocar que estos autoanticuerpos inofensivos adquieran alto potencial patogénico (Mazza et al., 1997; Nardi et al., 1997; Vanderlugt et al., 2002). En este sentido, ha sido observado que los clones de linfocitos B que participan en enfermedades autoinmunes poseen sus genes de anticuerpos generalmente hipermutados (Shlomchik et al., 1987). Asimismo, el aumento de la patogenicidad de los autoanticuerpos se asocia con la subclase

de IgG de los mismos (Nimmerjahn et al., 2005). Por lo tanto, la participación de los linfocitos T, quienes dirigen los procesos de cambio de isotipos y de maduración de la afinidad por hipermutaciones somáticas, es necesaria para el desarrollo de la producción de anticuerpos autoinmunes patogénicos. En efecto, la producción de autoanticuerpos luego de la infección con virus citopáticos o no citopáticos depende de la presencia de linfocitos T colaboradores y estimulación por CD40 (Ludewig et al., 2004).

Como ha sido mencionado en la introducción, los linfocitos B de la ZM y los linfocitos B1 exhiben un enriquecimiento en clones con especificidades dirigidas contra epitopes presentes en antígenos TI de patógenos, muchos de los cuales presentan reacción cruzada con antígenos propios. Por ejemplo, clones que reconocen fosforilcolina localizada en la superficie de gran número de bacterias, también reconocen lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas (Shaw et al., 2000). La presencia enriquecida de dichos clones autorreactivos implica la necesidad de mecanismos reguladores que limiten la posibilidad de inducir daño autoinmune durante el desarrollo de la respuesta contra microorganismos que producen activación de estos compartimentos de linfocitos B. La activación de clones con especificidad para autoantígenos podría producirse porque los mismos clones que participan en la secreción de anticuerpos neutralizantes contra VFA presentan reacción cruzada con antígenos propios o, alternativamente, porque la activación de clones específicos para VFA podría conducir a la activación “bystander” de otros clones (autorreactivos) presentes en la ZM. En este sentido, la inhibición selectiva de la funcionalidad del compartimento de linfocitos T que hemos observado durante la etapa temprana de la respuesta contra VFA podría ser interpretada como un mecanismo evolutivamente seleccionado para disminuir el riesgo que implica que la potente activación de los linfocitos B localizados en la ZM se desarrolle en asociación con el proceso de hipermutaciones somáticas y maduración de la afinidad, el cual podría conducir a la producción de anticuerpos autoinmunes patogénicos. Esta inhibición, sin embargo, no impide el control de la infección ya que, a diferencia de lo observado en relación con la respuestas contra antígenos TD clásicos, en el caso de las infecciones con virus citopáticos la maduración de la afinidad no parecería ser

un proceso necesario para que los anticuerpos puedan otorgar protección. Por ejemplo, en el caso de la infección con VSV, los anticuerpos detectados a los tres días pi neutralizan al virus protegiendo a los ratones. El análisis y comparación de estos anticuerpos con aquellos producidos en momentos posteriores de la respuesta inmune, indica que la capacidad protectora de los mismos no se incrementa (Bachman et al., 1997). Si esta observación fuera aplicable a la respuesta contra VFA, la falta de colaboración T al inicio de la respuesta no interferiría con el desarrollo de la respuesta protectora contra el este virus.

La inhibición de la funcionalidad de linfocitos T durante la etapa temprana de la infección con VFA también regularía el cambio de isotipos, favoreciendo la secreción de anticuerpos con isotipos de bajo potencial patogénico, como IgM e IgG3. Los anticuerpos patogénicos detectados en enfermedades autoinmunes son predominantemente del isotipo IgG (Steward et al., 1976; Peng et al., 2002). La actividad autoinmune, evaluada en un modelo de destrucción de plaquetas, de las distintas subclases de IgG es mayor para las subclases IgG2a e IgG2b, seguidas por IgG1 y por último IgG3. La distinta actividad efectora *in vivo* de estos anticuerpos se debe a las diferentes afinidades que presentan por los receptores Fc activadores e inhibitorios (Nimmerjhan et al., 2005). Por lo tanto, la producción inicial de IgM, IgG1 e IgG3 luego de la infección con VFA es también consistente con el desarrollo de un tipo de respuesta con características “no patogénicas” o “anti-inflamatorias”.

La relación de tipo excluyente entre respuesta humoral y celular, como la presentada en esta tesis para el caso de la infección con el VFA, ha sido reportada en otras infecciones. Por ejemplo, linfocitos T presentes en los esplenocitos provenientes de roedores asiáticos (*Meriones unguiculatus*) infectados con *Brugia pahangi*, no proliferan luego de ser estimulados *in vitro* con el antígeno específico. Sin embargo, los linfocitos B esplénicos producen una importante respuesta de anticuerpos frente al mismo estímulo. Interesantemente, los linfocitos T presentes en los ganglios linfáticos provenientes de estos animales proliferan normalmente luego de la estimulación, aunque la capacidad de los linfocitos B de estos órganos de



producir anticuerpos contra el parásito es significativamente menor (Prier et al., 1988). En este caso también, la inhibición de la funcionalidad de los linfocitos T en el bazo está mediada por IL-10, cuya fuente principal son linfocitos B que, consecuentemente, han sido denominados linfocitos B reguladores (Mizoguchi et al., 2006). Ha sido propuesto que a través de la secreción de esta citoquina los linfocitos B cumplirían un papel regulador de la respuesta al atenuar la eficiencia de las células presentadoras de antígenos para estimular linfocitos T y restringir la proliferación de los mismos (Gillan et al., 2005). Linfocitos B reguladores secretores de IL-10 han sido involucrados en la inhibición de la progresión de inflamación en otras enfermedades parasitarias, como la causada por *Schistosoma mansoni* (Mangan et al., 2004). Asimismo, la participación de linfocitos B reguladores ha sido descrita en varias enfermedades autoinmunes, incluyendo la enfermedad inflamatoria intestinal (Mizoguchi et al., 2002), encefalomiелitis autoinmune experimental (Fillatreau et al., 2002), artritis (Mauri et al., 2003) y lupus eritematoso sistémico (Brummel et al., 2005; Lenert et al., 2005). Es importante destacar que los linfocitos B reguladores presentan características fenotípicas y funcionales similares a los de los linfocitos B de ZM, tales como la alta respuesta a la estimulación con LPS y elevada expresión de la molécula CD1d (Mizoguchi et al., 2006). En este sentido, ha sido postulado que los linfocitos B reguladores que participan en la enfermedad inflamatoria intestinal presumiblemente se originen de la población de linfocitos B de ZM (Su et al., 2004). En efecto, los linfocitos B de la ZM producen altas cantidades de IL-10 en respuesta a la estimulación con LPS o CpG (Dalwadi et al., 2003; Brummel et al. 2005; Lenert et al., 2005). Asimismo, este subgrupo de linfocitos B puede regular la inflamación intestinal (Wei et al., 2005). Por lo tanto, nuestras observaciones indicarían que la estimulación de los linfocitos B de la ZM por VFA, además del importante efecto de inducir la producción de anticuerpos TI protectores, también induce la manifestación de las funciones reguladoras de estas células. Colaborando con la función reguladora de los linfocitos B de la ZM, luego de la infección con VFA los linfocitos B1 también secretan IL-10 (fig. 16). La secreción de esta citoquina reguladora por los linfocitos B1 ha sido ampliamente descrita en la bibliografía (Berland et al., 2002; O'Garra et al., 1992). Por lo tanto, estas observaciones

indican que luego de la infección con el VFA, el desarrollo de una eficiente respuesta protectora mediada por anticuerpos se produce en asociación a la regulación de la actividad de los linfocitos T, evitando, por lo tanto, el desarrollo de daño autoinmune / inmunopatológico.

La estimulación temprana del sistema inmune por el VFA inactivado se produce por una vía distinta a la inducida por la infección. En el caso de la vacunación con el virus inactivado, se induce una respuesta similar a la inducida contra un antígeno proteico TD. Por lo tanto, la activación de los linfocitos B depende de la colaboración de linfocitos T, los cuales son estimulados por CDs que internalizaron las partículas virales inactivadas. La incapacidad del VFA inactivado de replicar en las CDs evita, contrariamente a lo observado luego de la infección, la disminución de la capacidad presentadora de las mismas y, por lo tanto, se produce una importante activación de linfocitos T. Como en toda respuesta TD, la producción de anticuerpos contra VFA inactivado demanda más tiempo que en las respuestas TI.

#### *Etapa tardía (Figura 17 )*

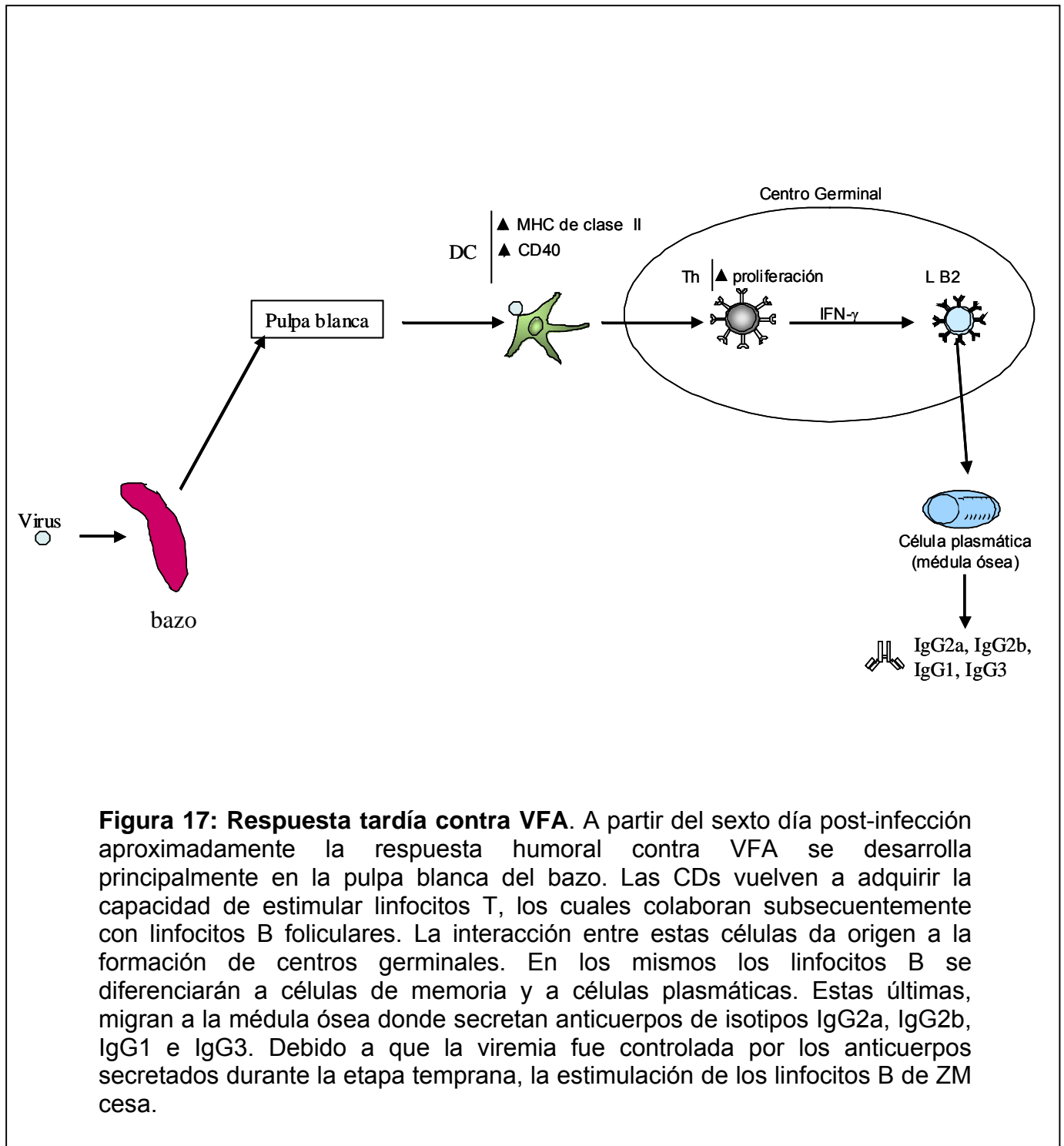
A partir del sexto día post-infección aproximadamente, comienza a desarrollarse la segunda etapa de la respuesta inmune humoral contra VFA, la cual depende de la colaboración brindada por los linfocitos T (Borca et al., 1986; Lopez et al., 1990). El control de la replicación viral y la eliminación de la viremia producidos por los anticuerpos secretados en forma timo-independiente durante la etapa anterior conducen a la cesación de la estimulación de los linfocitos B de la ZM. Por lo tanto, es posible que en ausencia de estimulación antigénica, la secreción de anticuerpos por estos linfocitos disminuya. Por otra parte, la inhibición funcional de los linfocitos T, característica de la primera etapa de la respuesta, se revierte. Los linfocitos T específicos pueden entonces colaborar con los linfocitos B2 foliculares, los cuales, a partir de este momento, serían los responsables de la secreción TD de anticuerpos neutralizantes. La

colaboración entre los linfocitos T y B culmina en la formación de centros germinales. En estas estructuras, los linfocitos T, a través de la secreción de IFN- $\gamma$ , inducen cambio de isotipos hacia IgG2a e IgG2b. Estos son los isotipos que predominan en el suero de ratones a partir de los 14 días post-infección con VFA. Debido a que los linfocitos B de la ZM que responde contra antígenos TI de naturaleza proteica no son reclutados en las reacciones del centro germinal, este sub-grupo de linfocitos B no contribuye a la formación del pool de linfocitos B de memoria (Bachmann et al., 2005). Por lo tanto, al igual que en las respuestas TI contra antígenos polisacáridos, las respuestas TI contra antígenos virales inducidas en la ZM también serían de vida media corta.

La prolongada memoria de la respuesta anti-VFA, medida como presencia de niveles protectivos de anticuerpos en suero, también depende de colaboración T (Lopez et al., 1990; Piatti et al., 1991). Asimismo, la duración de la memoria se asocia con CPAs que presentan péptidos antigénicos de VFA en el contexto de moléculas del MHC clase II (Wigdorowitz et al., 1996).

La memoria inducida por la vacunación, en cambio, presenta una duración menor, haciendo que los ratones vacunados vuelvan a ser susceptibles a la infección a partir de los 90 días post-vacunación. La diferencia en la memoria inmunológica inducida por la infección o la vacunación no podría ser explicada como resultado de la persistencia viral en el primer caso ya que, mediante titulación sobre líneas celulares susceptibles o mediante RT-PCR, la presencia de virus en etapas tardías de la infección ha sido indetectable (Wigdorowitz et al., 1996). Otros mecanismos han sido involucrados en la conservación de los niveles de anticuerpos en suero a lo largo del tiempo. Por ejemplo, ha sido propuesto que células plasmáticas de vida prolongada, con capacidad de secretar anticuerpos en forma TI, serían las responsables de mantener los niveles de anticuerpos en suero (McHeyzer-Williams et al., 1999). Alternativamente, ha sido propuesto que células B de memoria mantendrían la memoria serológica al ser expuestas constantemente a activación policlonal, la cual induciría la diferenciación de las mismas, a baja tasa, hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Bernasconi et al., 2002). La participación de estos diferentes mecanismos en el establecimiento de la

memoria contra VFA luego de la vacunación o infección aún resta ser estudiada.



**Figura 17: Respuesta tardía contra VFA.** A partir del sexto día post-infección aproximadamente la respuesta humoral contra VFA se desarrolla principalmente en la pulpa blanca del bazo. Las CDs vuelven a adquirir la capacidad de estimular linfocitos T, los cuales colaboran subsecuentemente con linfocitos B foliculares. La interacción entre estas células da origen a la formación de centros germinales. En los mismos los linfocitos B se diferenciarán a células de memoria y a células plasmáticas. Estas últimas, migran a la médula ósea donde secretan anticuerpos de isotipos IgG2a, IgG2b, IgG1 e IgG3. Debido a que la viremia fue controlada por los anticuerpos secretados durante la etapa temprana, la estimulación de los linfocitos B de ZM cesa.

En conclusión, nuestras observaciones indican que las dos etapas de la respuesta humoral inducida luego de la infección con VFA involucran a dos poblaciones distintas de linfocitos B. Los linfocitos B de la ZM (y probablemente linfocitos B1) y los linfocitos B2 foliculares contribuyen, en forma relativamente independiente y en distintos momentos post-infección, a la unidad de la respuesta protectora contra este agente viral. La activación inicial de los linfocitos B de tipo innato conlleva la depresión funcional de los linfocitos T. Cuando la replicación viral es controlada por los anticuerpos secretados en forma timo-independiente por estos subgrupos de linfocitos B, la estimulación de éstos linfocitos cesa, y por lo tanto disminuye la secreción de IL-10. En este momento, los linfocitos B2 foliculares, luego de recibir colaboración de linfocitos T colaboradores, prosiguen la respuesta, estableciendo una memoria serológica de larga duración.

Los datos presentados en este trabajo demuestran importantes diferencias entre el VFA infeccioso e inactivado respecto a la modulación de la funcionalidad de las CDs. Asimismo, indican que CDs infectadas o expuestas al virus inactivado presentan distinta habilidad para estimular a las diferentes subpoblaciones de linfocitos B. Estas observaciones podrían explicar el motivo por el cual la vacunación (con VFA inactivado) de los huéspedes naturales da inicio a una respuesta cuya inducción es considerablemente menos eficiente que la observada luego de la infección. Por lo tanto, los resultados presentados en esta tesis sugieren que el agregado a las vacunas anti-aftosa formuladas con virus inactivado de inmunomoduladores que redirijan la funcionalidad de las CDs hacia un fenotipo activador de linfocitos B, podría ser una estrategia interesante para el desarrollo de vacunas más eficientes. Asimismo, el direccionamiento del antígeno hacia la ZM permitiría una más rápida inducción de anticuerpos protectivos, hecho que resulta importante en el control de brotes epidémicos de la enfermedad.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- El VFA infecta CDs desarrollando una replicación abortiva que no afecta la viabilidad celular.
- La infección con VFA disminuye la expresión de las moléculas del CMH de clase II y CD40 y aumenta la expresión de la molécula CD11b. Estos cambios se asocian con modificaciones morfológicas y funcionales que indican la inducción de la diferenciación de las CDs hacia células macrofágicas.
- La infección de CDs con VFA induce la secreción de IL-6 por estas células.
- El co-cultivo de CDs infectadas con VFA y esplenocitos induce la secreción de IL-10 por células CD9+.
- Células dendríticas infectadas no estimulan la proliferación de linfocitos T, tanto *in vitro* como *in vivo*.
- La infección con VFA suprime el desarrollo de respuestas contra antígenos timo-dependientes, pero no las respuestas contra antígenos timo-independientes.
- La IL-10 secretada por los linfocitos B CD9+ estimulados por CDs infectadas es necesaria para estimular la secreción de anticuerpos TI contra el VFA.
- El bazo es un órgano imprescindible para el desarrollo de una rápida respuesta contra el VFA luego de la infección.
- Los linfonódulos no poseen linfocitos B capaces de generar una rápida respuesta contra el VFA luego de la infección.
- La eliminación funcional de los LB de la ZM mediante tratamiento farmacológico disminuye el desarrollo de la respuesta temprana contra el VFA.

- La respuesta temprana contra el VFA inactivado por irradiación con luz UV es inducida por una vía diferente a la descrita para el VFA infeccioso. En este sentido, el VFA inactivado:
  - no disminuye la capacidad de las CDs para presentar antígenos a los linfocitos T.
  - induce cantidades significativamente menores de IL-6 en las CDs que lo internalizaron.
  - no induce secreción de IL-10 en co-cultivos con esplenocitos.
  - no produce inhibición del desarrollo de las respuestas contra antígenos TD no relacionados.
  - no estimula linfocitos B CD9+ a secretar anticuerpos TI contra el VFA.



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aichele, P., J. Zinke, L. Grode, R. A. Schwendener, S. H. Kaufmann, and P. Seiler. 2003. Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J Immunol* 171:1148-1155.
- Alexandersen, S., M. B. Oleksiewicz, and A. I. Donaldson. 2001. The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR. *J Gen Virol* 82:747-755.
- Alexandersen, S., Z. Zhang, A. I. Donaldson, and A. J. Garland. 2003. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol* 129:1-36.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
- Amiot, P. L., and A. E. Hayes. 1985. Impaired human antibody response to the thymus-independent antigen, DNP-Ficoll, after splenectomy. Implications for post-splenectomy infections. *Lancet* 1:1008-1011.
- Ardavin, C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 3:582-590.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2:1144-1150.
- Avrameas, S. 1991. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* 12:154-159.
- Bablanian, G. M., and M. J. Grubman. 1993. Characterization of the foot-and-mouth disease virus 3C protease expressed in Escherichia coli. *Virology* 197:320-327.
- Bachmann, M. and Kopf, M. 2002. Balancing protective immunity and immunopathology. *Curr Opin Immunol* 14:413-419.
- Bachmann, M. and Zinkernagel, RM. 1997. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* 15:235-270.
- Bachmann, M. F., B. Odermatt, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1996. Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med* 183:2259.
- Bachmann, M. F., U. Kalinke, A. Althage, G. Freer, C. Burkhardt, H. Roost, M. Aguet, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1997. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 276:2024.
- Balazs, M., F. Martin, T. Zhou, and J. Kearney. 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17:341-352.
- Baranowski, E., C. M. Ruiz-Jarabo, N. Sevilla, D. Andreu, E. Beck, and E. Domingo. 2000. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that

- lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol* 74:1641-1647.
- Bartz H, Turkel O, Hoffjan S, Rothoef T, Gonschorek A. and U. Schauer. 2003. Respiratory syncytial virus decreases the capacity of myeloid dendritic cells to induce interferon-gamma in naive T cells. *Immunology* 109:49-57
  - Battegay, M., M. F. Bachmann, C. Burhkart, S. Viville, C. Benoist, D. Mathis, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1996. Antiviral immune responses of mice lacking MHC class II or its associated invariant chain. *Cell Immunol* 167:115-121.
  - Baumgarth, N., O. C. Herman, G. C. Jager, L. E. Brown, L. A. Herzenberg, and J. Chen. 2000. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med* 192:271-280.
  - Bautista, E. M., G. S. Ferman, and W. T. Golde. 2003. Induction of lymphopenia and inhibition of T cell function during acute infection of swine with foot and mouth disease virus (FMDV). *Vet Immunol Immunopathol* 92:61-73.
  - Bautista, E. M., G. S. Ferman, D. Gregg, M. C. Brum, M. J. Grubman, and W. T. Golde. 2005. Constitutive expression of alpha interferon by skin dendritic cells confers resistance to infection by foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 79:4838-4847.
  - Becker, T., F. U. Hartl, and F. Wieland. 2002. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* 158:1277-1285.
  - Bender, A., M. Albert, A. Reddy, M. Feldman, B. Sauter, G. Kaplan, W. Hellman, and N. Bhardwaj. 1998. The distinctive features of influenza virus infection of dendritic cells. *Immunobiology* 198:552.
  - Berinstein, A., M. Roivainen, T. Hovi, P. W. Mason, and B. Baxt. 1995. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol* 69:2664-2666.
  - Berland, R., and H. H. Wortis. 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 20:253.
  - Bernasconi, N. L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298:2199.
  - Bieback, K., E. Lien, I. M. Klagge, E. Avota, J. Schneider-Schaulies, W. P. Duprex, H. Wagner, C. J. Kirschning, V. Ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies. 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* 76:8729-8736.
  - Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig, and R. M. Steinman. 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196:1627-1638.
  - Borca, M. V., F. M. Fernandez, A. M. Sadir, M. Braun, and A. A. Schudel. 1986. Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine

- experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology* 59:261-267.
- Borca, M. V., F. M. Fernandez, A. M. Sadir, M. Braun, and A. A. Schudel. 1986. Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology* 59:261-267.
  - Bosnjak, L., M. Miranda-Saksena, D. M. Koelle, R. A. Boadle, C. A. Jones, and A. L. Cunningham. 2005. Herpes simplex virus infection of human dendritic cells induces apoptosis and allows cross-presentation via uninfected dendritic cells. *J Immunol* 174:2220-2227.
  - Briles, D. E., M. Nahm, K. Schroer, J. Davie, P. Baker, J. Kearney, and R. Barletta. 1981. Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 streptococcus pneumoniae. *J Exp Med* 153:694-705.
  - Brummel, R., and P. Lenert. 2005. Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 174:2429-2434.
  - Brummel, R., and P. Lenert. 2005. Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 174:2429.
  - Burns, W., L. C. Billups, and A. L. Notkins. 1975. Thymus dependence of viral antigens. *Nature* 256:654-656.
  - Burrows, R., J. A. Mann, A. J. Garland, A. Greig, and D. Goodridge. 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural foot-and-mouth disease infection in cattle. *J Comp Pathol* 91:599-609.
  - Cancro, M. P., and J. F. Kearney. 2004. B cell positive selection: road map to the primary repertoire? *J Immunol* 173:15-19.
  - Cariappa, A., H. C. Liou, B. H. Horwitz, and S. Pillai. 2000. Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. *J Exp Med* 192:1175.
  - Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180:1263-1272.
  - Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-787.
  - Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen, and A. Lanzavecchia. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by doublestranded RNA. *J. Exp. Med.* 189: 821–829.
  - Chao, D., and G. G. MacPherson. 1990. Analysis of thymus-independent type 2 antigen uptake by marginal zone macrophages in thin slices of viable lymphoid tissue in vitro. *Eur J Immunol* 20:1451-1455.
  - Childerstone, A. J., L. Cedillo-Baron, M. Foster-Cuevas, and R. M. Parkhouse. 1999. Demonstration of bovine CD8+ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* 80 ( Pt 3):663-669.
  - Chinsangaram, J., M. Koster, and M. J. Grubman. 2001. Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon

- involves double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Virol* 75:5498-5503.
- Chinsangaram, J., M. P. Moraes, M. Koster, and M. J. Grubman. 2003. Novel viral disease control strategy: adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease. *J Virol* 77:1621-1625.
  - Choe, J., and Y. S. Choi. 1998. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells. *Eur J Immunol* 28:508-515.
  - Chomarat, P., J. Banchereau, J. Davoust, and A. K. Palucka. 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1:510.
  - Cinamon, G., M. Matloubian, M. J. Lesneski, Y. Xu, C. Low, T. Lu, R. L. Proia, and J. G. Cyster. 2004. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat Immunol* 5:713-720.
  - Clarke, B. E., and D. V. Sangar. 1988. Processing and assembly of foot-and-mouth disease virus proteins using subgenomic RNA. *J Gen Virol* 69 ( Pt 9):2313-2325.
  - Colino, J., Y. Shen, and C. M. Snapper. 2002. Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. *J Exp Med* 195:1-13.
  - Collen, T., L. Pullen, and T. R. Doel. 1989. T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *J Gen Virol* 70 ( Pt 2):395-403.
  - Colonna, M., A. Krug, and M. Cella. 2002. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol* 14:373.
  - Cowan, M. J., A. J. Ammann, D. W. Wara, V. M. Howie, L. Schultz, N. Doyle, and M. Kaplan. 1978. Pneumococcal polysaccharide immunization in infants and children. *Pediatrics* 62:721-727.
  - Curry, S., C. C. Abrams, E. Fry, J. C. Crowther, G. J. Belsham, D. I. Stuart, and A. M. King. 1995. Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Virol* 69:430-438.
  - Curry, S., E. Fry, W. Blakemore, R. Abu-Ghazaleh, T. Jackson, A. King, S. Lea, J. Newman, and D. Stuart. 1997. Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 71:9743-9752.
  - Dalwadi, H., B. Wei, M. Schrage, K. Spicher, T. T. Su, L. Birnbaumer, D. J. Rawlings, and J. Braun. 2003. B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene. *J Immunol* 170:1707.
  - Dammers, P. M., A. Visser, E. R. Popa, P. Nieuwenhuis, and F. G. Kroese. 2000. Most marginal zone B cells in rat express germline encoded Ig VH genes and are ligand selected. *J Immunol* 165:6156-6169.
  - de Waal Malefyt, R. 1998. *Interleukin-10*. In *Cytokines*. A Mire-Sluis and R. Thorpe, editors, London.

- Delneste, Y., P. Charbonnier, N. Herbault, G. Magistrelli, G. Caron, J. Y. Bonnefoy, and P. Jeannin. 2003. Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood* 101:143.
- de Witte, L., M. Abt, S. Schneider-Schaulies, Y. van Kooyk, and T. B. Geijtenbeek. 2006. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol* 80:3477.
- Diebold, S. S., M. Montoya, H. Unger, L. Alexopoulou, P. Roy, L. E. Haswell, A. Al-Shamkhani, R. Flavell, P. Borrow, and C. Reis e Sousa. 2003. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 424:324.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529-1531.
- Dijkstra, C. D., E. Van Vliet, E. A. Dopp, A. A. van der Lelij, and G. Kraal. 1985. Marginal zone macrophages identified by a monoclonal antibody: characterization of immuno- and enzyme-histochemical properties and functional capacities. *Immunology* 55:23-30.
- Dintzis, H. M., R. Z. Dintzis, and B. Vogelstein. 1976. Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:3671.
- Doyle, S., S. Vaidya, R. O'Connell, H. Dadgostar, P. Dempsey, T. Wu, G. Rao, R. Sun, M. Haberland, R. Modlin, and G. Cheng. 2002. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17:251.
- Dubois, B., C. Barthelemy, I. Durand, Y. J. Liu, C. Caux, and F. Briere. 1999. Toward a role of dendritic cells in the germinal center reaction: triggering of B cell proliferation and isotype switching. *J Immunol* 162:3428-3436.
- Eble, P. L., A. Bouma, M. G. de Bruin, F. van Hemert-Kluitenberg, J. T. van Oirschot, and A. Dekker. 2004. Vaccination of pigs two weeks before infection significantly reduces transmission of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 22:1372-1378.
- Ellard, F. M., J. Drew, W. E. Blakemore, D. I. Stuart, and A. M. King. 1999. Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Gen Virol* 80 ( Pt 8):1911-1918.
- Engelmayer, J., M. Larsson, M. Subklewe, A. Chahroudi, W. I. Cox, R. M. Steinman, and N. Bhardwaj. 1999. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* 163:6762
- Fayette, J., I. Durand, J. M. Bridon, C. Arpin, B. Dubois, C. Caux, Y. J. Liu, J. Banchereau, and F. Briere. 1998. Dendritic cells enhance the differentiation of naive B cells into plasma cells in vitro. *Scand J Immunol* 48:563-570.
- Feeney, A. J. 1990. Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences. *J Exp Med* 172:1377-1390.
- Ferlazzo, G., M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman, and C. Munz. 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK)

cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195:343.

- Fernandez, F. M., M. V. Borca, A. M. Sadir, N. Fondevila, J. Mayo, and A. A. Schudel. 1986. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet Microbiol* 12:15-24.
- Fillatreau, S., C. H. Sweeney, M. J. McGeachy, D. Gray, and S. M. Anderton. 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3:944.
- Fleming, S. B., C. A. McCaughan, A. E. Andrews, A. D. Nash, and A. A. Mercer. 1997. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 71:4857.
- Franco, M. A., and H. B. Greenberg. 1997. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology* 238:169-179.
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh, and D. P. Carbone. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2:1096.
- Garcia-Valcarcel, M., T. Doel, T. Collen, M. Ryan, and R. M. Parkhouse. 1996. Recognition of foot-and-mouth disease virus and its capsid protein VP1 by bovine peripheral T lymphocytes. *J Gen Virol* 77 ( Pt 4):727-735.
- Garg, M., A. M. Kaplan, and S. Bondada. 1994. Cellular basis of differential responsiveness of lymph nodes and spleen to 23-valent Pnu-Imune vaccine. *J Immunol* 152:1589-1596.
- Gatto, D. and MF. Bachmann. 2005. Function of Marginal Zone B cells in Antiviral B cell responses. *Critical Reviews in Immunology* 25.
- Gatto, D., Ruedl, C., Odermatt, B. and MF. Bachmann. 2004. Rapid Response of Marginal Zone B Cells to Viral Particles. *J Immunol* 173:4308-4316.
- Geijtenbeek, T. B., and Y. van Kooyk. 2003. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr Top Microbiol Immunol* 276:31.
- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, and G. Trinchieri. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195:327.
- Ghanekar, S., L. Zheng, A. Logar, J. Navratil, L. Borowski, P. Gupta, and C. Rinaldo. 1996. Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus. *J Immunol*. 157:4028-4036.
- Gillan, V., R. A. Lawrence, and E. Devaney. 2005. B cells play a regulatory role in mice infected with the L3 of *Brugia pahangi*. *Int Immunol* 17:373.
- Go, N. F., B. E. Castle, R. Barrett, R. Kastelein, W. Dang, T. R. Mosmann, K. W. Moore, and M. Howard. 1990. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 172:1625-1631.
- Goeckeritz, B. E., M. Flora, K. Witherspoon, Q. Vos, A. Lees, G. J. Dennis, D. S. Pisetsky, D. M. Klinman, C. M. Snapper, and J. J. Mond.

1999. Multivalent cross-linking of membrane Ig sensitizes murine B cells to a broader spectrum of CpG-containing oligodeoxynucleotide motifs, including their methylated counterparts, for stimulation of proliferation and Ig secretion. *Int Immunol* 11:1693.
- Goodbourn, S., L. Didcock, and R. E. Randall. 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 81:2341-2364.
  - Goud, S. N., N. Muthusamy, and B. Subbarao. 1988. Differential responses of B cells from the spleen and lymph node to TNP-Ficoll. *J Immunol* 140:2925-2930.
  - Granelli-Piperno, A., A. Golebiowska, C. Trumppheller, F. P. Siegal, and R. M. Steinman. 2004. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7669.
  - Granelli-Piperno, A., E. Delgado, V. Finkel, W. Paxton, and R. M. Steinman. 1998. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 72:2733
  - Granelli-Piperno, A., E. Delgado, V. Finkel, W. Paxton, and R. M. Steinman. 1998. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 72:2733.
  - Gray, D., D. S. Kumararatne, J. Lortan, M. Khan, and I. C. MacLennan. 1984. Relation of intra-splenic migration of marginal zone B cells to antigen localization on follicular dendritic cells. *Immunology* 52:659-669
  - Grubman, M. J., and B. Baxt. 2004. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* 17:465-493.
  - Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-667.
  - Guinamard, R., M. Okigaki, J. Schlessinger, and J. V. Ravetch. 2000. Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol* 1:31-36.
  - Hangartner, L., R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 2006. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol* 6:231-243.
  - Hansen, K. E., J. Arnason, and A. J. Bridges. 1998. Autoantibodies and common viral illnesses. *Semin Arthritis Rheum* 27:263.
  - Hao, Z., and K. Rajewsky. 2001. Homeostasis of peripheral B cells in the absence of B cell influx from the bone marrow. *J Exp Med* 194:1151-1164.
  - Hardy, R. R., C. E. Carmack, S. A. Shinton, R. J. Riblet, and K. Hayakawa. 1989. A single VH gene is utilized predominantly in anti-BrMRBC hybridomas derived from purified Ly-1 B cells. Definition of the VH11 family. *J Immunol* 142:3643-3651.



- Harshyne, L. A., S. C. Watkins, A. Gambotto, and S. M. Barratt-Boyes. 2001. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* 166:3717-3723.
- Haury, M., A. Sundblad, A. Grandien, C. Barreau, A. Coutinho, and A. Nobrega. 1997. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur J Immunol* 27:1557-1563.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194:769-779.
- Hayakawa, K., C. E. Carmack, R. Hyman, and R. R. Hardy. 1990. Natural autoantibodies to thymocytes: origin, VH genes, fine specificities, and the role of Thy-1 glycoprotein. *J Exp Med* 172:869-878.
- Hayakawa, K., M. Asano, S. A. Shinton, M. Gui, D. Allman, C. L. Stewart, J. Silver, and R. R. Hardy. 1999. Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* 285:113-116.
- Hayakawa, K., R. R. Hardy, and L. A. Herzenberg. 1986. Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. *Eur J Immunol* 16:450-456.
- Hilleman, M. R. 2004. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14560-14566.
- Hindiyyeh, M., Q. H. Li, R. Basavappa, J. M. Hogle, and M. Chow. 1999. Poliovirus mutants at histidine 195 of VP2 do not cleave VP0 into VP2 and VP4. *J Virol* 73:9072-9079.
- Holdsworth, R. J., A. D. Irving, and A. Cuschieri. 1991. Postsplenectomy sepsis and its mortality rate: actual versus perceived risks. *Br J Surg* 78:1031-1038.
- Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 190:229.
- Izaguirre, A., B. J. Barnes, S. Amrute, W. S. Yeow, N. Megjugorac, J. Dai, D. Feng, E. Chung, P. M. Pitha, and P. Fitzgerald-Bocarsly. 2003. Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 74:1125.
- Jackson, T., A. P. Mould, D. Sheppard, and A. M. King. 2002. Integrin alphavbeta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 76:935-941.
- Jackson, T., D. Sheppard, M. Denyer, W. Blakemore, and A. M. King. 2000. The epithelial integrin alphavbeta6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 74:4949-4956.
- Jacobson, M. F., and D. Baltimore. 1968. Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61:77-84.
- Janeway, C. A., Jr. 2001. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7461-7468.

- Jego, G., V. Pascual, A. K. Palucka, and J. Banchereau. 2005. Dendritic cells control B cell growth and differentiation. *Curr Dir Autoimmun* 8:124-139.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192:1213-1222.
- Julien, S., P. Soulas, J. C. Garaud, T. Martin, and J. L. Pasquali. 2002. B cell positive selection by soluble self-antigen. *J Immunol* 169:4198-4204.
- Kalinke, U., A. Oxenius, C. Lopez-Macias, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 2000. Virus neutralization by germ-line vs. hypermutated antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10126-10131.
- Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A and M. Hori. 1999. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol.* 162:5584-5591.
- Kantor, A. B., and L. A. Herzenberg. 1993. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol* 11:501-538.
- Karlsson, M. C., R. Guinamard, S. Bolland, M. Sankala, R. M. Steinman, and J. V. Ravetch. 2003. Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. *J Exp Med* 198:333-340.
- Kawano, Y., T. Noma, K. Kou, I. Yoshizawa, and J. Yata. 1995. Regulation of human IgG subclass production by cytokines: human IgG subclass production enhanced differentially by interleukin-6. *Immunology* 84:278-284.
- Kearney, J. F. 2005. Innate-like B cells. *Springer Semin Immun* 26:377-383.
- Knowles, N. J., A. R. Samuel, P. R. Davies, R. P. Kitching, and A. I. Donaldson. 2001. Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain. *Vet Rec* 148:258-259.
- Kotenko, S. V., S. Sacconi, L. S. Izotova, O. V. Mirochnitchenko, and S. Pestka. 2000. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1695.
- Kraal, G. 1992. Cells in the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol* 132:31-74.
- Kretschmer, K., A. Jungebloud, J. Stopkowicz, B. Stoermann, R. Hoffmann, and S. Weiss. 2003. Antibody repertoire and gene expression profile: implications for different developmental and functional traits of splenic and peritoneal B-1 lymphocytes. *J Immunol* 171:1192-1201.
- Krug, A., A. R. French, W. Barchet, J. A. Fischer, A. Dzionek, J. T. Pingel, M. M. Orihuela, S. Akira, W. M. Yokoyama, and M. Colonna. 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21:107-119.
- Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson,

- and R. W. Finberg. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1:398-401.
- Larcher, C., V. A. Nguyen, C. Furhapter, S. Ebner, E. Solder, H. Stossel, N. Romani, and N. Sepp. 2005. Human herpesvirus-8 infection of umbilical cord-blood-derived CD34+ stem cells enhances the immunostimulatory function of their dendritic cell progeny. *Exp Dermatol* 14:41.
  - Lee, B. O., J. Rangel-Moreno, J. E. Moyron-Quiroz, L. Hartson, M. Makris, F. Sprague, F. E. Lund, and T. D. Randall. 2005. CD4 T cell-independent antibody response promotes resolution of primary influenza infection and helps to prevent reinfection. *J Immunol* 175:5827-5838.
  - Lenert, P., R. Brummel, E. H. Field, and R. F. Ashman. 2005. TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *J Clin Immunol* 25:29.
  - Likhite, V. V. 1976. Immunological impairment and susceptibility to infection after splenectomy. *Jama* 236:1376-1377.
  - Liu, Y. J., H. Kanzler, V. Soumelis, and M. Gilliet. 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2:585.
  - Lockridge, K. M., S. S. Zhou, R. H. Kravitz, J. L. Johnson, E. T. Sawai, E. L. Blewett, and P. A. Barry. 2000. Primate cytomegaloviruses encode and express an IL-10-like protein. *Virology* 268:272.
  - Lopes-Carvalho, T., and J. F. Kearney. 2004. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev* 197:192-205.
  - Lopez, O. J., A. M. Sadir, M. V. Borca, F. M. Fernandez, M. Braun, and A. A. Schudel. 1990. Immune response to foot-and-mouth disease virus in an experimental murine model. II. Basis of persistent antibody reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 24:313-321.
  - Lore K, Sonnerborg A, Brostrom C, Goh LE, Perrin L, McDade H, Stellbrink HJ, Gazzard B, Weber R, Napolitano LA, van Kooyk Y, and J. Andersson. 2002. Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS* 16: 683–692.
  - Lu, T. T., and J. G. Cyster. 2002. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science* 297:409-412.
  - Ludewig, B., K. J. Maloy, C. Lopez-Macias, B. Odermatt, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2000. Induction of optimal anti-viral neutralizing B cell responses by dendritic cells requires transport and release of virus particles in secondary lymphoid organs. *Eur J Immunol* 30:185-196.
  - Ludewig, B., P. Krebs, H. Metters, J. Tatzel, O. Tureci, and U. Sahin. 2004. Molecular characterization of virus-induced autoantibody responses. *J Exp Med* 200:637.
  - Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, and R. A. Flavell. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5598-5603.
  - Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, and A. Iwasaki. 2003. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198:513-520.

- MacDonald, A. J., M. Duffy, M. T. Brady, S. McKiernan, W. Hall, J. Hegarty, M. Curry, and K. H. Mills. 2002. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* 185:720.
- Mahanty S, Hutchinson K, Agarwal S, McRae M, Rollin PE, and B. Pulendran. 2003. Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses. *J Immunol*. 170:2797-27801
- Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 189:587.
- Malisan, F., F. Briere, J. M. Bridon, N. Harindranath, F. C. Mills, E. E. Max, J. Banchereau, and H. Martinez-Valdez. 1996. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med* 183:937-947.
- Maloy, K. J., B. Odermatt, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1998. Interferon gamma-producing gammadelta T cell-dependent antibody isotype switching in the absence of germinal center formation during virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1160-1165.
- Mangan, N. E., R. E. Fallon, P. Smith, N. van Rooijen, A. N. McKenzie, and P. G. Fallon. 2004. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol* 173:6346.
- Maranon, C., J. F. Desoutter, G. Hoeffel, W. Cohen, D. Hanau, and A. Hosmalin. 2004. Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6092-6097.
- Martal, J. L., N. M. Chene, L. P. Huynh, R. M. L'Haridon, P. B. Reinaud, M. W. Guillomot, M. A. Charlier, and S. Y. Charpigny. 1998. IFN-tau: a novel subtype I IFN1. Structural characteristics, non-ubiquitous expression, structure-function relationships, a pregnancy hormonal embryonic signal and cross-species therapeutic potentialities. *Biochimie* 80:755.
- Martin, F. and JF. Kearney. 2000. Positive Selection from Newly Formed to Marginal Zone B Cells Depends on the Rate of Clonal Production, CD19, and btk. *Immunity* 12:39-49.
- Martin, F., A. M. Oliver, and J. F. Kearney. 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14:617-629.
- Martin, F., and J. F. Kearney. 2000. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev* 175:70-79.
- Masmoudi, H., T. Mota-Santos, F. Huetz, A. Coutinho, and P. A. Cazenave. 1990. All T15 Id-positive antibodies (but not the majority of VHT15+ antibodies) are produced by peritoneal CD5+ B lymphocytes. *Int Immunol* 2:515-520.
- Mason, P. W., E. Rieder, and B. Baxt. 1994. RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor

but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1932-1936.

- Matthews, K., C. M. Leong, L. Baxter, E. Inglis, K. Yun, B. T. Backstrom, J. Doorbar, and M. Hibma. 2003. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol* 77:8378.
- Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301-305.
- Mauri, C., D. Gray, N. Mushtaq, and M. Londei. 2003. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* 197:489.
- Mazza, G., M. E. el Idrissi, J. P. Coutelier, A. Corato, C. J. Elson, C. J. Pfau, and M. J. Day. 1997. Infection of C3HeB/FeJ mice with the docile strain of lymphocytic choriomeningitis virus induces autoantibodies specific for erythrocyte Band 3. *Immunology* 91:239.
- McGuirk, P., C. McCann, and K. H. Mills. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 195:221.
- McHeyzer-Williams, M. G., and R. Ahmed. 1999. B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol* 11:172.
- McVicar, J. W., and P. Suttmoller. 1976. Growth of foot-and-mouth disease virus in the upper respiratory tract of non-immunized, vaccinated, and recovered cattle after intranasal inoculation. *J Hyg (Lond)* 76:467-481.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394.
- Menetrier-Caux, C., G. Montmain, M. C. Dieu, C. Bain, M. C. Favrot, C. Caux, and J. Y. Blay. 1998. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92:4778.
- Mikloska, Z., L. Bosnjak, and A. L. Cunningham. 2001. Immature monocyte-derived dendritic cells are productively infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol* 75:5958.
- Mills, K. 2004. Regulatory T cells: Friend or foe in immunity to infection? *Nature Reviews Immunology* 4:841-856.
- Mizoguchi, A., and A. K. Bhan. 2006. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 176:705.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, H. Takedatsu, R. S. Blumberg, and A. K. Bhan. 2002. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 16:219.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683.
- Morrow, G., B. Slobedman, A. L. Cunningham, and A. Abendroth. 2003. Varicella-zoster virus productively infects mature dendritic cells and alters their immune function. *J Virol* 77:4950.

- Morse, L., D. Chen, D. Franklin, Y. Xiong, and S. Chen-Kiang. 1997. Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6. *Immunity* 6:47-56.
- Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK. and Z. Tabi. 2002. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 99:2913-2921.
- Mulcahy, G., C. Gale, P. Robertson, S. Iyisan, R. D. DiMarchi, and T. R. Doel. 1990. Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 8:249-256.
- Nahmod, K. A., M. E. Vermeulen, S. Raiden, G. Salamone, R. Gamberale, P. Fernandez-Calotti, A. Alvarez, V. Nahmod, M. Giordano, and J. R. Geffner. 2003. Control of dendritic cell differentiation by angiotensin II. *Faseb J* 17:491.
- Nardi, M. A., L. X. Liu, and S. Karpatkin. 1997. GPIIIa-(49-66) is a major pathophysiologically relevant antigenic determinant for anti-platelet GPIIIa of HIV-1-related immunologic thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7589.
- Neff, S., D. Sa-Carvalho, E. Rieder, P. W. Mason, S. D. Blystone, E. J. Brown, and B. Baxt. 1998. Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *J Virol* 72:3587-3594.
- Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch. 2005. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310:1510.
- Ochsenbein, A. F., D. D. Pinschewer, B. Odermatt, A. Ciurea, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2000. Correlation of T cell independence of antibody responses with antigen dose reaching secondary lymphoid organs: implications for splenectomized patients and vaccine design. *J Immunol* 164:6296-6302
- Ochsenbein, A. F., T. Fehr, C. Lutz, M. Suter, F. Brombacher, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286:2156-2159.
- Ochsenbein, A., Pinschewer, DD., Odermatt, B., Carroll, MC., Hengartner, H. and RM Zinkernagel. 1999. Protective T Cell-independent Antiviral Antibody Responses Are Dependent on Complement. *J. Exp. Med.* 190:1165-1174.
- O'Garra, A., R. Chang, N. Go, R. Hastings, G. Haughton, and M. Howard. 1992. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* 22:711.
- Oleksiewicz, M. B., A. I. Donaldson, and S. Alexandersen. 2001. Development of a novel real-time RT-PCR assay for quantitation of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues. *J Virol Methods* 92:23-35.
- Oliver, A. M., F. Martin, and J. F. Kearney. 1999. IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* 162:7198-7207.

- Oliver, A. M., F. Martin, G. L. Gartland, R. H. Carter, and J. F. Kearney. 1997. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol* 27:2366-2374.
- Pardoll, D. M., B. J. Fowlkes, A. M. Lew, W. L. Maloy, M. A. Weston, J. A. Bluestone, R. H. Schwartz, J. E. Coligan, and A. M. Kruisbeek. 1988. Thymus-dependent and thymus-independent developmental pathways for peripheral T cell receptor-gamma delta-bearing lymphocytes. *J Immunol* 140:4091-4096.
- Paul, W. E. 2003. *Fundamental Immunology*. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, Philadelphia.
- Peng, S. L., S. J. Szabo, and L. H. Glimcher. 2002. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5545.
- Pennell, C. A., T. J. Mercolino, T. A. Grdina, L. W. Arnold, G. Haughton, and S. H. Clarke. 1989. Biased immunoglobulin variable region gene expression by Ly-1 B cells due to clonal selection. *Eur J Immunol* 19:1289-1295.
- Perez Filgueira, D. M., A. Berinstein, E. Smitsaart, M. V. Borca, and A. M. Sadir. 1995. Isotype profiles induced in Balb/c mice during foot and mouth disease (FMD) virus infection or immunization with different FMD vaccine formulations. *Vaccine* 13:953-960.
- Perrier, P., F. O. Martinez, M. Locati, G. Bianchi, M. Nebuloni, G. Vago, F. Bazzoni, S. Sozzani, P. Allavena, and A. Mantovani. 2004. Distinct transcriptional programs activated by interleukin-10 with or without lipopolysaccharide in dendritic cells: induction of the B cell-activating chemokine, CXC chemokine ligand 13. *J Immunol* 172:7031.
- Piatti, P. G., A. Berinstein, O. J. Lopez, M. V. Borca, F. Fernandez, A. A. Schudel, and A. M. Sadir. 1991. Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *J Gen Virol* 72 ( Pt 7):1691-1694.
- Pillai, S., A. Cariappa, and S. T. Moran. 2005. Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 23:161-196.
- Plotnicky-Gilquin H, Cyblat D, Aubry JP, Delneste Y, Blaecke A, Bonnefoy JY, Corvaia N, Jeannin P. 2001. Differential effects of parainfluenza virus type 3 on human monocytes and dendritic cells. *Virology*. 285:82-90.
- Pollara G, Speidel K, Samady L, Rajpopat M, McGrath Y, Ledermann J, Coffin RS, Katz DR. and B. Chain. 2003. Herpes simplex virus infection of dendritic cells: balance among activation, inhibition, and immunity. *J Infect Dis*. 187:165-178.
- Pollara, G., A. Kwan, P. J. Newton, M. E. Handley, B. M. Chain, and D. R. Katz. 2005. Dendritic cells in viral pathogenesis: protective or defective? *Int J Exp Pathol* 86:187.
- Pope, M., M. G. Betjes, N. Romani, H. Hirmand, P. U. Cameron, L. Hoffman, S. Gezelter, G. Schuler, and R. M. Steinman. 1994. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 78:389.

- Prier, R. C., and P. J. Lammie. 1988. Differential regulation of in vitro humoral and cellular immune responsiveness in *Brugia pahangi*-infected jirds. *Infect Immun* 56:3052.
- Racaniello, V. R. 2001. *Fields Virology*.
- Randolph, G. J., V. Angeli, and M. A. Swartz. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5:617-628.
- Reif, K., E. H. Ekland, L. Ohi, H. Nakano, M. Lipp, R. Forster, and J. G. Cyster. 2002. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416:94-99.
- Rouse, B. T., and S. Suvas. 2004. Regulatory cells and infectious agents: detentes cordiale and contraire. *J Immunol* 173:2211.
- Russo, V., S. Tanzarella, P. Dalerba, D. Rigatti, P. Rovere, A. Villa, C. Bordignon, and C. Traversari. 2000. Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2185-2190.
- Ryan, M. D., A. M. King, and G. P. Thomas. 1991. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol* 72 ( Pt 11):2727-2732.
- Saiz, M., J. I. Nunez, M. A. Jimenez-Clavero, E. Baranowski, and F. Sobrino. 2002. Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes Infect* 4:1183-1192.
- Salguero, F. J., M. A. Sanchez-Martin, F. Diaz-San Segundo, A. de Avila, and N. Sevilla. 2005. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes an acute disease that can be lethal for adult laboratory mice. *Virology* 332:384-396.
- Salio, M., M. Cella, M. Suter, and A. Lanzavecchia. 1999. Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur J Immunol* 29:3245.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. 1999. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med*. 189:611-614
- Samuel, C. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14:778-809.
- Sanz-Parra, A., F. Sobrino, and V. Ley. 1998. Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *J Gen Virol* 79 ( Pt 3):433-436.
- Satoguina, J., M. Mempel, J. Larbi, M. Badusche, C. Loliger, O. Adjei, G. Gachelin, B. Fleischer, and A. Hoerauf. 2002. Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis). *Microbes Infect* 4:1291.
- Schmidt, E. E., I. C. MacDonald, and A. C. Groom. 1993. Comparative aspects of splenic microcirculatory pathways in mammals: the region bordering the white pulp. *Scanning Microsc* 7:613-628.
- Schneider-Schaulies, S., I. M. Klagge, and V. ter Meulen. 2003. Dendritic cells and measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 276:77.
- Schulz, O., D. J. Pennington, K. Hodivala-Dilke, M. Febbraio, and C. Reis e Sousa. 2002. CD36 or alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins are not essential for MHC class I cross-presentation of cell-associated antigen by CD8 alpha+ murine dendritic cells. *J Immunol* 168:6057.



- Servet-Delprat, C., P. O. Vidalain, H. Bausinger, S. Manie, F. Le Deist, O. Azocar, D. Hanau, A. Fischer, and C. Rabourdin-Combe. 2000. Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J Immunol* 164:1753.
- Shaw, P. X., S. Horkko, M. K. Chang, L. K. Curtiss, W. Palinski, G. J. Silverman, and J. L. Witztum. 2000. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest* 105:1731.
- Shaw, P., Hörkkö, S., Chang, MK., Curtiss, LK., Palinski, W., Silverman, GJ., and JL. Witztum. 2000. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J. Clin. Invest* 105:1731-1740.
- Shlomchik, M. J., A. Marshak-Rothstein, C. B. Wolfowicz, T. L. Rothstein, and M. G. Weigert. 1987. The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature* 328:805.
- Shortman K. and YJ Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunol.* 2: 151-161.
- Shparago, N., P. Zelazowski, L. Jin, T. M. McIntyre, E. Stuber, L. M. Pecanha, M. R. Kehry, J. J. Mond, E. E. Max, and C. M. Snapper. 1996. IL-10 selectively regulates murine Ig isotype switching. *Int Immunol* 8:781-790.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y. J. Liu. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837.
- Steinman, R. M. 2003. Some interfaces of dendritic cell biology. *Apmis* 111:675-697.
- Steward, M. W., and F. C. Hay. 1976. Changes in immunoglobulin class and subclass of anti-DNA antibodies with increasing age in N/ZBW F1 hybrid mice. *Clin Exp Immunol* 26:363.
- Stumbles, P. A. 1999. Regulation of T helper cell differentiation by respiratory tract dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 77:428.
- Subklewe, M., C. Paludan, M. L. Tsang, K. Mahnke, R. M. Steinman, and C. Munz. 2001. Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr virus-transformed B cells and expand tumor-reactive CD8(+) killer T cells. *J Exp Med* 193:405-411.
- Suvas, S., U. Kumaraguru, C. D. Pack, S. Lee, and B. T. Rouse. 2003. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 198:889.
- Szomolanyi-Tsuda, E., and R. M. Welsh. 1996. T cell-independent antibody-mediated clearance of polyoma virus in T cell-deficient mice. *J Exp Med* 183:403-411.
- Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335.
- Taniguchi, T., and A. Takaoka. 2001. A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:378-386.

- Taoufik, Y., O. Lantz, C. Wallon, A. Charles, E. Dussaix, and J. F. Delfraissy. 1997. Human immunodeficiency virus gp120 inhibits interleukin-12 secretion by human monocytes: an indirect interleukin-10-mediated effect. *Blood* 89:2842.
- Tassaneetrithep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumpfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger, and M. A. Marovich. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 197:823.
- Thomsen, A. R., A. Nansen, C. Andersen, J. Johansen, O. Marker, and J. P. Christensen. 1997. Cooperation of B cells and T cells is required for survival of mice infected with vesicular stomatitis virus. *Int Immunol* 9:1757-1766.
- Totapally, B. R., and W. T. Walsh. 1998. Pneumococcal bacteremia in childhood: a 6-year experience in a community hospital. *Chest* 113:1207-1214.
- Turner, B. C., E. M. Hemmila, N. Beauchemin, and K. V. Holmes. 2004. Receptor-dependent coronavirus infection of dendritic cells. *J Virol* 78:5486.
- Turville, S. G., P. U. Cameron, A. Handley, G. Lin, S. Pohlmann, R. W. Doms, and A. L. Cunningham. 2002. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 3:975.
- Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, S. Ghose, C. J. Kirschning, R. D. Issels, and H. Wagner. 2002. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277:15107-15112.
- Vabulas, R. M., S. Braedel, N. Hilf, H. Singh-Jasuja, S. Herter, P. Ahmad-Nejad, C. J. Kirschning, C. Da Costa, H. G. Rammensee, H. Wagner, and H. Schild. 2002. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem* 277:20847-20853.
- Vakharia, V. N., M. A. Devaney, D. M. Moore, J. J. Dunn, and M. J. Grubman. 1987. Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J Virol* 61:3199-3207.
- Vanderlugt, C. L., and S. D. Miller. 2002. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2:85.
- Verdaguer, N., M. G. Mateu, D. Andreu, E. Giralt, E. Domingo, and I. Fita. 1995. Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *Embo J* 14:1690-1696.
- Vincent, I. E., C. P. Carrasco, B. Herrmann, B. M. Meehan, G. M. Allan, A. Summerfield, and K. C. McCullough. 2003. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol* 77:13288.
- Vinuesa, C. G., D. M. Sze, M. C. Cook, K. M. Toellner, G. G. Klaus, J. Ball, and I. C. MacLennan. 2003. Recirculating and germinal center B

cells differentiate into cells responsive to polysaccharide antigens. *Eur J Immunol* 33:297-305.

- Vos, Q., Lees, A., Wu, Z., Snapper, CM. and J.J. Mond. 2000. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev* 176:154-170.
- Wei, B., P. Velazquez, O. Turovskaya, K. Spricher, R. Aranda, M. Kronenberg, L. Birnbaumer, and J. Braun. 2005. Mesenteric B cells centrally inhibit CD4+ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2010.
- Wigdorovitz, A., P. Zamorano, F. M. Fernandez, O. Lopez, M. Prato-Murphy, C. Carrillo, A. M. Sadir, and M. V. Borca. 1997. Duration of the foot-and-mouth disease virus antibody response in mice is closely related to the presence of antigen-specific presenting cells. *J Gen Virol* 78 ( Pt 5):1025-1032.
- Won, W. J., and J. F. Kearney. 2002. CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice. *J Immunol* 168:5605-5611.
- Wykes, M., A. Pombo, C. Jenkins, and G. G. MacPherson. 1998. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol* 161:1313-1319.
- Yamamoto, K., T. Kobayashi, and T. Murakami. 1982. Arterial terminals in the rat spleen as demonstrated by scanning electron microscopy of vascular casts. *Scan Electron Microsc*:455-458.
- Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169:6668.
- Zamorano, P., A. Wigdorovitz, M. Perez-Filgueira, C. Carrillo, J. M. Escribano, A. M. Sadir, and M. V. Borca. 1995. A 10-amino-acid linear sequence of VP1 of foot and mouth disease virus containing B- and T-cell epitopes induces protection in mice. *Virology* 212:614-621.
- Zhang, X., L. Li, J. Jung, S. Xiang, C. Hollmann, and Y. S. Choi. 2001. The distinct roles of T cell-derived cytokines and a novel follicular dendritic cell-signaling molecule 8D6 in germinal center-B cell differentiation. *J Immunol* 167:49-56.
- Zinkernagel, R. M., S. Ehl, P. Aichele, S. Oehen, T. Kundig, and H. Hengartner. 1997. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev* 156:199-209.
- Zuniga, M. C. 2002. A pox on thee! Manipulation of the host immune system by myxoma virus and implications for viral-host co-adaptation. *Virus Res* 88:17-33.