

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

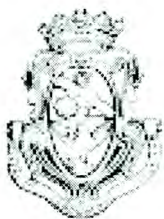
Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica Clínica
CIBICI-CONICET



TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Efecto del envejecimiento sobre el sistema inmune
asociado a mucosas.

Inducción de respuesta inmune específica utilizando
olideoxinucleótidos que contienen motivos CpG como
adyuvante por vía oral”

Bioq. Diego Oscar Alignani

Córdoba, Argentina

-2006-

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS

Signatura R-T

Opusculo 574.29

..... A

..... 10458

.....

..... del autor

.....

.....

.....

.....

.....

Fecha de Ingreso 09/02/07



--	--	--	--

Director de Tesis:

Prof. Dra. María Cristina Pistoressi



Comisión Asesora:

Prof. Dr. Gustavo A. Nores

Prof. Dr. German A. Roth

Prof. Dr. Víctor G. Morón

81

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Fue realizado gracias al apoyo económico del Ministerio de Salud de la Nación, SeCyT (UNC), Agencia Córdoba Ciencia, CONICET; y a las becas otorgadas por la Agencia Córdoba Ciencia durante el período 2001-2004, y el CONICET durante el período 2004-2006.

Agradecimientos

A Cristina, por darme la oportunidad de formar parte del grupo de trabajo y brindarme su apoyo durante todo este tiempo. Por respetar mis decisiones y darme libertad para elegir el camino a seguir Por permitirme discutir de igual a igual.

A los miembros de la comisión de tesi: Dr. Nores, Dr. Roth, Dr. Hliba (hasta su jubilación) y Dr. Morón, por acompañar el desarrollo de este trabajo y realizar un valioso aporte con sus críticas y sugerencias.

A Belkys, en ella encontré una amiga que supo aconsejarme tanto en el plano profesional como en el plano personal, que me ayudó a dar mis primeros pasos en este trabajo, y supo acompañarme y guiarme durante todo el camino recorrido. Por su sinceridad. Por enseñarme que nunca nada está perdido, que siempre se puede hacer algo más, a no darme por vencido.

A Miriam, por ser una excelente amiga y compañera, siempre dispuesta a ayudar. Por hacer tan gratas las largas horas en los días de experimento. Porque estamos en el mismo tren y supo comprenderme en los momentos buenos, pero sobre todo en los difíciles. Gracias por las charlas y los mates de todos los días.

A Gabriel, por brindarme su amistad. Por su alegría y su generosidad. Por ayudarme al principio, antes de irse a Francia, y durante toda esta ultima etapa con su experiencia, su sabiduría y su inteligencia.

A Andrea, gracias por ayudarme en mis comienzos. Por los buenos momentos compartidos. Por las charlas y los consejos a nivel profesional y personal.

A Romina e Inés, porque desde que llegaron al laboratorio nos contagiaron su juventud, entusiasmo y frescura. Por su gran ayuda en las tareas cotidianas y su consideración.

Al grupo de profesores y becarios del laboratorio 103 “el grupo de chagas” por su excelente predisposición y colaboración. En especial a Eva y a Cinthia, con quien compartimos la carrera de grado e innumerables mañanas de mate y criollitos estudiando para los cursos de Doctorado. A Carolina, por los viajes a Argüello, por su amistad. A Natalia, por los momentos de catarsis.

A todo el grupo del laboratorio 104 “el grupo de autoinmunidad” por su generosidad y predisposición. En especial a Carina, quién me ayudó a solucionar problemas y dudas en común. A Rubén, por los momentos compartidos en los congresos. A Gerardo y Juan Pablo por las alegrías y tristezas en el fútbol.

Al cuerpo de profesores y becarios del departamento de bioquímica Clínica, quienes en mayor o menor medida ayudaron a realizar este trabajo de tesis. En especial a Alex Saka por brindarme su experiencia como bacteriólogo para realiza el aislamiento de microorganismos de la flora comensal intestinal.

A todos los chicos del fútbol, por los buenos momentos compartidos fuera de la facultad, tanto en las victorias como en las derrotas.

A Adriana Berreta, Liliana Ferreira, Martha Flores, Alejandra Romero y Luis Navarro, su esfuerzo diario hacen posible nuestro trabajo.

A mi grupo de amigos Nano, Pepa, Seba, Leo, Negro, Ariel, Turco, Diego, Topo. Por su amistad durante tanto tiempo. Por los asados, charlas, proyectos, Rally, vacaciones y salidas de pesca compartidos.

A mis padres, Eli y Oscar. Por mostrarme el camino. Por apoyarme durante toda mi carrera. Por ser siempre el ejemplo a seguir.

A mis hermanos, Cristi y Nico. Por compartir tantos juegos, travesuras y peleas de chicos. Por los años en compartidos en Córdoba. Por su amistad.

A Laura, por querer compartir su vida conmigo. Por brindarme su amistad y su amor. Porque es una persona admirable. Por sufrir y alegrarse conmigo. Por levantarme en los momentos difíciles. Por tolerar mis ausencias. Porque gracias a su empuje hoy estoy pasando por este momento.

A Tomás, lo más importante en nuestra vida.

A Laura
A Tomás

VI

A mis padres
A mis hermanos

VII

Índice

Introducción	1
Células T	3
Células B	6
Inmunidad innata	8
Sistema inmune asociado a mucosas	10
Adyuvantes de mucosas	14
Objetivos	19
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Resultados	21
<i>Capítulo I</i>	
Estudios del sistema inmune asociado a mucosas en animales viejos	22
Estudios histológicos	23
Recuento de linfocitos intraepiteliales	24
Estudios fenotípicos de células presentes en placas de Peyer, Ganglios mesentéricos y bazo	25
Subpoblaciones de linfocitos B en ganglios mesentéricos	26
Expresión de moléculas co-estimuladoras en células de placas de Peyer y ganglios mesentéricos	27
Recuento de células plasmáticas en la lámina propia intestinal	29
Análisis fenotípico de linfocitos B de cavidad peritoneal	29
Anticuerpos contra microorganismos de la flora comensal intestinal	31
Células T vírgenes y de memoria en placas de Peyer, ganglios mesentéricos y bazo	32
Perfil de citocinas producidas en respuesta a concanavalina A	35
<i>Capítulo II</i>	
Estimulación <i>in vitro</i> con CpG-ODN de las células del sistema inmune asociado a la mucosa intestinal de animales viejos	37
Inducción de moléculas co-estimuladoras en linfocitos B de placas de Peyer y ganglios mesentéricos	38
Producción de IgM en el sobrenadante de cultivo de células de placas de Peyer y ganglios mesentéricos	40
Producción de IgM en el sobrenadante de cultivo de células de cavidad peritoneal	41
<i>Capítulo III</i>	
Efectos de la inmunización oral utilizando CpG-ODN como adyuvante de mucosas	43
I- Efectos tempranos de la administración de CpG-ODN por vía oral	44
Número total de células de placas de Peyer, ganglios mesentéricos y bazo	44
Estudios fenotípicos de las células de placas de Peyer, ganglios mesentéricos, y bazo	45
Producción de IL-12 en el sobrenadante de cultivo de células de animales jóvenes	46
Producción de IL-12 en el sobrenadante de cultivo de células de animales viejos	47
II- Efectos de la inmunización oral utilizando OVA/CpG-ODN como adyuvante de mucosas	49

II-i Efectos de la inmunización oral con OVA/CpG-ODN en los tejidos linfáticos asociados a mucosas	50
Fenotipo de las poblaciones de placas de Peyer y ganglios mesentéricos	50
Respuesta inmune humoral	52
Respuesta inmune celular	53
Perfil de citocinas en placas de Peyer	54
Fenotipo de las células T productoras de IFN- γ en placas de Peyer	55
II-ii Efectos de la inmunización oral con OVA/CpG-ODN sobre la inmunidad sistémica	56
Estudio fenotípico de las poblaciones de bazo	56
Respuesta inmune humoral en suero	57
Avidéz de los anticuerpos específicos contra OVA	58
Perfil de isotipos de IgG	59
Respuesta inmune celular en bazo	59
Perfil de citocinas en bazo	60
Fenotipo de las células productoras de IFN- γ en bazo	61
II-iii Duración de la respuesta inmune inducida por la inmunización oral con OVA/CpG-ODN	62
Discusión	64
Materiales y métodos	78
Animales	79
Antígenos y adyuvantes	79
Anticuerpos	80
Métodos de ensayo	
Obtención de muestras de suero y lavados intestinales	81
Obtención de suspensiones celulares	81
Cultivo celular	82
Ensayos histológicos y técnicas de coloración	83
Citometría de flujo	85
ELISA	86
Soluciones	88
Bibliografía	94

Abreviaturas

- AMP:** Adenosina monofosfato (del inglés *Adenosin monophosphate*)
- ARN:** Acido ribonucléico
- BCR:** Receptor de la célula B (del inglés *B cell receptor*)
- CD:** Cluster de diferenciación (del inglés *Cluster differentiation*)
- CDs:** Células dendríticas
- CMIS:** Sistema inmune común de mucosas (del inglés *Common mucosal immune system*)
- ConA:** Concanavalina A
- CPA:** Células presentadoras de antígenos
- CpG-ODN:** oligodeoxinucleótidos sintéticos no metilados que contienen motivos citosina-guanina
- CT:** Toxina colérica (del inglés *Cholera toxin*)
- Cy:** Cychrome
- D.O.:** Densidad óptica
- ELISA:** Enzimoinmunoensayo en fase sólida (del inglés *Enzyme linked immunosorbent assay*)
- FAE:** Epitelio asociado a folículos (del inglés *Folicle associated epithelium*)
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína (del inglés *Fluorescein isothiocyanate*)
- GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés *Granulocyte macrophage colony stimulating factor*)
- HBSS:** Solución salina balanceada de Hanks (del inglés *Hank's balanced salt solution*)
- HRP:** Peroxidasa de rábano (del inglés *Horseradish preoxidase*)
- IFN:** Interferón
- Ig:** Inmunoglobulina
- IL:** Interleucina
- KSCN:** Tiocianato de potasio
- Li:** Linfocito
- LPS:** Lipopolisacárido bacteriano
- LT:** Toxina termolábil de *Escherichia coli* (del inglés *Labile toxin from E. coli*)
- MALT:** Tejido linfoide asociado a mucosas (del inglés *Mucosal associated lymphoreticular tissues*)
- MFI:** Intensidad media de fluorescencia (del inglés *Mean fluorescence intensity*)

- MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés *Major Histocompatibility complex*)
- MPL:** Monofosforil lípido A (del inglés *Monophosphoril lipid A*)
- NK:** Células *Natural Killers*
- OPD:** o-fenilendiamina (del inglés *o-phenylenediamine*)
- OVA:** Albúmina de huevo de gallina (del inglés *ovalbumin*)
- PAMP:** Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *Pathogen associated molecular patterns*)
- PAS:** Reacción del ácido peryódico con bases de Schiff (del inglés *Peyodic acid-Schiff*)
- PBS:** Solución tampón de fosfatos (del inglés *Phosphate balanced solution*)
- PE:** Ficoeritrina (del inglés *Phicoeritrin*)
- PMSF:** Fenilmetilsulfonifluoruro
- pIgR:** Receptor de inmunoglobulinas poliméricas (del inglés *Polimeric immunoglobulin receptor*)
- PRR:** Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés *Pattern recognition receptors*)
- SD:** Desviación estándar (del inglés *Standard deviation*)
- SFB:** Suero fetal bovino
- TCR:** Receptor de la célula T (del inglés *T cell receptor*)
- TGF:** Factor de crecimiento transformante (del inglés *Transforming grow factor*)
- Th:** Células T cooperadoras (del inglés *T helper cells*)
- TLR:** Receptores tipo Toll (del inglés *Toll like receptors*)
- TNF:** Factor de Necrosis Tumoral (del inglés *Tumor Necrosis Factor*)

Introducción

Introducción

El sistema inmune sufre un dramático remodelamiento relacionado con el envejecimiento que lleva a cambios que incluyen ganancias y pérdidas (Castle, 2000; Globerson and Effros, 2000). Se han descrito modificaciones en la inmunidad celular, la inmunidad humoral, y la inmunidad innata (Linton and Dorshkind, 2004; Plackett et al., 2004). Estos cambios contribuyen a aumentar la morbilidad y mortalidad en este período de la vida ya que se observa un aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas, respuesta autoinmune y cáncer (Ginaldi et al., 2001; Grubeck-Loebenstein and Wick, 2002). Además, la efectividad de la vacunación es menor en los individuos envejecidos (Grubeck-Loebenstein and Wick, 2002).

La mayoría de las infecciones utilizan las superficies mucosas como puerta de entrada al organismo. Uno de los ejemplos más claros se relaciona con la patología producida por el virus de influenza, que se transmite a través de la mucosa nasal. La morbilidad y mortalidad asociada con esta enfermedad están aumentadas en la población envejecida, y de hecho, la mayoría de las muertes asociadas con infecciones bacterianas después de padecer esta patología se observan en este segmento de la población. Aunque la inmunización reduce las hospitalizaciones, el riesgo de neumonía y la muerte asociada a la enfermedad, mientras que la efectividad de la vacunación en individuos jóvenes es de 65 a 80%, en ancianos es solo del 30 al 50% (Ruh et al., 1998). Murasko et al. indican que cuando se vacuna contra el virus de influenza a ancianos se observa una disminución en la respuesta humoral y celular específica, estando ambas comprometidas en la menor respuesta protectora encontrada en este grupo etario (Murasko et al., 2002). Recientemente, Villari et al. realizaron un análisis de la eficacia de la vacunación para influenza con pacientes de distintas edades y observaron una clara disminución de dicha eficacia a medida que aumenta la edad (Villari et al., 2004).

A continuación se describen brevemente los principales cambios observados durante el envejecimiento en los distintos componentes del sistema inmune.

Células T

La mayoría de los estudios que analizaron el efecto del envejecimiento sobre el sistema inmune se han realizado sobre células T. La célula T es dramáticamente afectada por el envejecimiento. Los principales cambios encontrados son: **i)** una reducción en el número de células T vírgenes asociada a una profunda involución del timo; **ii)** alteración en el fenotipo de los linfocitos T periféricos, con un aumento en el número de células de memoria; **iii)** una disrupción en las vías de activación celular, por ejemplo, a nivel del señalamiento a través del TCR y moléculas estimuladoras. Además se observaron alteraciones en el control de la apoptosis y de la maquinaria del ciclo celular.

Las alteraciones encontradas en el compartimiento de linfocitos T tienen un rol crítico en el envejecimiento. La involución tímica es una de las características de un sistema inmune envejecido. A medida que avanza la edad, el timo sufre una reducción progresiva de su tamaño debido a profundos cambios en su anatomía asociados con pérdida de células epiteliales tímicas y una disminución de la generación de timocitos.

Los primeros esfuerzos realizados en el estudio de los cambios en el sistema inmune durante el envejecimiento se centraron en la posible pérdida o alteración en el número de linfocitos T circulantes (Franceschi et al., 2000a; Spaulding et al., 1999). Este enfoque tiene sentido, teniendo en cuenta que los linfocitos T son producidos por el timo, que como se mencionó anteriormente, es un órgano que se atrofia progresivamente durante el envejecimiento resultando en la pérdida de su capacidad para generar y exportar células T hacia la periferia (Pawelec et al., 1996). Sin embargo, la disminución en la salida de linfocitos T del timo no resulta en un cambio significativo en el número de los linfocitos T circulantes (Mocchegiani and Malavolta, 2004; Pawelec, 1999; Pawelec et al., 1996). El número de células T circulantes, parece estar mantenido por mecanismos de regulación homeostáticos compensatorios, que causan una expansión de los linfocitos T maduros independiente del timo. Debido a que las células T maduras tienen una vida media finita, se cree que la continua proliferación de estas células durante el envejecimiento llevaría a la acumulación de células T, un proceso denominado

senescencia replicativa. Sin embargo, la población de células T presenta una disminuida capacidad para responder a antígenos nuevos o conocidos. Además, esta expansión de los linfocitos T maduros, lleva a una reducción en el repertorio de receptores de linfocitos T (TCR) en la periferia (Mocchegiani and Malavolta, 2004; Pawelec et al., 1996), y numerosos estudios demuestran una disminuida capacidad para proliferar frente a mitógenos y varios estímulos de activación cuando se comparan con los de animales jóvenes (Baggio et al., 1998; O'Mahony et al., 1998; Trzonkowski et al., 2003).

Otro de los cambios importantes observados durante el envejecimiento es una alteración en el fenotipo de los linfocitos T periféricos, con un menor porcentaje de células T vírgenes y un mayor porcentaje de linfocitos T de memoria. Recientemente se ha postulado que el aumento en el número de células T CD8+ con este fenotipo puede ser una consecuencia no sólo de la involución tímica, que lleva a una disminución de la producción de linfocitos T vírgenes, sino que también puede ser el resultado de estímulos antigénicos repetitivos, principalmente por infecciones virales persistentes como la infección con citomegalovirus (Looney et al., 1999; Pawelec et al., 2004). Este “stress crónico” resulta en un agotamiento clonal, y como consecuencia, el compartimiento de linfocitos T se encuentra superpoblado con un repertorio limitado de clones que han sido crónicamente expandidos y presentan características de células senescentes, es decir, que son menos susceptibles a la muerte por apoptosis y pierden la capacidad de dividirse (Appay et al., 2002; Effros et al., 1994; Effros and Pawelec, 1997). En contraposición, las células T CD4+ son más susceptibles a la muerte por apoptosis, lo que resulta, en humanos, en una inversión de la relación CD4:CD8 respecto a los adultos jóvenes (Pawelec et al., 1996).

Es importante destacar que además de los linfocitos T CD4 y CD8, hay subpoblaciones particulares de linfocitos T, como los linfocitos NKT (del inglés Natural Killers), que expresan TCR conformado por cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Estas células son centinelas del sistema inmune y actúan como primera línea de defensa contra las infecciones. Las que poseen el receptor $\alpha\beta$, son de origen tímico, mientras que las que poseen el receptor $\gamma\delta$, son de origen extratímico (principalmente producidas por el hígado) (Mocchegiani and Malavolta, 2004). Durante el envejecimiento se producen cambios en ambas subpoblaciones. Se ha demostrado que tanto el número de células de origen tímico, como las de

origen extratímico, disminuye en ratones viejos. Sin embargo, en los ratones muy viejos, la población $\gamma\delta$ está preservada. Estos hallazgos experimentales sugieren que la presencia de células con un TCR $\gamma\delta$ está asociada con un envejecimiento exitoso, y además, que la generación extratímica de estas células es fundamental en la función inmune durante el envejecimiento (Mocchegiani et al., 2004).

Los cambios observados en el compartimiento de células T también están reflejados en un desvío en el perfil de citocinas. La activación de los linfocitos T luego de un estímulo antigénico habitualmente requiere de la producción de IL-2 y de citocinas Th1 o Th2. Varios estudios han demostrado un desvío en el perfil de citocinas hacia Th2 asociado al envejecimiento, caracterizado por mayor producción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Pawelec, 1999; Sandmand et al., 2002; Shearer, 1997). Esto se traduce en una disminución en la respuesta pro inflamatoria y un aumento en la respuesta antiinflamatoria que contribuye a una disminuida resistencia contra las infecciones bacterianas. Este desvío en la producción de citocinas favorece la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B.

Este desvío en el perfil de respuesta inmune observado durante el envejecimiento puede ser debido a una respuesta compensatoria a la sobreproducción de citocinas proinflamatorias, como TNF- α o IL-6, por el sistema inmune innato envejecido (O'Mahony et al., 1998).

Para producir una adecuada respuesta inmune, los linfocitos T deben estar preparados para responder a estímulos externos. La mayoría de esos estímulos utilizan receptores en la superficie de los linfocitos T para inducir una respuesta adecuada. Además, esta señal debe ser traducida desde el receptor, a través de moléculas intermediarias que intervienen en la señalización hacia el núcleo, lo que finalmente lleva a la transcripción de genes específicos. El receptor más importante en los linfocitos T es el complejo de moléculas TCR/CD3, el que luego de su unión al ligando proporciona la primera señal para la activación de la célula T (Nel and Slaughter, 2002). Además, hay una variedad de receptores en la célula T capaces de dar la segunda señal que asegura una activación efectiva y sostenida de la célula T. Estos eventos llevan finalmente a la síntesis de IL-2 y la proliferación de la célula T (Rudd and Schneider, 2003).

Recientemente, se ha demostrado la presencia de microdominios de membrana denominados Lipid-rafts, que actúan como plataformas de señalización (Laude and Prior, 2004). Estos, son estructuras ricas en colesterol, esfingolípidos y proteínas de señalización y participan en la formación de la sinapsis inmunológica entre las células presentadoras de antígenos y las células T (Taner et al., 2004). El envejecimiento está asociado a una alteración en las vías de señalización de la célula T que intervienen en la primera señal, la segunda señal, o ambas (Pawelec et al., 2001). Existen numerosas alteraciones en las cascadas de señalización, que incluyen disminuciones en la fosforilación de tirosina quinasas, metabolismo del calcio y otras (Larbi et al., 2004). Además, recientemente se ha descrito que los animales viejos presentan un aumento en la cantidad de colesterol y esfingolípidos, y una disminución en fosforilación de las tirosinas de las proteínas Lck y LAT. La función de los Lipid-raft también se encuentra alterada presentando una menor polarización de los Lipid-raft de los animales viejos (Larbi et al., 2004).

Células B

Durante su desarrollo, las células B deben transitar por varios estadios durante los cuales son capaces de expresar IgM en su superficie antes de abandonar la médula ósea hacia los órganos linfáticos secundarios. En dichos estadios los progenitores comprometidos al linaje de células B (denominadas células proB) sufren recombinación de los genes de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas, proliferan rápidamente y expresan un receptor de células B preliminar, denominado preBCR y responden a la estimulación con IL-7 (en el estadio de célula preB) (Fleming and Paige, 2001; Hardy and Hayakawa, 2001). Finalmente, recombinan los genes de la cadena liviana de las inmunoglobulinas, expresan una IgM de superficie en el estadio de célula preB pequeña, y abandonan la médula ósea como célula B inmadura (Hardy and Hayakawa, 2001). Posteriormente, las células B inmaduras migran hacia el bazo y terminan su diferenciación en linfocitos B maduros.

Se ha demostrado que las células proB de individuos envejecidos expresan menores niveles de las enzimas necesarias para realizar la recombinación de

los genes de inmunoglobulinas como consecuencia de cambios en el microambiente relacionados con la edad (Labrie et al., 2004).

Adicionalmente, se ha demostrado que el número de células preB se encuentra disminuido durante el envejecimiento (Stephan et al., 1996), probablemente como un reflejo de defectos en la progresión del estadio de proB a los estadios subsiguientes debido a una menor respuesta a la IL-7 y menor expresión de preBCR por parte de estas células (Sherwood et al., 1998; Sherwood et al., 2000; Stephan et al., 1997). Como el preBCR también interviene en la selección de clones específicos de linfocitos B la disminución en los niveles de expresión del preBCR, también repercute en el repertorio de células B maduras que se encuentran en la periferia.

Las células B maduras se dividen en tres subpoblaciones principales: foliculares, de zona marginal y B1. Las células B foliculares constituyen la subpoblación mayoritaria de los linfocitos B periféricos y, luego de la respuesta a un antígeno, generan células productoras de anticuerpos y centros germinales, que finalmente llevan a la producción de células de memoria (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005). Por el contrario, las células B de zona marginal actúan como primera línea de defensa contra antígenos presentes en la sangre, y no contribuyen normalmente a la formación de centros germinales (Martin and Kearney, 2002). Las células B1 poseen un origen fetal y contribuyen principalmente a la protección contra antígenos T independientes (Alugupalli et al., 2004).

El impacto del envejecimiento en el compartimiento de linfocitos B periféricos es complejo y se produce en un amplio rango de características. Los primeros estudios demostraron que las células B maduras en los ratones viejos exhiben un alterado repertorio de BCR (LeMaoult et al., 1997; Nicoletti et al., 1993), una incapacidad para generar hipermutación somática de las regiones V de los genes de inmunoglobulinas en centros germinales (Miller and Kelsoe, 1995), y una incrementada longevidad asociada a una menor producción de linfocitos B desde la médula ósea (Kline et al., 1999). Además, estudios de nuestro grupo demostraron que los linfocitos B de animales viejos presentan una menor susceptibilidad a la muerte por apoptosis mediada por estímulos a través del BCR (Montes et al., 2006).

Recientemente se ha demostrado que durante el envejecimiento existen mecanismos que hacen que se mantengan células B de zona marginal y B1 (Johnson et al., 2002), las que poseen un repertorio limitado de especificidad en sus BCR asociados con la respuesta a antígenos bacterianos (Martin and Kearney, 2002). Este cambio en la composición de las subpoblaciones de linfocitos B con el envejecimiento, probablemente contribuya a alteraciones funcionales de los linfocitos B, que finalmente lleven a una disminución en la capacidad de los individuos envejecidos para desarrollar una respuesta inmune humoral eficiente.

Inmunidad innata

El sistema inmune innato es necesario tanto como primera barrera de defensa frente a una agresión externa como para la activación de las células presentadoras de antígeno (CPA) que desencadenan la respuesta inmune específica (Janeway and Medzhitov, 2002). Las consecuencias de una función alterada del sistema inmune innato durante el envejecimiento es un área de gran interés. Sin embargo, existe escasa información acerca de su comportamiento durante el envejecimiento y algunos de los datos bibliográficos son contradictorios. Por un lado el aumento de citocinas proinflamatorias se ha relacionado con varios desórdenes (arteriosclerosis o Alzheimer). Por otro lado, una estimulación crónica de la inmunidad innata está asociada con buen pronóstico ya que compensa parcialmente la función disminuida de los linfocitos T.

La evidencia proveniente de estudios con individuos ancianos saludables, indica que con el avance de la edad se produce un estado denominado hiperinflamatorio, que se caracteriza por elevados niveles de mediadores proinflamatorios como IL-6, IL-1b, TNF α , prostaglandina E2, y mediadores antiinflamatorios como el receptor antagonista de IL-1, el receptor de TNF soluble y proteínas de fase aguda (Franceschi et al., 2000b). Este estado puede ser causado por factores intrínsecos de las células del sistema inmune innato o por factores extrínsecos como las hormonas y el medio de citocinas de un microambiente distinto en los individuos viejos. La consecuencia de ello es

una menor respuesta frente a injurias y una mayor susceptibilidad a infecciones.

Los estudios *in vitro* indican que el envejecimiento afecta las células del sistema inmune innato. En los granulocitos neutrófilos, la capacidad fagocítica, la síntesis de intermediarios reactivos del oxígeno y la eficiencia para matar microorganismos están disminuidas durante el envejecimiento (Fulop et al., 2004). Además, los efectos del envejecimiento sobre los neutrófilos incluyen una disminución en la quimiotaxis luego la activación con GM-CSF (Fulop et al., 2004). En macrófagos, se ha descrito una disminución en la producción de especies reactivas de nitrógeno (Lu et al., 1999). Con respecto a las células NK, la citotoxicidad, la producción de citocinas y quimiocinas también se encontraron alteradas (Mocchegiani et al., 2003). Respecto a este punto, se han encontrado aumentos en el número de células NK en ratones, y en humanos. En conclusión, se han descrito cambios en el número y función de múltiples tipos celulares, que en forma global pueden afectar el funcionamiento del sistema inmune innato y adaptativo.

Un gran número de trabajos indican que la función y el número de los macrófagos están alterados durante el envejecimiento. En macrófagos alveolares de rata, se encontró una menor producción de superóxido luego de la estimulación con IFN- γ (Davila et al., 1990), y en la producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico (Kissin et al., 1997; Moron et al., 2000; Tasat et al., 2003). Estudios realizados en ratón, demuestran que los macrófagos peritoneales y esplénicos producen menos óxido nítrico y ARN mensajero para la óxido nítrico sintetasa que los macrófagos de animales jóvenes, como así también una disminuida capacidad fagocítica (Kissin et al., 1997; Lu et al., 1999; Swift et al., 2001). Además, se observó una menor capacidad de los macrófago peritoneales de ratón para producir citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α en respuesta a la estimulación con LPS (Boehmer et al., 2004), y una incrementada producción de IL-10 (Chelvarajan et al., 2005). Estos cambios en la producción de citocinas pueden ser debidos a diferencias en las vías de señalización ya que trabajos recientes indican que los macrófagos de ratones viejos presenta niveles disminuidos de las moléculas de p38 y JNK fosforiladas luego de la estimulación con LPS (lipopolisacárido bacteriano), a pesar de que no se encuentran diferencias en

los niveles de expresión del receptor para LPS (TLR4) (Boehmer et al., 2004; Chelvarajan et al., 2005). En paralelo, los macrófagos de ratones viejos, también producen menores niveles de citocinas proinflamatorias y menor fosforilación de p38 en respuesta a Zymosan, el ligando de TLR2. Igualmente, se ha descrito una menor respuesta a $\text{INF-}\gamma$, debida a una alterada señalización de la vía de Jak y STAT (Renshaw et al., 2002). Sin embargo, la exposición de macrófagos de ambas edades a IL-2 no refleja diferencias en la producción de IL-6 y $\text{TNF-}\alpha$ (Yoon et al., 2004). Estos estudios indican que existen alteraciones relacionadas a la edad en vías de señalización específicas y que las alteraciones se producen a nivel de mediadores intracelulares.

Debido a su rol central en la activación de células T, las células dendríticas (CDs) son consideradas una promisoriosa herramienta para desarrollar inmunoterapia. Sin embargo, pese a los numerosos avances en la biología celular y molecular de las CDs registrados estos últimos años, la participación de estas células en la generación de la respuesta inmune no ha recibido mayor atención durante los estudios de envejecimiento (Uyemura et al., 2002). Por lo que es necesario profundizar en el conocimiento de la función de las CDs durante este período de la vida.

La consecuencia de todos estos cambios observados en la inmunidad sistémica durante el envejecimiento, lleva a una menor capacidad del sistema inmune de individuos viejos para luchar contra las infecciones (nuevas o recurrentes), a menor respuesta luego de la vacunación y a un incremento en el riesgo de autoreactividad.

Sistema inmune asociado a mucosas

La mayoría de las infecciones se producen o se diseminan a través de las superficies mucosas. Es por ello, que resulta de vital importancia el conocimiento de los mecanismos inmunológicos que actúan en dichas superficies, con el fin de adecuar esquemas de inmunización efectivos que permitan realizar una mejor inmunoprofilaxis.

El sistema inmune asociado a mucosas está formado por sitios inductores, como las placas de Peyer (en el intestino) o el anillo linfático de Waldeyer (compuesto por las amígdalas y adenoides) entre otros, que forman colectivamente una red denominada tejidos linfáticos asociados a mucosas o MALT (del inglés: mucosal associated lymphoreticular tissues). En los sitios inductores del MALT hay zonas ricas en células T y zonas ricas en células B (principalmente células B productoras de IgA), además de células presentadoras de antígenos, y otros tipos celulares necesarios para la inducción de respuesta inmune específica (Kiyono and Fukuyama, 2004; Mestecky, 2003; Mowat, 2003). Una de las características particulares del MALT es que posee un epitelio, denominado epitelio asociado a folículos o FAE (del inglés: follicle-associated epithelium) que contiene células epiteliales características, denominadas células M. Estas, cumplen un rol crucial en la inducción de respuesta inmune, ya que son capaces de tomar antígenos presentes en el lumen intestinal, transportarlos y entregarlos intactos a las células presentadoras de antígenos, con las que se encuentran íntimamente relacionadas (Bilborough and Viney, 2004; Iwasaki and Kelsall, 1999). Además, las células del epitelio intestinal contribuyen a la función inmunológica ya que expresan receptores para inmunoglobulinas poliméricas (pIgR), moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y clase II, moléculas de adhesión y producen una variedad de citocinas y quimiocinas (McJhee, 1999).

Luego del ingreso del antígeno al organismo a través de las mucosas, se produce la activación de CD4, células T y células B productoras de IgA. Después de su activación, las células T producen una variedad de citocinas que están involucradas en la activación, el cambio de isotipo de inmunoglobulina y la expresión de moléculas de adhesión en las células B específicas. Tanto las citocinas asociadas a un perfil Th2 como aquellas asociadas a un perfil Th1 favorecen la producción de IgA. La administración de citocinas Th2 como IL4, IL-5, IL-10 e IL-13, y los adyuvantes que desvían la respuesta hacia Th2 inducen la producción de IgA (Asano et al., 2004; Elson, 1999; Kelsall, 1999). Además, las citocinas Th1 (como INF- γ) y el TGF- β (una citoquina muy importante en la inducción de tolerancia oral) contribuyen significativamente a la producción de IgA (Goodrich and McGee, 1998; Nataro, 1999).

La secreción de la IgA en mucosas resulta de un proceso de transporte de la IgA polimérica a través de las células epiteliales luego de la interacción con el pIgR y el posterior clivaje del receptor en la porción apical de las mismas.

Los sitios inductores del MALT continuamente aportan células B y T activadas y de memoria a otros tejidos denominados sitios efectores, como la lámina propia del intestino. La diseminación de las células en los distintos sitios efectores depende de la expresión de moléculas de adhesión específicas como la integrina $\alpha 4\beta 7$, mientras que la diseminación a nivel sistémico depende de la expresión de L-Selectina (Brandtzaeg et al., 1999a; Brandtzaeg et al., 1999b). Las células B activadas sufren diferenciación terminal en la lámina propia intestinal y producen principalmente moléculas de IgA que forman dímeros o grandes polímeros, que durante su secreción, llevan a cabo el proceso de exclusión inmune. La IgG también contribuye a la defensa en las mucosas, sin embargo esta Ig alcanza las secreciones por difusión pasiva desde la sangre y es muy poco frecuente su producción a nivel local (Sanderson, 1999).

El tráfico de los linfocitos entre los sitios efectores e inductores es la base celular de lo que se denomina en conjunto sistema inmune común de mucosas o CMIS (del inglés: common mucosal immune system), mediante el cual la vacunación a través de una superficie mucosa es capaz de inducir respuesta inmune de mucosas en múltiples sitios efectores, relacionados o no relacionados anatómicamente al sitio de inducción (Brandtzaeg et al., 1999a; Brandtzaeg et al., 1999b). Al mismo tiempo, la inmunización a través de las superficies mucosas es capaz de inducir respuesta inmune a nivel sistémico (Haneberg et al., 1994).

Debido a su importancia, el sistema inmune asociado a mucosas recibió especial atención en los últimos años en adultos jóvenes. Sin embargo, los cambios que ocurren en el sistema inmune asociado a mucosas en el envejecimiento no se estudiaron en profundidad.

Las secreciones del sistema inmune asociado a mucosas son probablemente el medio más comúnmente usado para determinar la presencia de anticuerpos de tipo IgA con el objeto de evaluar la respuesta inmune en las mucosas. Es por ello que en ancianos y animales viejos, se investigaron tanto los niveles de IgA total como de IgA específica. Estos estudios determinaron que los niveles

de IgA total en suero y en las secreciones de diferentes mucosas están incrementados o sin cambios respecto a los adultos jóvenes (Kawanishi et al., 1989; Koga et al., 2000; Senda et al., 1988). Además, cuando se estimula *in vitro* inespecíficamente a las células B de placas de Peyer de animales viejos, estas producen mayores niveles de IgA que las de los jóvenes (Kawanishi et al., 1989). En humanos se determinaron mayores concentraciones de IgA total en saliva y se encontró que en los lavados intestinales hay similares niveles de IgA a los detectados en adultos jóvenes (Arranz et al., 1992). También, los estudios llevados a cabo en humanos y animales demostraron que la IgA sérica se encuentra en niveles similares en jóvenes y viejos (Beharka et al., 2001; Koga et al., 2000).

A pesar de lo dicho anteriormente, se encontró que el sistema gastrointestinal de los individuos viejos es particularmente susceptible a las enfermedades infecciosas (Powers, 1992). De hecho, la severidad y mortalidad causadas por patógenos que invaden las mucosas, como el virus de influenza y *Streptococcus pneumoniae* están claramente aumentadas en ancianos. (Bernstein et al., 1999; Mufson, 1999; Webster, 2000). Por este motivo, se estudió la producción de IgA específica durante el envejecimiento. Los experimentos en ratas mostraron una menor respuesta de tipo IgA a la inmunización oral con toxina colérica (CT), y se obtuvieron resultados similares en macacos rhesus (Schmucker et al., 1988; Taylor et al., 1992). En concordancia con estos hallazgos, se encontró que ratones viejos inmunizados por vía oral con proteínas de *Haemophilus influenza* como antígeno y toxina colérica como adyuvante, producen menores niveles de anticuerpos específicos contra el antígeno que los ratones jóvenes (Enioutina et al., 2000).

Trabajos más recientes sugieren que la desregulación del sistema inmune asociado a mucosas ocurre antes que se produzcan cambios a nivel sistémico, ya que ratones de edad intermedia (12 meses), al igual que los ratones viejos (24 meses), presentan una respuesta sistémica y de mucosas disminuida cuando son inmunizados por vía oral utilizando albúmina de huevo de gallina (OVA) como antígeno y CT como adyuvante, respecto a los jóvenes (Koga et al., 2000). Sin embargo, cuando se inmunizan por vía subcutánea con OVA y CT los ratones de 12 meses (edad intermedia), a diferencia de los ratones viejos, responden de manera similar a los ratones jóvenes (Koga et al., 2000).

En conjunto, todos estos resultados indican que frente a una inmunización, la respuesta inmune específica de tipo IgA se encuentra disminuida en los animales viejos.

No obstante los cambios observados en el sistema inmune asociado a mucosas en los animales viejos, es posible desarrollar nuevas estrategias de inmunización que sean efectivas durante este período de la vida. Para ello, es importante encontrar nuevos inmunoestimulantes que se adecuen a las características del sistema inmune de mucosas en los individuos envejecidos.

Adyuvantes de mucosas

A pesar de las atractivas características del sistema inmune asociado a mucosas, en la práctica es a menudo difícil estimular fuertes respuestas de IgA en las mucosas luego de la administración de antígenos. Además, la mayoría de los adyuvantes autorizados para ser utilizados en humanos son inductores de una respuesta inmune específica de tipo Th2 (Grupta, 1996), por lo que existe la necesidad de encontrar nuevos inmunomoduladores capaces de estimular respuestas de tipo Th1 que sean eficaces para la protección contra infecciones con virus y microorganismos intracelulares (Ogra, 2001). Es por ello que los principales esfuerzos en el desarrollo de vacunas de mucosas o inmunoterapia efectivas están dirigidos a la búsqueda de medios más eficientes de administración del antígeno y de nuevos agentes estimulantes seguros y efectivos (Holmgren and Czerkinsky, 2005).

La inmunización a través de diferentes vías, y en particular a través de las mucosas, depende de la coadministración de adyuvantes capaces de iniciar y mantener la transición entre la inmunidad innata y adaptativa. Las estrategias para mejorar las inmunizaciones a través de las mucosas incluyen el uso de bacterias mutantes atenuadas como transportadoras de antígeno heterólogos, encapsulación de antígenos dentro de microesferas, cápsulas de gelatina, liposomas, adsorción en nanopartículas, el uso de complejos inmunoestimulantes lipofílicos, y la utilización de productos bacterianos con propiedades adyuvantes (Ogra, 2001).

Los tres productos bacterianos con mayor potencial para ser utilizados como adyuvantes de mucosas son las enterotoxinas de *Escherichia coli* (LT) y de *Vibrio cholerae* (CT) (Clements et al., 1988; Lycke et al., 1992; Xu-Amano et al., 1993; Yamamoto et al., 1996), los oligonucleótidos sintéticos no metilados que contienen el dinucleótido citosina-guanina (motivos CpG) en un contexto particular de bases (CpG-ODN) (Krieg and Davis, 2001; Krieg et al., 1998b; Weeratna et al., 2000), y el monofosforil lípido A (MPL) (Carozzi et al., 1989; Henricson et al., 1993; Myers et al., 1995).

Una gran cantidad de trabajos abordaron el estudio de la actividad de LT y CT como adyuvantes con una variedad de antígenos virales, bacterianos y fúngicos. Ejemplos representativos incluyen toxoide tetánico (Cheng et al., 1999; Xu-Amano et al., 1994; Xu-Amano et al., 1993; Yamamoto et al., 1996), virus de influenza inactivado (Gluck et al., 1999; Hashigucci et al., 1996; Katz et al., 1997; Tumpey et al., 2001), ureasas recombinantes de *Helicobacter* spp. (Lee, 2001; Lee et al., 1995; Weltzin et al., 1997), proteína A de superficie de *S. pneumoniae* (Wu et al., 1997) y *Candida albicans* entre otros (Cardenas-Freytag et al., 1999; Cardenas-Freytag et al., 2002).

Ambas toxinas CT y LT están compuestas por múltiples subunidades con componentes A y B. La subunidad A es la enzimáticamente activa y está formada por dos cadenas A1 y A2. Cuando las toxinas entran en contacto con las células de mamíferos se unen a su superficie a través de la interacción del pentámero de la subunidad B. El principal receptor para estas toxinas son las moléculas del gangliósido GM-1 presentes en la superficie celular, cuya interacción produce el entrecruzamiento estable de las moléculas de GM-1 sobre la superficie celular. Posteriormente, luego de complejos eventos, la subunidad A1 alcanza el citosol celular y produce finalmente el aumento en la concentración de AMP cíclico. La consecuencia final de todos estos cambios es un flujo de iones cloruro acompañados de agua hacia el lumen intestinal (Cheng et al., 1999; Lencer et al., 1995; Schmitz et al., 2000; Tsai et al., 2001; Zhu et al., 2001).

El efecto adyuvante de CT y LT fue demostrado por primera vez por Clemens et al. quienes encontraron que LT incrementaba la respuesta de anticuerpos en suero contra la OVA (Clements et al., 1988). Además se vio que este efecto era dependiente de la actividad de la subunidad A.

A pesar de la similitud en la estructura y la capacidad de aumentar los niveles intracelulares de AMP cíclico, CT y LT tienen distintas características como adyuvantes: CT activa las células T específicas para el antígeno e induce la liberación de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que proveen cooperación para la producción de IgA en mucosas, como así también de IgG1, Ig e IgE en suero. En contraposición, LT induce una mezcla de células T específicas Th1 y Th2, células productoras de IgA en mucosas y la producción de IgG1, IgG2a e IgA en suero (Bowman and Clements, 2001; Yamamoto et al., 2000).

Sin embargo, LT y CT son potentes enterotoxinas, y cantidades tan pequeñas como 5 µg de CT administrada por vía oral es suficiente para provocar diarrea en humanos. Aunque la efectividad como adyuvantes de mucosas no se probó en humanos, los experimentos llevados a cabo en animales sugieren que la dosis a utilizar debería ser comparable a las dosis tóxicas. Por lo tanto, la enterotoxicidad de estas toxinas limitaría seriamente su uso en la práctica (Levine et al., 1983). Al respecto, se han realizado estudios utilizando mutantes que poseen disminuida toxicidad o utilizando sólo la subunidad B de la toxina. Sin embargo, los resultados muestran que la utilización de la subunidad B de la toxina como adyuvante no es efectiva en la inducción de respuesta inmune específica y que en lugar de ello se induce tolerancia hacia el antígeno (Mutsch et al., 2004).

En los estudios realizados en animales viejos en los que se utilizó como adyuvante la CT, cuyo mecanismo de acción es fuertemente dependiente de la inmunidad celular y de la inducción de un perfil de tipo Th2 (Xu-Amano et al., 1993), se observó que responden pobremente cuando son comparados con animales jóvenes (Koga et al., 2000).

Los CpG-ODN son otros de los productos bacterianos que pueden ser potencialmente usados como adyuvantes de mucosas. El efecto adyuvante de CpG-ODN se debe a que estas moléculas poseen receptores específicos en las células de la inmunidad innata y adaptativa que pertenecen a una familia de receptores denominados TLR (del inglés: toll like receptors), TLR9 (Hemmi et al., 2000), que pertenecen a su vez a una superfamilia de receptores llamados PRR (del inglés pattern recognition receptors), que reconocen patrones moleculares conservados entre distintos microorganismos (PAMPs: del inglés pathogen associated molecular patterns) (Medzhitov and Janeway, 1997). Luego de su interacción con el receptor, la activación de distintas vías de

señalización intracelular lleva a la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, GM-CSF, IL-12) (Klinman et al., 1996), que pueden estimular células NK para producir otras citocinas como IFN- γ (Ballas et al., 1996; Iho et al., 1999; Yamamoto et al., 1994), aumento de la secreción de distintas quimiocinas, aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie de las células presentadoras de antígenos, estimulando la presentación antigénica (Hartmann et al., 1999; Jakob et al., 1998; Sparwasser et al., 1998; Sparwasser et al., 2000; Wild et al., 1999). Además CpG-ODN actúa directamente sobre los linfocitos B induciendo su proliferación, secreción de citocinas, y producción de anticuerpos de manera sinérgica con las señales específicas dadas por el antígeno a través del BCR (Hartmann and Krieg, 2000; Hartmann et al., 2000; Krieg et al., 1995; Liang et al., 1996; Yi et al., 1998; Yi et al., 1996).

Hay evidencias que sugieren que los CpG-ODN poseen un efecto inmunoprolifáctico. Con el objeto de probar esta hipótesis se realizaron estudios en los que se observó resistencia a la infección cuando se inyectaron ratones con CpG-ODN y posteriormente fueron desafiados con una gran variedad de patógenos como, por ejemplo, altas dosis de la bacteria causante del ántrax, listeria, virus del Ebola, herpes virus, citomegalovirus, y parásitos responsables de leishmaniasis y malaria (Ashkar et al., 2003; Chiaramonte et al., 2000; Elkins et al., 1999; Klinman, 1998; Klinman et al., 1999; Krieg et al., 1998a; Pyles et al., 2002; Walker et al., 1999; Zimmermann et al., 1998). El efecto protector se observó varios días luego de su administración y persistió durante varias semanas (Elkins et al., 1999; Klinman et al., 1999; Krieg et al., 1998a).

Además, CpG-ODN estimula potentes respuestas específicas de tipo Th1 cuando es administrado a través de diferentes vías como intramuscular, subcutánea, intranasal y oral con distintos tipos de antígenos derivados de microorganismos, entre ellos toxoide tetánico, Virus de Hepatitis B, citomegalovirus, virus de influenza, *Brucella abortus*, *Micobacterium tuberculosis*, y parásitos como *Leishmania major* y *Tripanosoma cruzi* (Al-Mariri et al., 2001; Brazolot Millan et al., 1998; Eastcott et al., 2001; Frank et al., 2003; Hogarth et al., 2003; McCluskie and Davis, 1998; Mendez et al., 2003; Moldoveanu et al., 1998; Temperton et al., 2003; Verthelyi et al., 2003).

La efectividad de CpG-ODN a nivel sistémico fue probada con éxito en ratones viejos por trabajos de nuestro grupo y de otros autores (Maletto et al., 2002; Maletto et al., 2005; Manning et al., 2001). En estos trabajos, se demostró que la inmunización de ratones viejos utilizando CpG-ODN como adyuvante indujo una respuesta de tipo Th1, con secreción de IFN- γ y respuestas celular y de anticuerpos específicas contra el antígeno, de magnitud similar a la observada en animales jóvenes. Además, encontramos que la respuesta inmune inducida luego de la inmunización con CpG-ODN es comparable a la inducida con el adyuvante de Freund completo, un potente adyuvante Th1, pero está asociada a una menor respuesta inflamatoria y toxicidad (Maletto et al., 2002; Weeratna et al., 2000).

La gran mayoría de los estudios que utilizan CpG-ODN como adyuvante se realizaron utilizando vías de administración sistémica (Krieg and Davis, 2001). Recientemente, se demostró que CpG-ODN es efectivo como adyuvante luego de la administración a través de distintas superficies mucosas y utilizando distintos antígenos (McCluskie and Davis, 2000; McCluskie et al., 2001a; McCluskie et al., 2001b).

Sin embargo, a pesar del avance en el conocimiento de los cambios en el sistema inmune asociado a mucosas en el envejecimiento y en el mecanismo de acción de CpG-ODN como adyuvante de mucosas, no existen estudios que analicen la efectividad de CpG-ODN como adyuvante de mucosas durante el envejecimiento. Por lo tanto, teniendo en cuenta la necesidad de encontrar nuevos adyuvantes efectivos durante el envejecimiento, sería interesante conocer los efectos de CpG-ODN como adyuvante de mucosas en individuos envejecidos.

Objetivos

Objetivo General

Avanzar en el conocimiento de las características del sistema inmune asociado a mucosas de los animales envejecidos, a los fines de adecuar la inmunoprofilaxis durante este período de la vida.

Objetivos Específicos

1- Conocer, las características del sistema inmune asociado a mucosa intestinal en animales viejos.

2- Evaluar la capacidad de CpG-ODN como adyuvante de mucosas en animales viejos.

2-i Analizar, mediante estudios *in vitro*, la capacidad estimuladora de CpG-ODN sobre las células de placas de Peyer, ganglios mesentéricos y cavidad peritoneal.

2-ii Evaluar el efecto de la inmunización oral con OVA/CpG-ODN, en inducción de respuesta inmune específica sistémica y a nivel de la mucosa intestinal.

2-iii Evaluar el efecto de la inmunización oral con OVA/CpG-ODN, en el mantenimiento de la respuesta inmune específica.

Resultados

Capítulo I

Estudios del sistema inmune asociado a mucosas en animales viejos

La inducción de respuesta inmune depende, entre otros factores, del estado del sistema inmune antes de recibir el estímulo antigénico. Así, para poder diseñar esquemas de inmunización que sean efectivos en animales viejos, es necesario conocer antes cuáles son las características de sistema inmune. Es por ello que previamente a evaluar la respuesta inmune inducida a través de las superficies mucosas en los animales viejos, nos propusimos analizar las características del sistema inmune asociado a mucosas en animales viejos normales.

Hipótesis de trabajo: El sistema inmune asociado a mucosas de los animales viejos, al igual que lo que ocurre con la inmunidad sistémica, puede presentar diferencias respecto al de los animales jóvenes y conocerlos nos puede permitir diseñar esquemas de inmunización efectivos en estos animales.

Objetivo específico: Conocer, mediante estudios histológicos, fenotípicos y funcionales, las características del sistema inmune asociado a mucosa intestinal en animales viejos.

Sistema de estudio

En estos estudios se utilizaron ratones Balb/c hembra de 3 meses (adultos jóvenes) y de 18 meses (viejos). Se utilizaron placas de Peyer y ganglios mesentéricos como tejidos asociados a mucosas y bazo como un control de tejido asociado a la inmunidad sistémica.

Estudios histológicos

La mucosa intestinal es uno de los principales sitios de entrada de los antígenos al organismo, y asociado a ella se encuentra una importante cantidad de tejido linfático. Por ello, con el objeto de analizar la mucosa de los animales viejos en forma comparativa a la de los animales jóvenes, se realizaron cortes de intestino de los animales de ambas edades que fueron luego teñidos con hematoxilina y eosina.

El estudio microscópico de los cortes de intestinos de los animales viejos, mostró una estructura similar a la de los intestinos de los animales jóvenes, sin alteraciones en la mucosa.

Con respecto al tejido linfático asociado a la mucosa intestinal, el aspecto macroscópico y el número total de placas de Peyer obtenidas por intestino fueron similares entre animales jóvenes y viejos (Jóvenes: 8 ± 1 ; Viejos: 8 ± 1). Sin embargo, cuando se estudió el número total de células de las placas de Peyer, se encontró que los animales viejos poseen un número de células significativamente menor que los animales jóvenes (Tabla I). Mientras tanto, el número total de células de ganglios mesentéricos no fue significativamente diferente entre los animales viejos y jóvenes (Tabla I).

Tabla I. Número total de células obtenidas de placas de Peyer de animales jóvenes y viejos. ** $p < 0.01$ respecto a los animales jóvenes. Los resultados se expresan como la media \pm SD.

Órgano	Edad (meses)	Nº de células /órgano ($\times 10^6$)
Placas de Peyer	3	1.5 ± 0.2
	18	$0.6 \pm 0.1^*$
Ganglios Mesentéricos	3	3.0 ± 0.7
	18	2.2 ± 0.2

Recuento de linfocitos intraepiteliales

Los linfocitos intraepiteliales actúan como primera línea de defensa contra patógenos que infectan las células del epitelio intestinal, y poseen además funciones regulatorias. Para determinar el número de linfocitos intraepiteliales en los animales viejos, se realizó el recuento de los linfocitos presentes entre las células epiteliales en cortes de intestino de animales de ambas edades teñidos con PAS-Hematoxilina. Interesantemente, los animales viejos presentaron un número significativamente mayor de linfocitos intraepiteliales que los animales jóvenes (Figura 1).

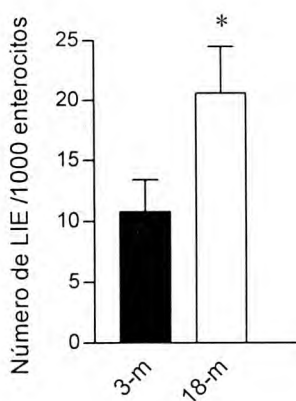


Figura 1. Recuento de linfocitos intraepiteliales. Los intestinos obtenidos de ratones jóvenes y viejos fueron procesados mediante la técnica de Sainte-Marie y posteriormente teñidos con la técnica de PAS-Hematoxilina. El resultado está

expresado como la media \pm SD del número de linfocitos intraepiteliales cada 1000 enterocitos (n=4). * $p < 0.05$ respecto a 3-m.

Estudios fenotípicos de células presentes en placas de Peyer, ganglios mesentéricos, y bazo

Con el fin de estudiar si el envejecimiento está asociado a cambios en la distribución fenotípica de las principales poblaciones de linfocitos presentes en placas de Peyer, ganglios mesentéricos y bazo se analizaron, mediante citometría de flujo los porcentajes de linfocitos B (CD19+) y T (CD4+ y CD8+). En las placas de Peyer y el bazo de los animales viejos la distribución fenotípica de las poblaciones de linfocitos fue similar a la de los animales jóvenes. Sin embargo, en los ganglios mesentéricos, el porcentaje de células CD19+ fue mayor en los animales viejos. Mientras tanto, los porcentajes de linfocitos T (CD4+ y CD8+) fueron similares a los de los ganglios mesentéricos de los animales jóvenes (Figura 2).

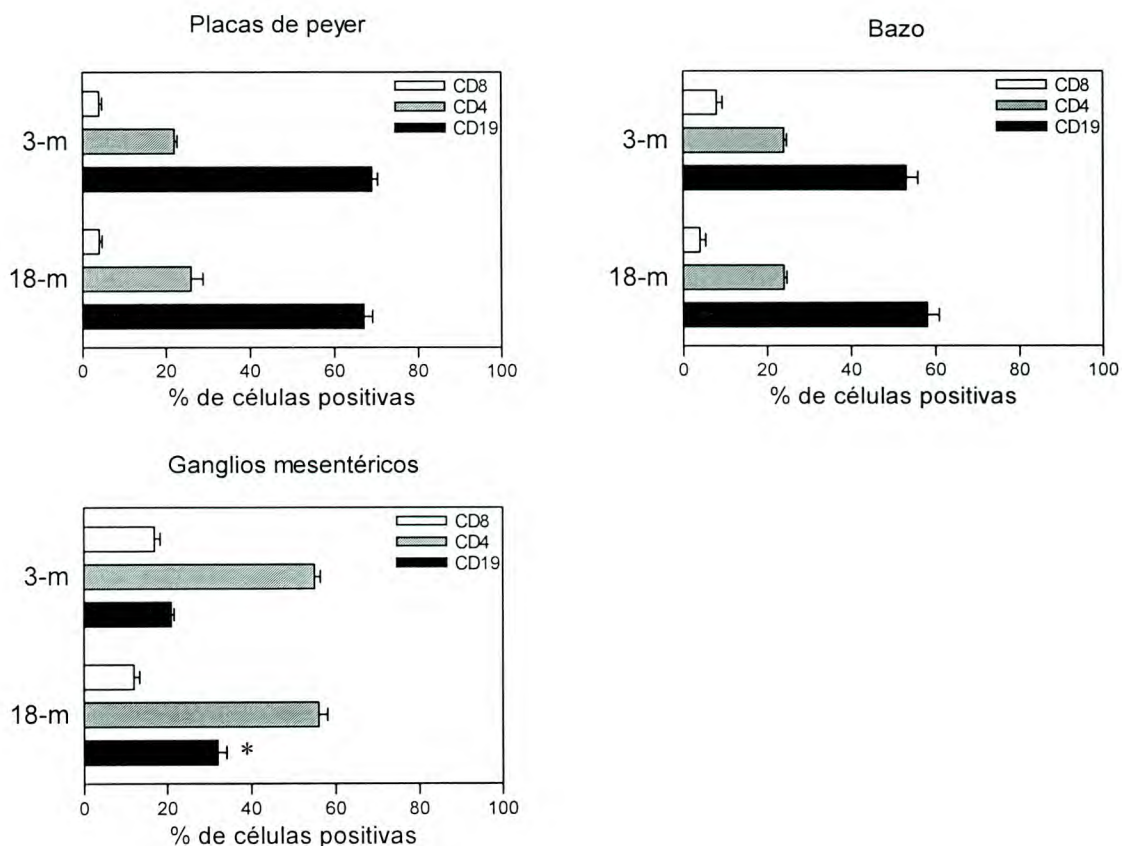


Figura 2. Composición porcentual de las distintas poblaciones celulares. Células obtenidas de placas de Peyer, ganglios mesentéricos, y bazo de animales jóvenes (3m)

y viejos (18m) fueron procesadas y analizadas mediante citometría de flujo utilizando como marcadores anticuerpos específicos para las moléculas de CD19, CD4 y CD8. Los resultados se expresan como la media \pm SD del porcentaje de células positivas para cada marcador (n=3). * $p < 0.05$ respecto a 3-m.

Subpoblaciones de linfocitos B en ganglios mesentéricos

A los fines de analizar si el aumento observado en el porcentaje de linfocitos B presentes en ganglios mesentéricos involucra a todas las subpoblaciones o si se debe al aumento de alguna subpoblación en particular, se estudiaron, mediante citometría de flujo, subpoblaciones de linfocitos B presentes en estos órganos. Para ello se obtuvieron células de ganglios mesentéricos de animales jóvenes y viejos, y se procesaron mediante la técnica de citometría de flujo. Se utilizó el marcador CD38 junto con CD19 para diferenciar las subpoblaciones de linfocitos B maduros o de centro germinal. No se encontraron diferencias en los porcentajes de linfocitos B CD38+ y CD38- entre animales jóvenes y viejos (Tabla II).

Los linfocitos B de memoria de ratón se caracterizan por presentar alta expresión de CD38 y la molécula coestimuladora CD86 (B7-2). La determinación mediante citometría de flujo de los porcentajes de células de memoria, permitió observar que los animales viejos presentan un porcentaje de linfocitos B con fenotipo de memoria similar al de los animales jóvenes. Además se determinó el porcentaje de linfocitos B que expresan IgM en la superficie y no se encontraron diferencias significativas entre los animales jóvenes y viejos (Tabla II). En los ganglios mesentéricos de los animales jóvenes y viejos se observó un porcentaje muy bajo y similar de células syndecan+ (marcador característico de células plasmáticas) (resultado no mostrado).

En resumen, no se encontraron diferencias en la distribución porcentual de las distintas subpoblaciones de linfocitos B presentes en los ganglios mesentéricos de los animales viejos con respecto a lo observado en los animales jóvenes.

Tabla II. Subpoblaciones de linfocitos B (CD19+) en ganglios mesentéricos de animales jóvenes y viejos. Los porcentajes corresponden a un los valores obtenidos en dos experimentos diferentes (E1 y E2).

	3-m	18-m
	E1 - E2	E1 - E2
CD38 ⁺	92 %- 90 %	95 % - 93%
CD38 ⁻	8 % - 9%	5 % - 7%
CD38 ⁺ B7-2 ⁺	2 % -3%	2 % - 3%
IgM ⁺	76 % - 79%	72 % - 74%
IgM ⁻	24 % - 21%	28 % - 26%

Expresión de moléculas coestimuladoras en linfocitos B de placas de Peyer y ganglios mesentéricos

Con el objeto de determinar el estado de activación de los linfocitos B presentes en placas de Peyer y ganglios mesentéricos de animales viejos, se estudió, mediante citometría de flujo, la expresión de CD80, CD86, CD40, y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II). En trabajos previos se reportó un defecto en los animales viejos para llevar a cabo la formación de centros germinales que podría deberse a una deficiencia en la activación de los linfocitos B de animales viejos. Nosotros encontramos que los linfocitos B de placas de Peyer y ganglios mesentéricos de animales viejos presentan un patrón de expresión de moléculas coestimuladoras similar al de los animales jóvenes (Figura 3). Interesantemente, se encontró un ligero aumento en la expresión de la molécula CD86 en linfocitos B de ambos órganos de los animales viejos (Figura 3) y una población de células B que expresa mayores niveles de la molécula de CD80.

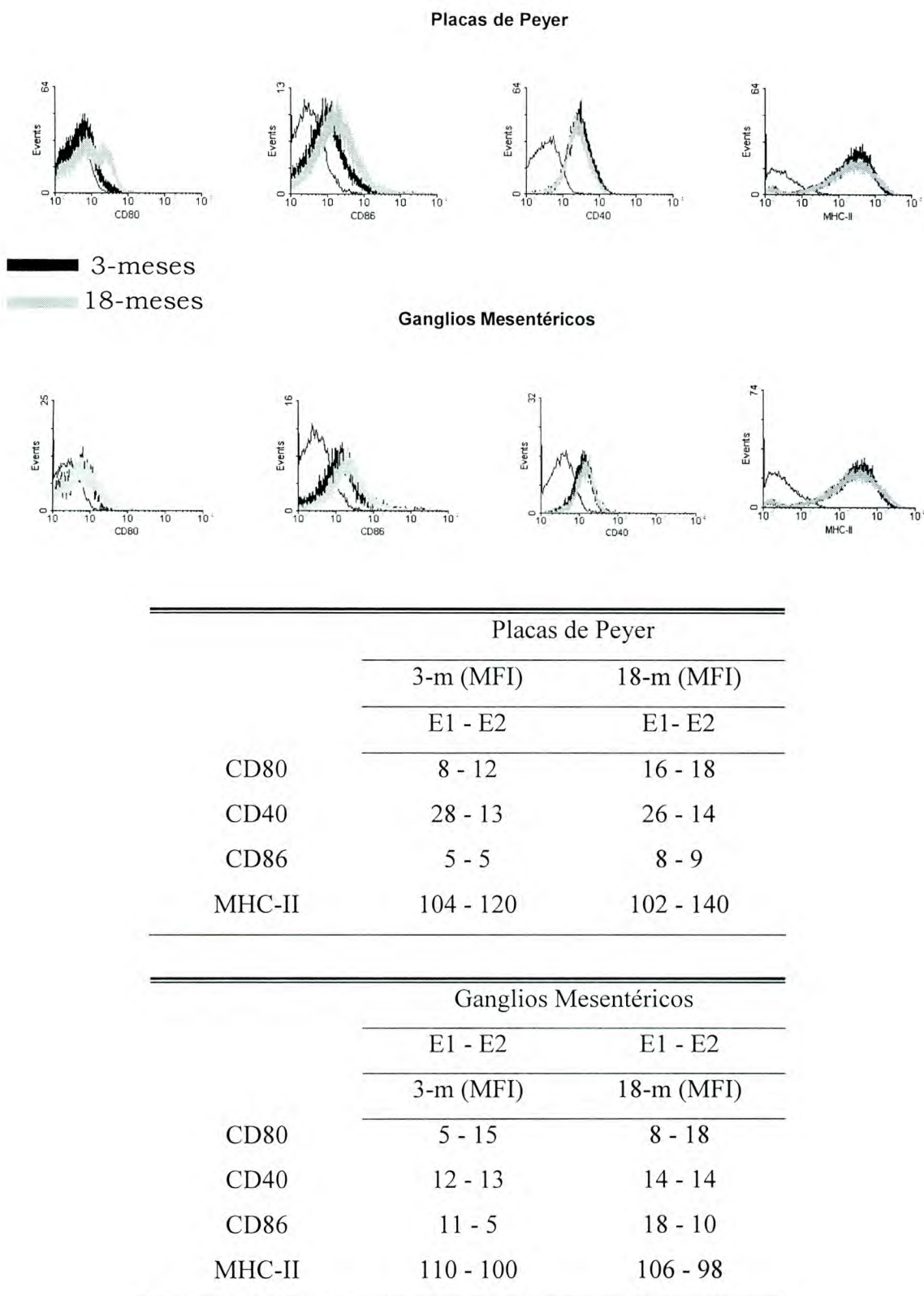


Figura 3. Expresión de moléculas coestimuladoras en linfocitos B de placas de Peyer y ganglios mesentéricos de animales jóvenes (3-m) y viejos (18-m). (A) Histogramas correspondientes a la expresión de CD80, CD86, CD40 y MHC-II representativos de tres experimentos independientes. (B) Valores de intensidad media

de fluorescencia (MFI) correspondientes a los histogramas de la figura 4A. Los resultados corresponden a los valores de dos experimentos independientes (E1- E2) (n=3).

Recuento de células plasmáticas en lámina propia intestinal

La lámina propia del intestino es el principal tejido efector asociado a la mucosa intestinal, en ella se encuentran linfocitos T y B (activados y de memoria), células presentadoras de antígenos, células del estroma, y se lleva a cabo la diferenciación terminal de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de IgA.

En cortes de intestino de ratones jóvenes y viejos, se realizó el recuento de células plasmáticas productoras de IgA en la lámina propia intestinal utilizando la técnica de inmunohistoquímica. El número de células plasmáticas encontrado en los cortes de intestino de los animales viejos fue similar al observado en la lámina propia de animales jóvenes (Figura 4).

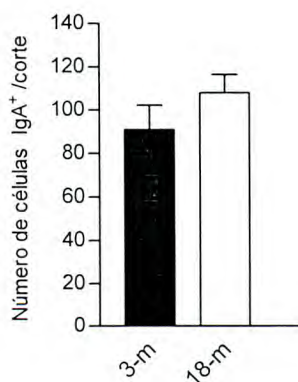


Figura 4. Estudio de células productoras de IgA en lámina propia intestinal de animales jóvenes (3-m) y viejos (18-m). Se realizó el recuento en 30 campos (400X) por corte de intestino y se contaron dos cortes por animal (n=4). El resultado se expresa como la media \pm SD del número de células IgA⁺ por corte.

Análisis fenotípico de linfocitos B de cavidad peritoneal

En la lámina propia intestinal se encuentran células plasmáticas productoras de anticuerpos contra los microorganismos de la flora comensal. Estas células plasmáticas derivan de linfocitos B provenientes de las placas de Peyer y de la

cavidad peritoneal. Es por ello que se decidió estudiar mediante citometría de flujo las poblaciones de linfocitos B de cavidad peritoneal en los animales jóvenes y viejos. En primer lugar se observó que los animales viejos presentan un mayor porcentaje de linfocitos B que los animales jóvenes (Figura 5). Cuando se analizaron marcadores fenotípicos en los linfocitos B, se observó que las relaciones porcentuales entre las distintas subpoblaciones, B1a ($CD19^+ CD5^+ IgM^{hi}$), B1b ($CD19^+ CD5^- IgM^{hi}$) y B convencionales ($CD19^+$, $CD5^-$, IgM^{lo}), fue similar entre ambos grupos de animales (Figura 5).

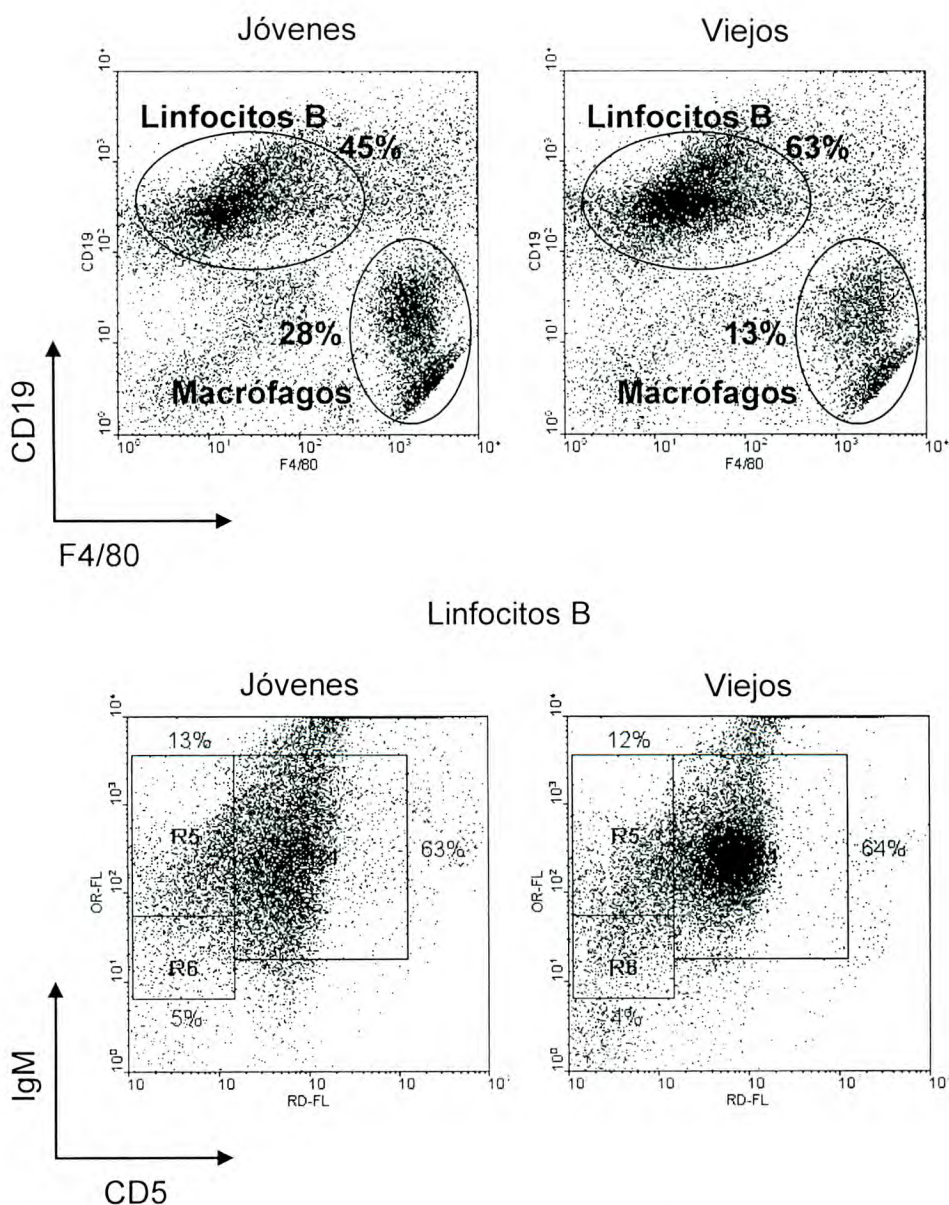


Figura 5. Estudio fenotípico de las poblaciones de linfocitos B en cavidad peritoneal de animales jóvenes (3-m) y viejos (18-m). Las células de cavidad peritoneal de los animales jóvenes y viejos fueron obtenidas mediante lavado de la cavidad peritoneal con medio de cultivo RPMI 1640 y posteriormente procesadas y

analizadas por citometría de flujo. Las poblaciones fueron definidas en base a su expresión de CD19, IgM y CD5.

Anticuerpos contra microorganismos presentes en la flora comensal intestinal

El número de células productoras de IgA fue similar en la lámina propia de los animales jóvenes y viejos. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos B1, cuya principal función, una vez que llegan a la lámina propia intestinal, es la de producir anticuerpos contra microorganismos de la flora comensal, es mayor en los animales viejos. Es por ello, que resultó interesante estudiar los niveles de anticuerpos contra microorganismos de la flora comensal presentes en el lumen intestinal.

Para ello, se obtuvieron los lavados intestinales de animales jóvenes en condiciones de esterilidad, y se los cultivó en diferentes medios no selectivos en condiciones de aerobiosis y de anaerobiosis. De esta forma se trató de aislar mayor variedad de microorganismos presentes en el lumen intestinal. Posteriormente, se sensibilizaron placas de ELISA con una mezcla de las bacterias obtenidas en los diferentes medios de cultivo y se incubaron con los lavados intestinales provenientes de los animales jóvenes y viejos. Interesantemente, se observó que el título de anticuerpos de tipo IgA contra microorganismos de la flora comensal encontrado en los lavados intestinales de animales viejos, fue significativamente mayor al observado en los animales jóvenes (Figura 6).

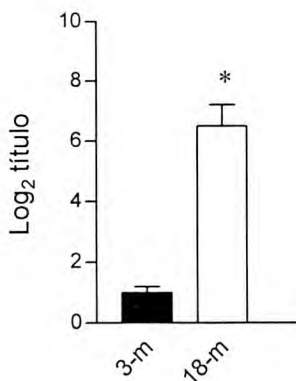


Figura 6. Niveles de anticuerpos de tipo IgA contra microorganismos de la flora comensal intestinal presentes en animales jóvenes (3-m) y viejos (18-m). El resultado se expresa como la media \pm SD del log₂ de la mayor dilución de lavado

intestinal que posee una D.O. con un valor 2 veces superior a la D.O. del promedio del blanco en un ensayo de ELISA (n=5). * $p < 0.05$ respecto a 3-m.

Células T vírgenes y de memoria en placas de Peyer, ganglios mesentéricos, y bazo

Uno de los cambios asociados con el envejecimiento es el aumento en el porcentaje de células T con un fenotipo de memoria a nivel sistémico. Sin embargo, se ignora si un cambio similar ocurre en la mucosa intestinal de ratones Balb/c envejecidos. Para investigar si el envejecimiento afecta los porcentajes de linfocitos T vírgenes y de memoria en la mucosa intestinal, se realizó citometría de flujo utilizando como marcadores CD3, CD45RB y CD62-L (L-Selectina). Las células T vírgenes fueron identificadas como CD3+ CD45RB+ CD62-L+ y las células de memoria como CD3+ CD45RB- CD62-L+/- . En placas de Peyer, ganglios mesentéricos, y bazo, se encontró un aumento en el porcentaje de linfocitos T de memoria en los animales viejos respecto a los animales jóvenes a expensas de la disminución en el porcentaje de células con fenotipo de vírgenes (Figura 7). El aumento de la población de células T con fenotipo de memoria fue más evidente en las placas de Peyer (3m: 45%; 18m: 75%) que en los ganglios mesentéricos (3m: 24%; 18m: 38%) y el bazo (3m: 28%; 18m: 56%) de los animales viejos. Posteriormente, se identificaron las células T vírgenes y de memoria dentro de las subpoblaciones CD4+ y CD8+. Se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos T de memoria tanto en las células T CD4+, como en las CD8+ en placas de Peyer y ganglios mesentéricos de los animales viejos (Figura 8).

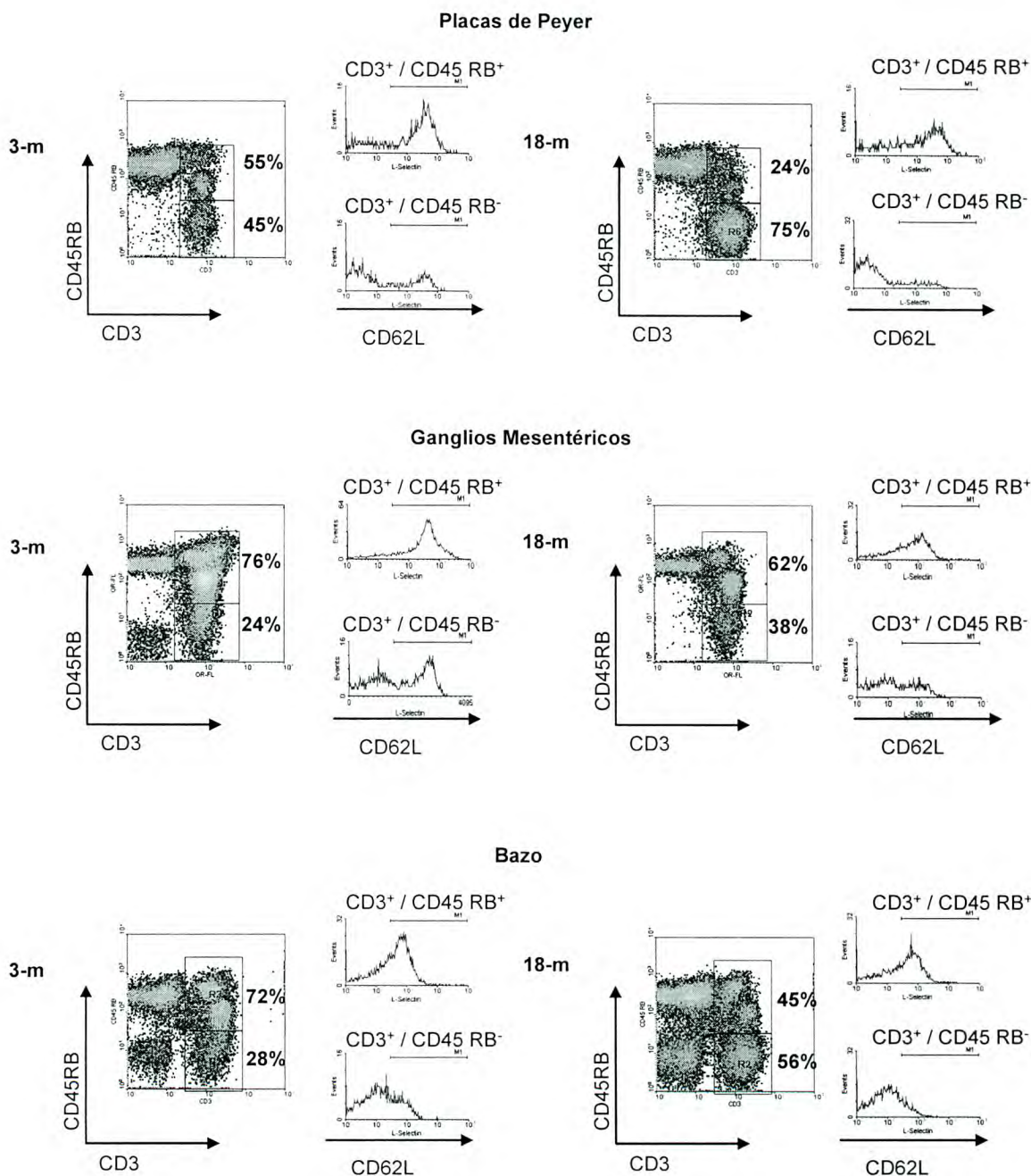


Figura 7. Estudio de la distribución fenotípica de las poblaciones de linfocitos T vírgenes y de memoria en placas de Peyer, ganglios mesentéricos y bazo. Los resultados se expresan como el porcentaje de células CD45⁺ CD62L⁻ o CD45⁻ CD62L^{+/-} dentro de la población total de linfocitos T (CD3⁺), y son representativos de 3 experimentos diferentes (n=3).

se expresan como el porcentaje de células CD45⁺ o CD45⁻ dentro de la población de linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺, y son representativos de 2 experimentos diferentes (n=3).

Perfil de citocinas producidas en respuesta a mitógenos de células T

Continuando con la caracterización del sistema inmune en los animales viejos, se determinó el perfil de citocinas liberado luego de la estimulación con concanavalina A de las células T de placas de Peyer, ganglios mesentéricos, y bazo de animales jóvenes y viejos normales. Esto se realizó a los fines de estudiar como responden las células de los animales viejos a un estímulo policlonal específico de células T (concanavalina A), tanto en cantidad como en calidad de respuesta.

La concentración de IFN- γ (característica de un perfil Th1) e IL-5 (característica de un perfil Th2) se midió en sobrenadantes de cultivo de células de placas de Peyer, ganglios mesentéricos, y bazo, luego de 72 horas de estimulación con concanavalina A. Los niveles de IFN- γ fueron similares en los sobrenadantes de cultivo de placas de Peyer de animales jóvenes y viejos. Sin embargo, la producción de IL-5 fue significativamente mayor en los sobrenadantes células de placas de Peyer de los animales viejos (6 veces más alta), indicando un desvío en el perfil de respuesta inmune hacia Th2 (Figura 9). En ganglios mesentéricos, el patrón en la producción de citocinas fue similar al de las placas de Peyer (desviado hacia Th2). A diferencia de las placas de Peyer, en los ganglios mesentéricos se encontraron mayores niveles de IFN- γ y de IL-5 en los sobrenadantes de animales viejos. Sin embargo, los niveles de IL-5 fueron proporcionalmente mayores (32 veces) que los de IFN- γ (10 veces) en los sobrenadantes de cultivo de animales viejos (Figura 9). En bazo, al igual que en los ganglios mesentéricos, los niveles de IFN- γ fueron mayores (2 veces), y nuevamente se observaron niveles más altos de IL-5 (5 veces) en los animales viejos que en los jóvenes (Figura 9). Estos resultados sugieren que en el sistema inmune asociado a la mucosa intestinal y en el sistema inmune sistémico de los animales viejos los linfocitos T producen preferencialmente las citocinas características de un perfil Th2.

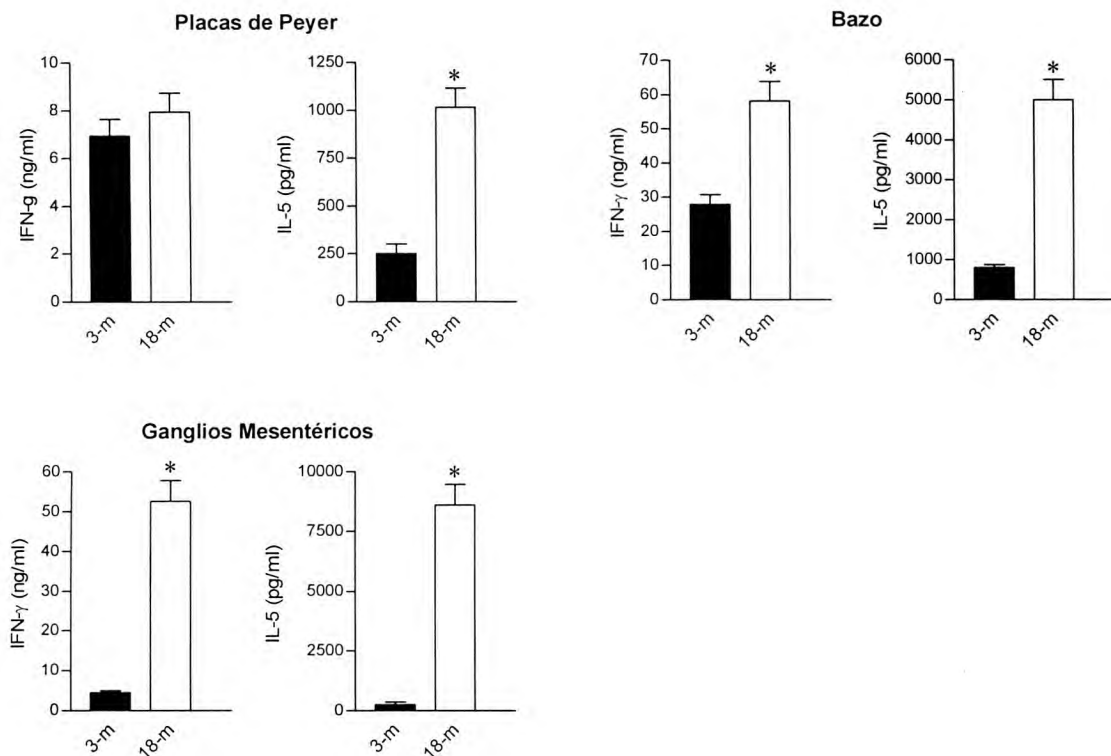


Figura 9. Perfil de citocinas producidas en respuesta a concanavalina A. Las células totales obtenidas de placas de Peyer, ganglios mesentéricos, y bazo de animales jóvenes y viejos fueron cultivadas durante 72 horas en presencia de concanavalina A y posteriormente, se midieron los niveles de citocinas producidos en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA de captura. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=3). * $p < 0.05$ respecto a 3-m.

Capítulo II

Estimulación *in vitro* con CpG-ODN de las células del sistema inmune asociado a la mucosa intestinal de animales viejos.

*Una interesante conclusión de la primera parte de nuestros estudios es que el sistema inmune asociado a mucosas en animales viejos muestra un desvío hacia una respuesta de tipo Th2. Estos resultados y resultados publicados por otros autores en relación a la pobre respuesta inmune inducida por la toxina colérica, cuando se utiliza como adyuvante de mucosas por vía oral en animales viejos, nos llevaron a buscar un adyuvante de tipo Th1, como los CpG-ODN, y probar su efectividad en animales viejos. Sin embargo, antes de estudiar la respuesta inmune inducida en los animales viejos luego de la administración de CpG-ODN como adyuvante por vía oral, decidimos realizar experimentos *in vitro* a los fines de evaluar la capacidad estimuladora de CpG-ODN sobre las células del sistema inmune asociado a mucosas en los animales viejos.*

Hipótesis de trabajo: Debido a que las células B parecen no estar alteradas en el sistema inmune asociado a mucosas de los animales viejos y además son células blanco de la activación por CpG-ODN, es probable que CpG-ODN pueda estimular a los linfocitos B de los animales viejos de manera similar a los animales jóvenes.

Objetivo específico: Analizar, mediante estudios *in vitro*, la capacidad estimuladora de CpG-ODN sobre las células B de placas de Peyer, ganglios mesentéricos y cavidad peritoneal de los animales viejos.

Inducción de moléculas coestimuladoras en linfocitos B de placas de Peyer y ganglios mesentéricos luego de la estimulación *in vitro* con CpG-ODN

Como se mencionó anteriormente, CpG-ODN es capaz de estimular diferentes tipos celulares, entre ellos linfocitos B. Con el objeto de estudiar si los linfocitos B obtenidos de placas de Peyer y ganglios mesentéricos de animales viejos pueden ser activados por CpG-ODN, se obtuvieron células totales de estos órganos provenientes de animales jóvenes y viejos, y se las estimuló *in vitro* con CpG-ODN durante 72 horas. Posteriormente se evaluó, mediante citometría de flujo, la expresión de moléculas coestimuladoras en las células CD19+ (linfocitos B).

Se encontró que luego de la estimulación *in vitro*, los linfocitos B de ambos grupos de animales aumentan la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 (B7-2) y CD40 (Figura 10). El aumento de expresión de estas moléculas, fue similar en las células B de animales jóvenes y viejos. Con respecto a la expresión de la molécula de CD80 (B7-1), se observó un pequeño aumento en la intensidad media de fluorescencia en los linfocitos B de animales de ambas edades estimulados con CpG-ODN respecto a los no estimulados. Luego de la estimulación con CpG-ODN, las moléculas de MHC-II, de expresión constitutiva en los linfocitos B, no aumentaron en ninguno de los grupos estudiados.

En las placas de Peyer, al igual que en ganglios mesentéricos, se observó un aumento similar en la expresión de las moléculas de CD86 en los linfocitos B de los animales jóvenes y viejos luego de la estimulación *in vitro* con CpG-ODN. La expresión de CD80 fue levemente aumentada luego de la estimulación con CpG-ODN en ambos grupos de animales. Sin embargo, se observó un mayor porcentaje de linfocitos B que expresan niveles más altos de esta molécula en los animales viejos. En cuanto a la expresión de las moléculas de MHC-II, se vio que ambos grupos de animales presentaron niveles similares de expresión y no se observó aumento en la expresión de la

misma luego de la estimulación con CpG-ODN, la misma se mostró sin cambios o incluso disminuida respecto a las células estimuladas con medio de cultivo solo (Figura 10).

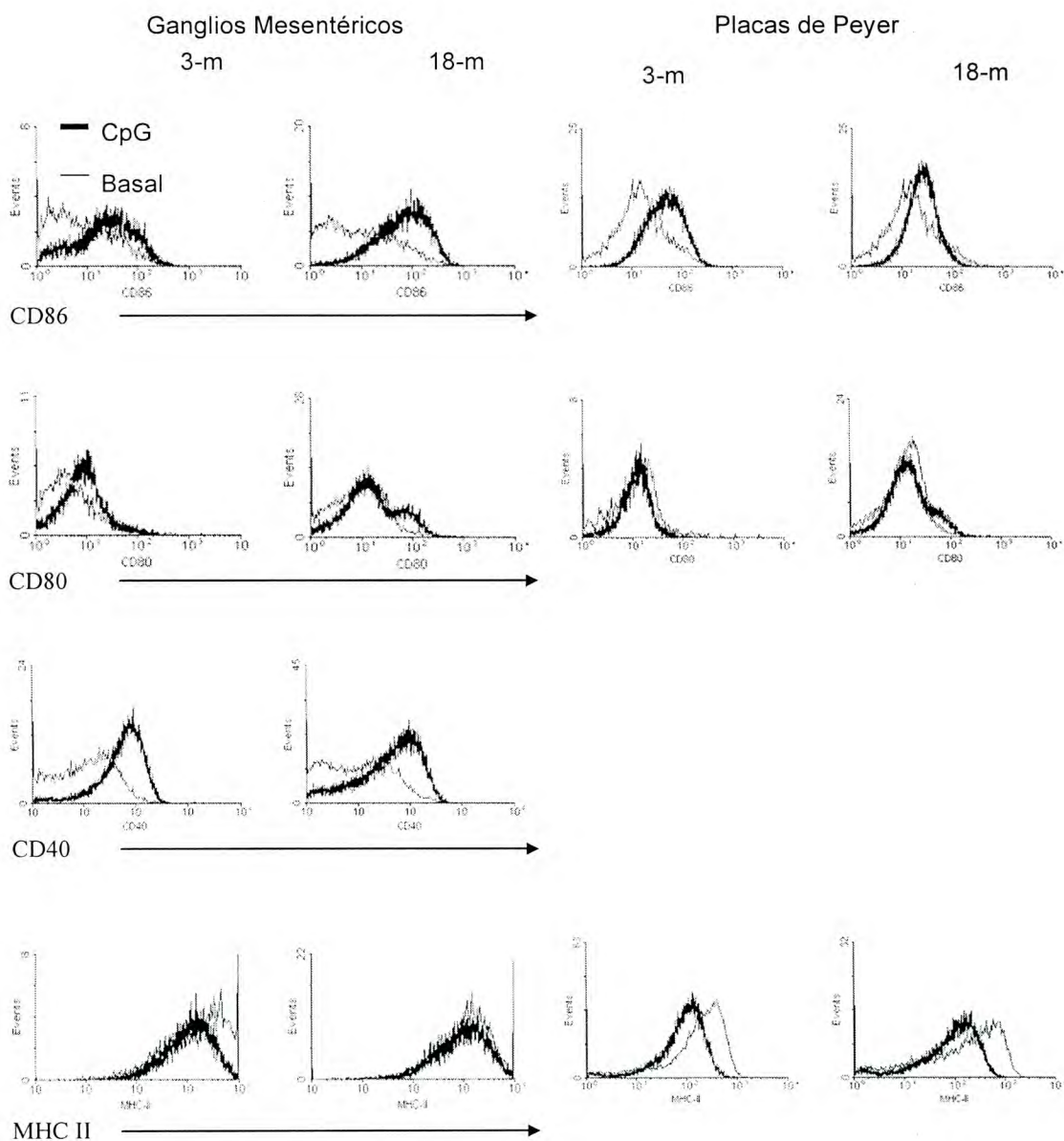


Figura 10. Expresión de moléculas coestimuladoras luego de la estimulación *in vitro* con CpG-ODN. Las células totales obtenidas de placas de Peyer y ganglios mesentéricos de los animales jóvenes y viejos, fueron estimuladas durante 72 horas *in vitro* en presencia de CpG-ODN y posteriormente procesadas y analizadas mediante citometría de flujo. Se utilizaron anticuerpos específicos para las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 y para moléculas del MHC-II en la región de células positivas para CD19.

Producción de IgM en el sobrenadante de cultivo de células de placas de Peyer y ganglios mesentéricos luego de la estimulación *in vitro* con CpG-ODN

CpG-ODN es capaz de estimular células B, induciendo su proliferación y la producción de IgM. A fin de evaluar si CpG-ODN es capaz de estimular la producción de IgM en linfocitos B de animales viejos, se obtuvieron células totales de placas de Peyer y ganglios mesentéricos y se las estimuló durante 48 horas *in vitro* con CpG-ODN, posteriormente se midieron los niveles de IgM en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA de captura. Se observó que, luego de la estimulación con CpG-ODN, tanto las células B de placas de placas de Peyer, como las de ganglios mesentéricos de los animales viejos producen elevados niveles de IgM, y que estos no difieren significativamente de los producidos por los animales jóvenes (Figura 11).

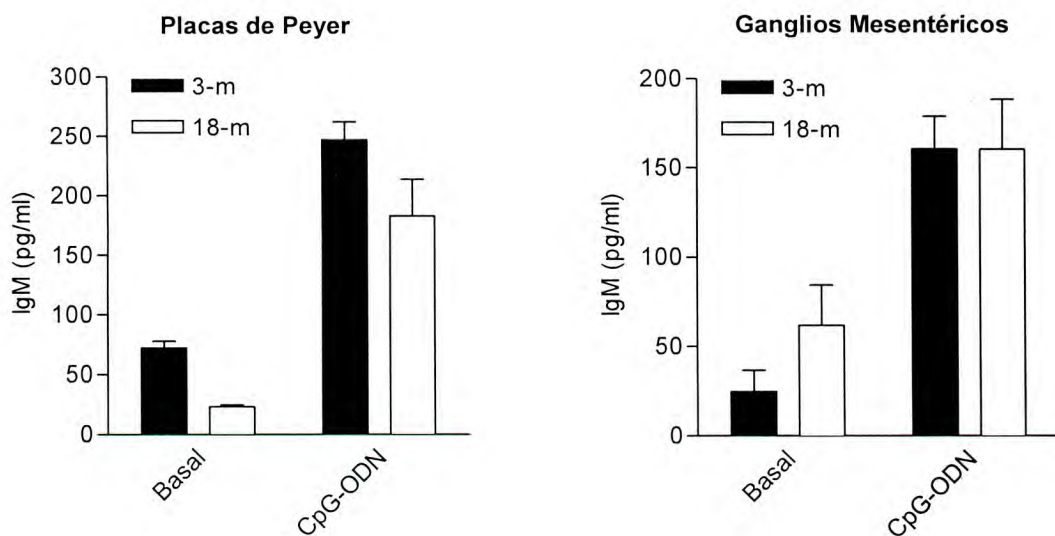


Figura 11. Producción de IgM en el sobrenadante de cultivo luego de la estimulación *in vitro* con CpG-ODN. Las células totales obtenidas de placas de Peyer y ganglios mesentéricos de animales jóvenes y viejos fueron estimuladas durante 72 horas *in vitro* con CpG-ODN. Posteriormente, se midieron los niveles de IgM en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA de captura. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=3).

Producción de IL-12 luego del estímulo *in vitro* con CpG-ODN de células de placas de Peyer de animales no-inmunizados

La IL-12 es una citoquina secretada por las células presentadoras de antígenos durante la inducción de una respuesta inmune de tipo Th1, induciendo la producción de IFN- γ en otras células como células T y células NK. Está demostrado que CpG-ODN estimula la producción de IL-12 por parte de las células dendríticas y los monocitos/macrófagos. Por lo tanto, se decidió evaluar si la estimulación *in vitro* con CpG-ODN es capaz de inducir la producción de IL-12 en las células presentadoras de los animales viejos.

Se observó que CpG-ODN induce producción de IL-12 en ambas edades y que los niveles de IL-12 liberados en el sobrenadante de cultivo no fueron diferentes entre animales jóvenes y animales viejos (Figura 12).

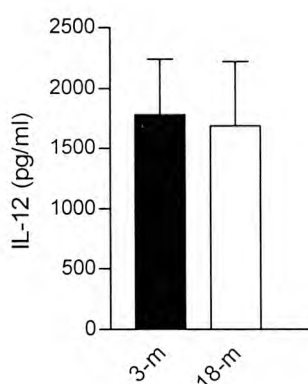


Figura 12. Producción de IL-12 luego de la estimulación *in vitro* con CpG-ODN. Las células totales obtenidas de placas de Peyer de los animales jóvenes y viejos no inmunizados fueron estimuladas *in vitro* con CpG-ODN durante 72 horas. Los niveles de IL-12 fueron dosados en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA de captura. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=3).

Producción de IgM en el sobrenadante de cultivo de células de cavidad peritoneal luego de la estimulación *in vitro* con CpG-ODN

Cuando se estudiaron los linfocitos B de cavidad peritoneal se encontró que los animales viejos presentan mayores porcentajes de linfocitos B1a. Es conocido que los linfocitos de cavidad peritoneal pueden migrar hacia la lámina propia intestinal frente a estímulos como los lipopolisacáridos bacterianos, donde son los responsables de producir anticuerpos contra microorganismos de la flora comensal intestinal. Además, los linfocitos B de cavidad peritoneal son los responsables de la secreción de la IgM que se encuentra en suero como anticuerpos naturales. Sin embargo no se conocen

los efectos de CpG sobre esta población celular, y debido a su relación con la inmunidad asociada a la mucosa intestinal resultó interesante estudiar el efecto de CpG-ODN sobre las células peritoneales y su consecuencia en la funcionalidad de los linfocitos B. Para ello, las células de cavidad peritoneal de animales jóvenes y viejos, se cultivaron en presencia de CpG-ODN y posteriormente se evaluaron los niveles de IgM en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA de captura. Como resultado de la estimulación se observaron niveles similares de IgM en los sobrenadantes de cultivo de animales jóvenes y viejos, indicando que CpG-ODN es capaz de estimular directa o indirectamente las células B de cavidad peritoneal de los animales viejos (Figura 13).

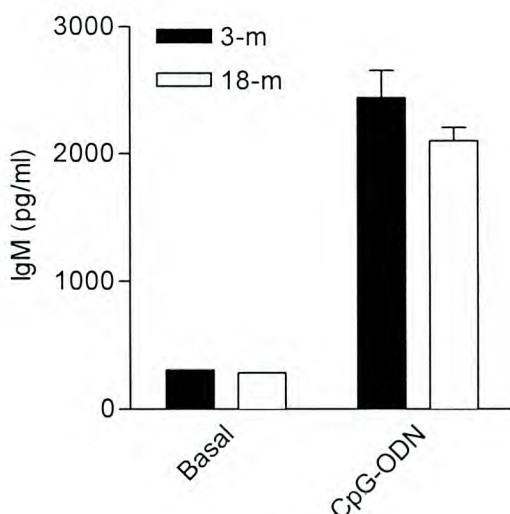


Figura 13. Producción de IgM en el sobrenadante de cultivo luego de la estimulación *in vitro* con CpG-ODN. Las células obtenidas de cavidad peritoneal de animales jóvenes y viejos fueron estimuladas durante 72 horas *in vitro* con CpG-ODN. Posteriormente, se midieron los niveles de IgM en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA de captura. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=3).

Capítulo III

Efectos de la inmunización oral utilizando CpG-ODN como adyuvante de mucosas en animales jóvenes y viejos

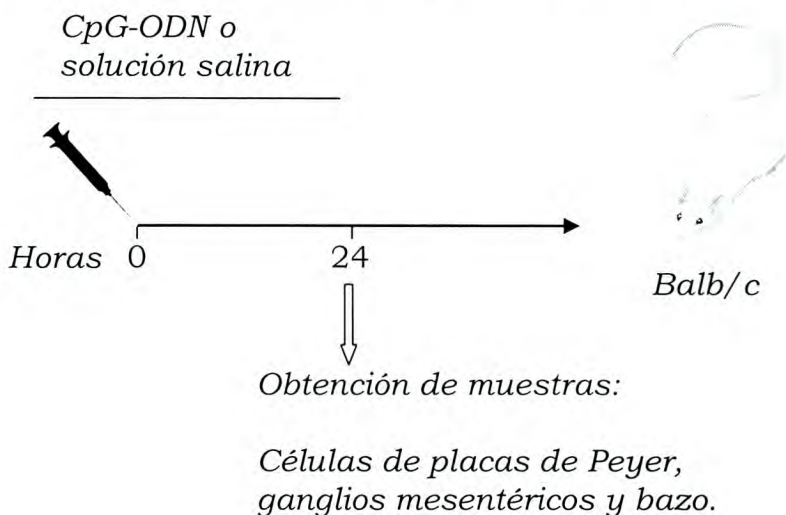
La inducción de respuesta inmune por vía oral depende en gran medida de la co-administración de adyuvantes apropiados que puedan iniciar y llevar a cabo la transición entre la inmunidad innata y adaptativa por medio de su acción sobre diferentes tipos celulares. CpG-ODN actúa como adyuvante sobre la respuesta inmune innata y adaptativa, ejerciendo su función a través de un receptor perteneciente a la familia de los denominados receptores de tipo Toll, TLR9 e induciendo respuesta inmune Th1 a través de la liberación de citocinas pro inflamatorias y la maduración/activación de células presentadoras de antígeno, fundamentalmente células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Los resultados obtenidos mediante los estudios de estimulación in vitro demostraron que CpG-ODN es capaz de activar los linfocitos B de los animales viejos de manera similar a los animales jóvenes. En consecuencia, en esta parte del trabajo se decidió realizar estudios in vivo tendientes a conocer los efectos de CpG-ODN como adyuvante de mucosas en los animales viejos.

Hipótesis de trabajo: Debido a las características del sistema inmune asociado a mucosas y a las características de CpG-ODN como inmunoestimulante, la inmunización por vía oral utilizando CPG-ODN como adyuvante puede ser efectiva en los animales viejos.

Objetivo específico: Evaluar el efecto de la inmunización oral con OVA/CpG-ODN, en la mucosa intestinal y a nivel sistémico, en los animales jóvenes y viejos.

I- Efectos tempranos de la administración de CpG-ODN por vía oral

Esquema de administración de CpG-ODN por vía oral



Los cambios producidos a tiempos cortos luego de la administración oral de CpG-ODN son los que determinarán el resultado final de la inmunización. Por lo tanto, es importante conocer cuales son los cambios producidos y las poblaciones principalmente afectadas por CpG-ODN luego de administración oral.

Número total de células de placas de Peyer, ganglios mesentéricos y bazo

En primer lugar se estudió si la administración por vía oral de CpG-ODN induce cambios en el número total de células de los órganos linfáticos asociados a la mucosa intestinal y el bazo de animales jóvenes, lo que podría indicar el reclutamiento de células o la proliferación de las células residentes en dichos órganos en respuesta a la estimulación con CpG-ODN. Para ello, se realizó el recuento de las células presentes en placas de Peyer, ganglios mesentéricos y el bazo, luego de 24 horas de la administración oral de CpG-

ODN o solución salina. Mientras que en los ganglios mesentéricos no se observaron cambios en la celularidad, en las placas de Peyer se observó un aumento en la celularidad en los animales que recibieron CpG-ODN respecto a los que recibieron solución salina (Tabla IV). Debido a que durante el procesamiento de los bazo de los diferentes grupos experimentales se produce una pérdida de células que puede no ser homogénea en todos los grupos, los cambios en el tamaño, y por consiguiente en la celularidad, del bazo se expresaron como una relación entre el peso de bazo (expresado en miligramos) y el peso del animal (expresado en gramos). Como resultado, no se observó diferencia en esta relación entre los dos grupos experimentales (Tabla IV).

Tabla III. Número de células obtenidas de placas de Peyer y ganglios mesentéricos y relación entre el peso de bazo/peso del animal, de animales jóvenes tratados con CpG-ODN o con solución salina. * $p < 0.05$ respecto a los animales tratados con Salina. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($n=3$).

Tratamiento	Placas de Peyer (N° de células x 10 ⁶)	Ganglios Mesentéricos (N° de células x 10 ⁶)	Bazo (Peso Bazo (mg)/ Peso animal (g))
Solución Salina	0,73 \pm 0.04	3,25 \pm 0.13	4,74 \pm 0.10
CpG-ODN	1,65 \pm 0.50*	3,51 \pm 0.35	4,74 \pm 0.27

Estudios fenotípicos en placas de Peyer, ganglios mesentéricos y bazo

Posteriormente se estudió si el aumento en la celularidad observado 24 horas luego de la administración oral de CpG-ODN se asocia a cambios en las diferentes poblaciones celulares presentes en ganglios mesentéricos, placas de Peyer y bazo de animales jóvenes. Para ello, se obtuvieron células de los diferentes órganos y se las procesó mediante la técnica de citometría de flujo utilizando como marcadores poblacionales anticuerpos contra CD19, CD3, CD11c y CD11b. En placas de Peyer y ganglios mesentéricos se observó un aumento en el porcentaje de células CD19+ (linfocitos B), mientras que en las demás poblaciones celulares estudiadas no se observaron aumentos o

disminuciones significativamente diferentes entre animales tratados o no tratados con CpG-ODN (Tabla V). Estos incrementos en los porcentajes de linfocitos B se correlacionaron con aumentos en el número absoluto de células en placas de Peyer y ganglios mesentéricos (Tabla IV).

Tabla IV. Poblaciones celulares en placas de Peyer y ganglios mesentéricos de animales jóvenes tratados con CpG-ODN o solución salina. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

	Placas de Peyer		Ganglios mesentéricos	
	Salina	CpG-ODN	Salina	CpG-ODN
CD19+	63,1%	68,1%	16,0%	21,5%
CD3+	18,6%	16,0%	75,0%	73,2%
CD11c+	0,7%	0,9%	0,4%	0,2%

Producción de IL-12 en el sobrenadante de cultivo

Una de las características de CpG-ODN como inmunoestimulante, es la capacidad de inducir la producción de IL-12 en las células presentadoras de antígenos, lo que finalmente lleva a la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil de tipo Th1. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de las células presentadoras de antígenos de placas de Peyer de animales jóvenes para producir IL-12 luego de 24 horas de estimulación *in vivo* y la posterior re-estimulación *in vitro* con CpG-ODN. En primer lugar se evaluó la producción de IL-12 por las células totales obtenidas de los diferentes órganos, si recibir ningún estímulo *in vitro*. Se observó que si las células no reciben una estimulación *in vitro*, no producen IL-12, o los niveles de IL-12 producidos son indetectables (Figura 14). Por lo tanto, las células fueron re-estimuladas *in vitro* con CpG-ODN y se midió la concentración de IL-12 en el sobrenadante de cultivo. Luego de la re-estimulación *in vitro* con CpG-ODN se observaron mayores niveles de IL-12 en los sobrenadantes de cultivo de células de placas de Peyer y ganglios mesentéricos provenientes de animales tratados por vía oral con CpG-ODN que en los sobrenadantes de células provenientes de animales que sólo recibieron solución salina (Figura 14). Por el contrario, la producción de IL-12 en el sobrenadante de cultivo de las células de bazo luego

de la estimulación *in vitro* con CpG-ODN no se vio afectada por la administración oral de CpG-ODN (Figura 14).

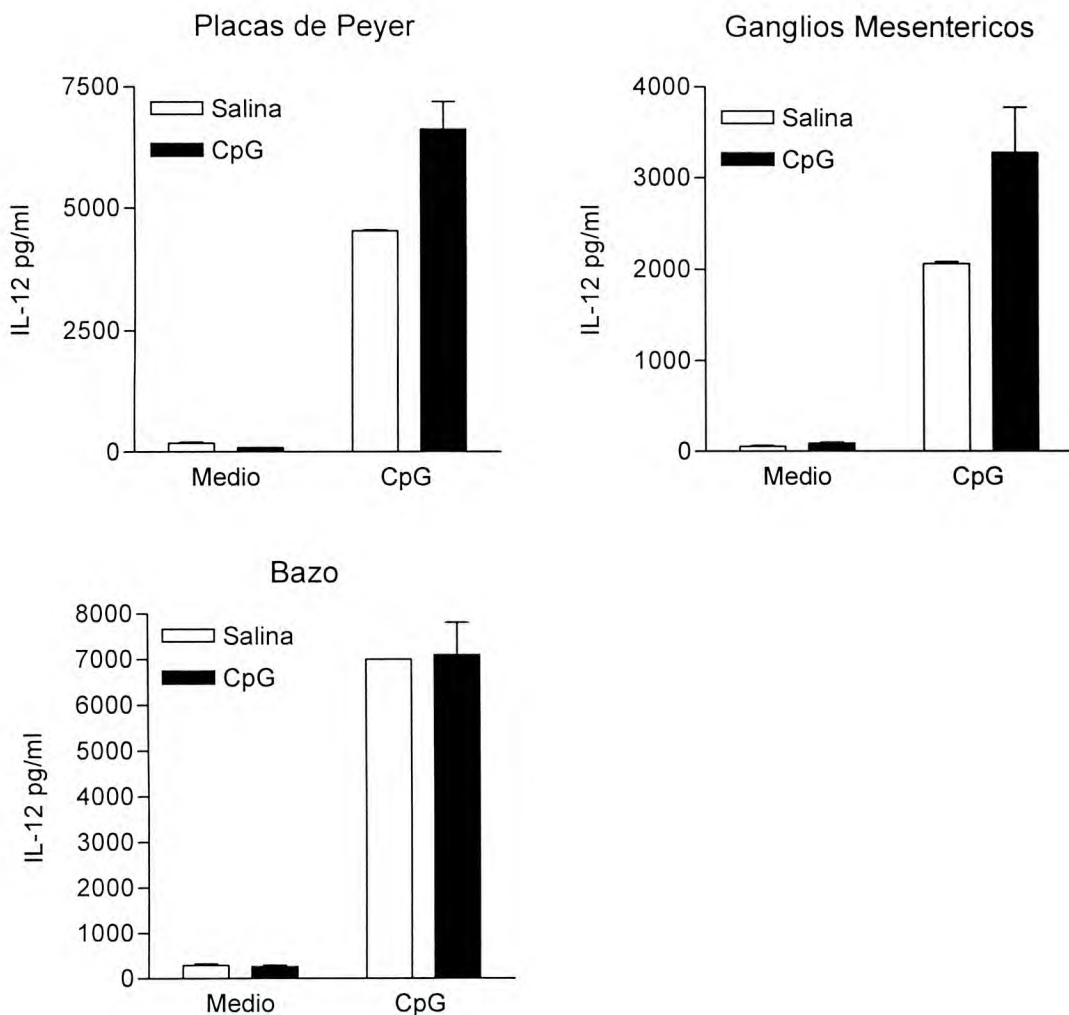


Figura 14. Producción de IL-12 en el sobrenadante de cultivo en respuesta al estímulo *in vitro* con CpG-ODN. Las células obtenidas de placas de Peyer (P. Peyer), ganglios mesentéricos (MLN), y bazo de animales jóvenes tratados con CpG-ODN o solución salina fueron cultivadas durante 72 horas con CpG-ODN. Los niveles de IL-12 producidos en respuesta al estímulo fueron medidos en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA de captura. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=3).

Producción de IL-12 en el sobrenadante de cultivo de células de animales viejos.

Los estudios realizados en los animales jóvenes nos permitieron comprobar que la administración oral de CpG-ODN produce un aumento en la celularidad

de las placas de Peyer, que induce un pequeño aumento en el porcentaje de linfocitos B en placas de Peyer y ganglios mesentéricos y que es capaz de estimular la producción de IL-12 en las células de los tejidos linfoides relacionados con la respuesta inmune en la mucosa intestinal. Todas estas características lo convierten en un atractivo adyuvante para ser utilizado en los animales viejos, en los que vimos que no existen significativas alteraciones a nivel fenotípico o a nivel funcional en el compartimiento de células B y que además presentan un desvío en el perfil de respuesta hacia Th2. Con el fin de corroborar si la administración de CpG-ODN es capaz de inducir la producción de IL-12 en los animales viejos, se administró CpG-ODN por vía oral en los animales viejos y se obtuvieron células de ganglios mesentéricos y de bazo 24 horas post-administración.

Al igual que lo que ocurre en los animales jóvenes, cuando las células de ganglios mesentéricos de los animales viejos tratados *in vivo* con CpG-ODN, se reestiman *in vitro* con CpG-ODN producen mayores niveles de IL-12 que las células de los animales tratados con solución salina (Figura 15). Mientras tanto, las células de bazo de los animales viejos tratados *in vivo* con CpG-ODN no son capaces de producir niveles de IL-12 significativamente diferentes a los producidos por las células de los animales tratados con solución salina (Figura 15).

Estos resultados sugieren que CpG-ODN puede modular el sistema inmune de los animales viejos, estimulando la producción de IL-12 en una etapa temprana que posteriormente favorezca el desarrollo de una respuesta Th1.

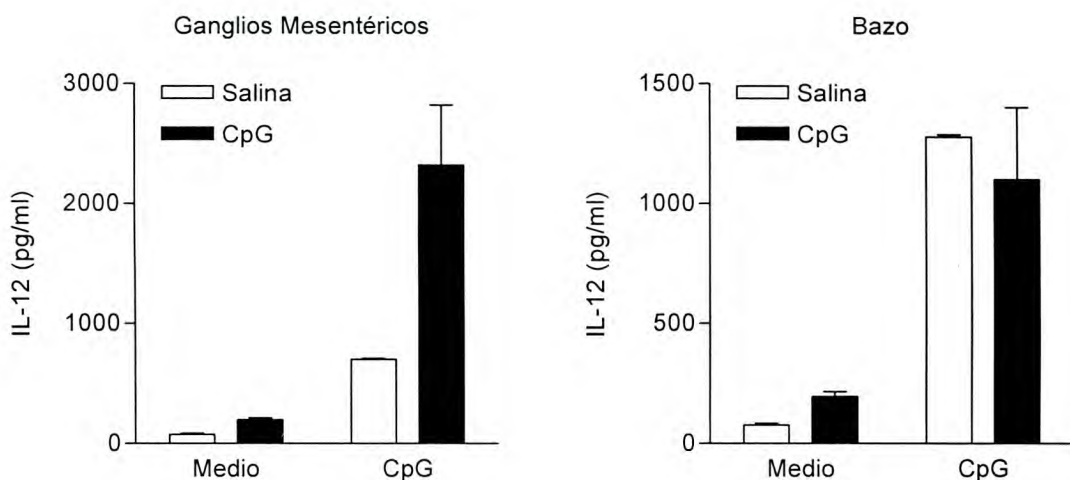
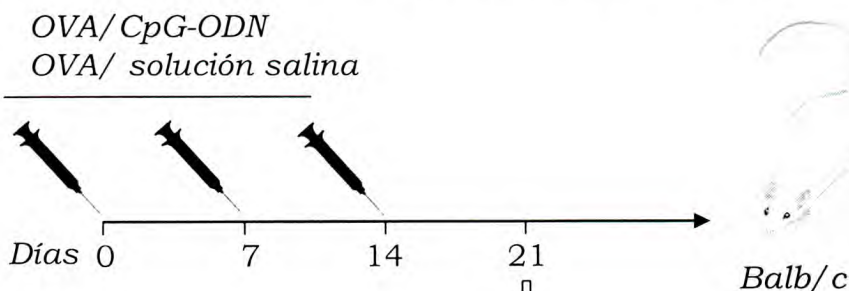


Figura 15. Producción de IL-12 en el sobrenadante de cultivo en respuesta al estímulo *in vitro* con CpG-ODN. Las células obtenidas de ganglios mesentéricos (MLN), y bazo de animales viejos tratados con CpG-ODN o solución salina fueron cultivadas durante 72 horas con CpG-ODN. Los niveles de IL-12 producidos en respuesta al estímulo fueron medidos en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA de captura. Los resultados se expresan como la media \pm SD (n=3).

II- Efectos de la inmunización oral utilizando CpG-ODN como adyuvante de mucosas

Esquema de Inmunización por vía oral de 21 días



*Obtención de muestras:
Suero.
Lavados intestinales.
Células de placas de Peyer, ganglios mesentéricos y bazo.*

II-i Efectos de la inmunización oral con OVA/CpG-ODN en los tejidos linfoides asociados a mucosas

Fenotipo de las poblaciones de placas de Peyer y ganglios mesentéricos

Con el objeto de estudiar si la inmunización oral con OVA/CpG-ODN induce cambios en las poblaciones celulares presentes en los órganos linfoides asociados a la mucosa intestinal, se obtuvieron células de placas de Peyer y ganglios mesentéricos de animales jóvenes y viejos no inmunizados o inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN y fueron procesadas para citometría de flujo.

Como observamos en los estudios realizados en animales no inmunizados, el número de placas de Peyer obtenido fue similar en ambos grupos. Sin embargo, el número total de células obtenidas por placa de Peyer fue 2 veces menor en los animales viejos respecto a los jóvenes y no cambió luego de la inmunización (Tabla VI). Con respecto a las distintas poblaciones celulares, no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de células CD19+, CD4+ y CD8+ en los ratones viejos y jóvenes no inmunizados. Sin embargo, aunque los porcentajes de células CD4+ y CD8+ no cambiaron significativamente luego de la inmunización, se observó un ligero, pero significativo, aumento en la población CD19+ en los dos grupos de animales inmunizados respecto a los no inmunizados (Figura 16).

A diferencia de lo observado en las placas de Peyer, en los ganglios mesentéricos de los animales viejos no inmunizados se encontró un mayor porcentaje de linfocitos CD19+ que en los animales jóvenes, sin encontrarse cambios en las células T CD4+ y CD8+. Luego de la inmunización oral, se observó un aumento en el porcentaje de células CD19+ en los ganglios mesentéricos de los animales jóvenes (Figura 16). Por el contrario, los porcentajes de las diferentes poblaciones estudiadas en los animales viejos permanecieron sin cambios respecto a los animales control no inmunizados (Figura 16).

Tabla V. Celularidad de placas de Peyer y ganglios mesentéricos de animales jóvenes y viejos tratados con OVA/CpG-ODN o no inmunizados. Los resultados representan la media \pm SD (n=4). *p < 0.05.

Órgano	Tratamiento	Edad de los ratones (meses)	Nº de células/órgano ($\times 10^6$)
Placas de Peyer	No inmunizado	3	$1,5 \pm 0,2$
		18	$0,6 \pm 0,1^{**}$
	OVA/CpG-ODN	3	$1,2 \pm 0,2$
		18	$0,5 \pm 0,1^{**}$
Ganglios mesentéricos	No inmunizado	3	$3,7 \pm 0,7$
		18	$2,6 \pm 0,2$
	OVA/CpG-ODN	3	$4,0 \pm 0,5$
		18	$3,0 \pm 0,5$

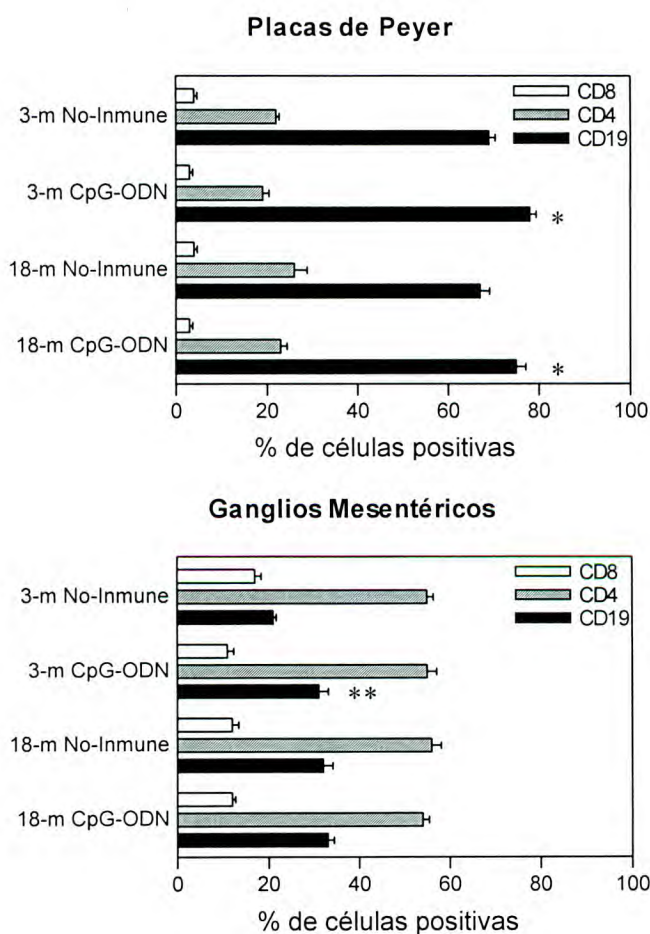


Figura 16. Poblaciones celulares en placas de Peyer y ganglios mesentéricos de animales jóvenes y viejos no inmunizados e inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN. Las células obtenidas de los diferentes órganos fueron procesadas y analizadas mediante citometría de flujo utilizando marcadores específicos para CD19,

CD4 y CD8. Los resultados representan la media \pm SD (n=3). *p < 0.05 respecto al animal No-Inmune de la misma edad. ** p < 0.05 respecto al animal de 3 meses.

Respuesta inmune humoral

Una de las características de la inmunización oral es inducir la producción de anticuerpos de tipo IgA que son secretados al lumen intestinal. Por lo tanto se evaluó, mediante la técnica de ELISA en lavados intestinales, si la inmunización oral con OVA/CpG-ODN indujo la producción de anticuerpos de tipo IgA específicos contra OVA. A tal fin, se inmunizaron ratones jóvenes y viejos por vía oral con una mezcla de OVA/CpG-ODN o OVA/salina en los días 0, 7 y 14 y se evaluó el título de anticuerpos en lavados intestinales 7 días luego de la última inmunización. Como resultado de la inmunización oral, se observó la presencia de anticuerpos específicos contra OVA en los lavados intestinales obtenidos tanto de animales jóvenes como de animales viejos inmunizados con OVA/CpG-ODN, pero no en los lavados intestinales de los animales inmunizados con OVA/salina. Además, los niveles de anticuerpos encontrados fueron similares en las muestras obtenidas de animales de ambas edades (Figura 17).

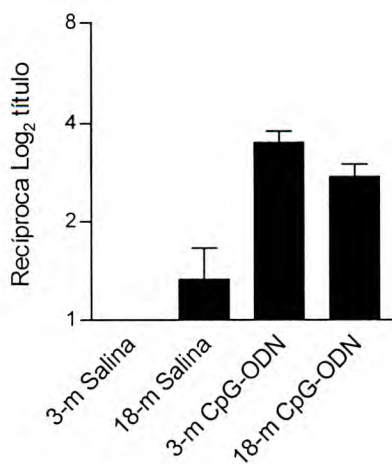


Figura 17. Niveles de IgA específica contra OVA en los lavados intestinales de animales inmunizados con OVA/CpG-ODN. Los anticuerpos específicos contra OVA fueron determinados mediante ELISA en los lavados intestinales de animales jóvenes y viejos obtenidos 7 días luego de la última inmunización oral. El resultado se expresa como el log₂ de la recíproca de la última dilución de lavado intestinal que posee una

D.O. superior a dos veces la D.O. correspondiente al lavado intestinal de animales no inmunes. Los resultados representan la media \pm SD (n=3).

Respuesta inmune celular

Además de la respuesta humoral, luego de una inmunización es necesario que se induzcan linfocitos T específicos que ayuden, mediante la producción de citocinas y la interacción a través de moléculas coestimuladoras, al desarrollo de una respuesta inmune específica contra el antígeno. La proliferación celular en respuesta al antígeno es una de las formas de evaluar la inducción de respuesta inmune celular. Con el objeto de evaluar la respuesta proliferativa específica de antígeno, se aislaron células de placas de Peyer, el principal sitio inductor en la mucosa intestinal, de animales jóvenes y viejos, 7 días luego de la última inmunización por vía oral con OVA/CpG-ODN o con OVA/salina y se las estimuló *in vitro* en presencia de OVA. Se observó una respuesta proliferativa específica para OVA con un índice de estimulación superior a 2 (considerada positiva) sólo en los grupos de animales inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN (Figura 18). La respuesta celular específica para OVA en animales viejos inmunizados con OVA/CpG-ODN fue similar a la de los animales jóvenes inmunizados.

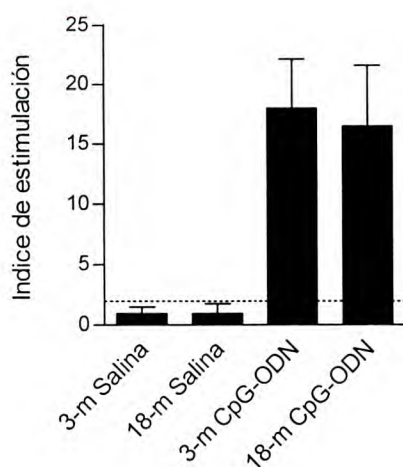


Figura 18. Respuesta proliferativa específica contra OVA. Las células obtenidas de placas de Peyer de los animales jóvenes y viejos inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN o con OVA/salina fueron estimuladas *in vitro* con OVA durante 6 días. Dieciocho horas antes de la recolección se agregó en el cultivo 3H-Timidina ($1\mu\text{Ci}$ /

pocillo). El cultivo fue recolectado y la incorporación de timidina se midió en un contador de centelleo líquido. El resultado se expresa como un índice de estimulación (media de las c.p.m. de los pocillos que contienen OVA/ media de las c.p.m. de los pocillos sin OVA). La línea punteada corresponde a un índice de estimulación de dos, que fue considerado como el mínimo índice de estimulación positivo. Los resultados representan la media \pm SD (n=3).

Perfil de citocinas en placas de Peyer

El patrón de citocinas inducido luego de una inmunización es determinante en el resultado final de una respuesta inmune. Con el fin de evaluar el patrón de citocinas de células T cooperadoras inducido por la inmunización oral con OVA/CpG-ODN, se midieron los niveles de IFN- γ , IL-5 e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de células de placas de Peyer obtenidas de animales inmunizados con OVA/CpG-ODN y estimuladas *in vitro* con OVA.

En el sobrenadante de cultivo de células de placas de Peyer obtenidas de animales jóvenes y viejos inmunizados se observó la producción de IFN- γ , mientras que no se detectó producción de IL-5 ni de IL-10. Sin embargo los niveles de IFN- γ encontrados en los animales viejos fueron menores a los de animales jóvenes (Figura 19). Por el contrario, en los sobrenadantes de cultivo de células de placas de Peyer de los animales que recibieron OVA/salina no se detectó ninguna de las citocinas analizadas.

El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) no es una citoquina considerada como característica de un perfil Th1 ni de un perfil Th2. Sin embargo, se ha demostrado que GM-CSF es capaz de estimular la producción de IFN- γ *in vivo*. Por lo tanto, se midieron los niveles de GM-CSF en los sobrenadantes de cultivo de células de placas de Peyer de animales jóvenes y viejos estimuladas *in vitro* con OVA. Se encontraron menores niveles de GM-CSF en los sobrenadantes de cultivo de las células de animales viejos (Figura 19).

En conclusión, el patrón de citocinas observado fue de tipo Th1, tanto en animales jóvenes como viejos, aunque los animales viejos produjeron menores niveles de IFN- γ y GM-CSF en respuesta al antígeno.

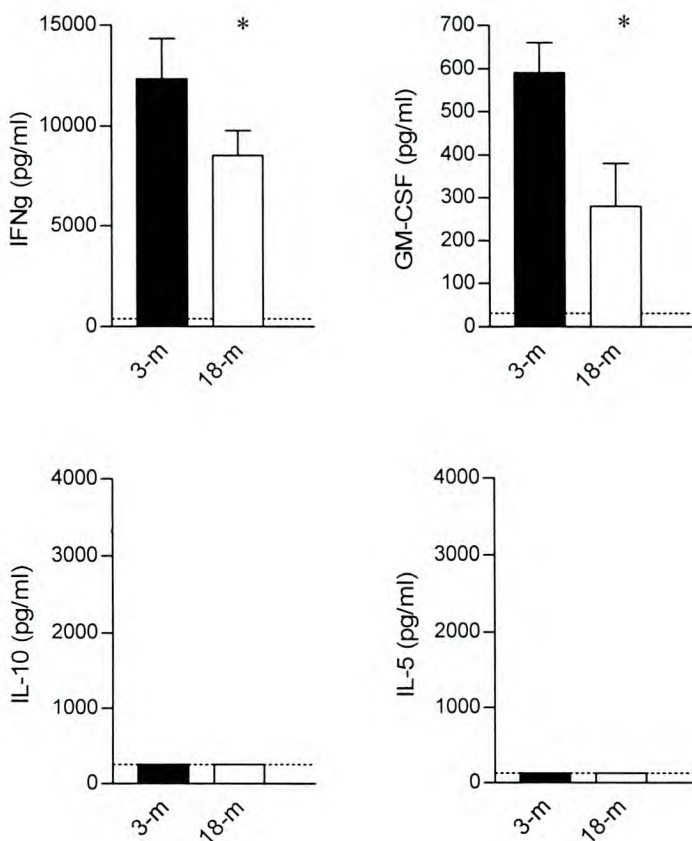


Figura 19. Perfil de citocinas inducido por la inmunización oral con OVA/CpG-ODN. Las células obtenidas de placas de Peyer de animales jóvenes y viejos inmunizados por vía oral, fueron estimuladas *in vitro* durante 72 horas en presencia de OVA. Los niveles de IFN- γ , IL-5, IL-10 y GM-CSF en el sobrenadante de cultivo fueron determinados mediante ELISA de captura utilizando los anticuerpos específicos para cada una de ellas como se indica en materiales y métodos. Los resultados representan la media \pm SD (n=3). * p < 0.05 respecto al animal de 3 meses.

Fenotipo de las células T productoras de IFN- γ en placas de Peyer

Debido a que los niveles de IFN- γ producidos en respuesta a OVA en el sobrenadante de cultivo de células de placas de Peyer de animales viejos inmunizados con OVA/CpG-ODN fueron menores que los de los animales jóvenes, se decidió estudiar la contribución de las células T CD4⁺ y CD8⁺ a la producción de IFN- γ en animales jóvenes y viejos inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN. Las células obtenidas de placas de Peyer de animales jóvenes y viejos 7 días luego de la última inmunización fueron estimuladas *in vitro* con OVA y procesadas para citometría de flujo para detectar IFN- γ intracelular. Se

seleccionaron las células T $CD8^+/CD4^-$ o $CD8^-/CD4^+$ y se analizaron para la producción de $IFN-\gamma$. Mientras que la frecuencia de células T $CD4$ productoras de $IFN-\gamma$ fue similar en animales jóvenes y viejos, se observó un menor porcentaje de células productoras de $IFN-\gamma$ dentro de la población de células T $CD8$ en los animales viejos luego de la estimulación *in vitro* con OVA (Figura 20).

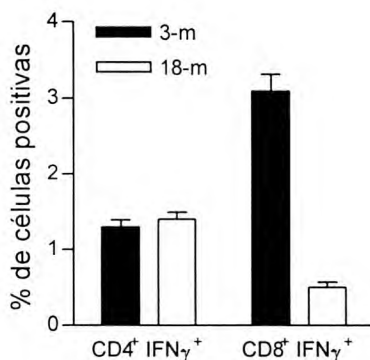


Figura 20. Fenotipo de las células T productoras de $IFN-\gamma$ en placas de Peyer. Las células de placas de Peyer de los animales jóvenes y viejos inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN fueron estimuladas *in vitro* con OVA durante 48 horas. Posteriormente, los cultivos fueron recogidos y las células se procesaron y analizaron mediante citometría de flujo intracelular para detectar $IFN-\gamma$, utilizando como marcadores poblacionales anticuerpos monoclonales específicos contra $CD4$ y $CD8$. Los resultados representan la media \pm SD (n=3).

II-ii Efectos de la inmunización oral con OVA/CpG-ODN sobre la inmunidad sistémica

Estudio fenotípico de las poblaciones de bazo

Con el objeto de estudiar si la inmunización oral con OVA/CpG-ODN indujo cambios en las poblaciones celulares, se obtuvieron células de bazo de animales jóvenes y viejos no inmunizados o inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN y fueron procesadas para citometría de flujo. Con respecto a las poblaciones celulares, se observó que la inmunización oral no indujo

cambios en las poblaciones celulares de bazo de los animales viejos y jóvenes inmunizados por vía oral, respecto a los no inmunizados (Figura 21).

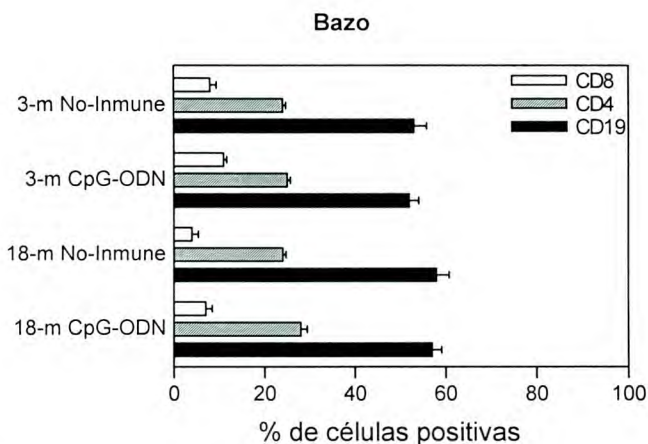


Figura 21. Poblaciones celulares en bazo. Las células obtenidas del bazo de animales jóvenes y viejos no inmunizados e inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN, fueron procesadas y analizadas mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos para CD19, CD4 y CD8.

Respuesta inmune humoral en suero

Una adecuada inmunización a través de las superficies mucosas induce respuesta inmune específica contra el antígeno en mucosas y a nivel sistémico. Por lo tanto, se decidió analizar si la inmunización por vía oral con CpG-ODN es capaz de inducir respuesta inmune sistémica en los animales viejos. Para ello, se analizó la presencia de IgG específica contra OVA en el suero de animales jóvenes y viejos inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN o con OVA/salina. Se observó que la inmunización indujo un significativo aumento en los niveles de anticuerpos específicos contra OVA tanto en los animales jóvenes como en los viejos que fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN a diferencia de los animales inmunizados con OVA/salina. Además, se vio que la respuesta inmune específica contra OVA en los animales viejos fue similar a la desarrollada por los animales jóvenes (Figura 22A).

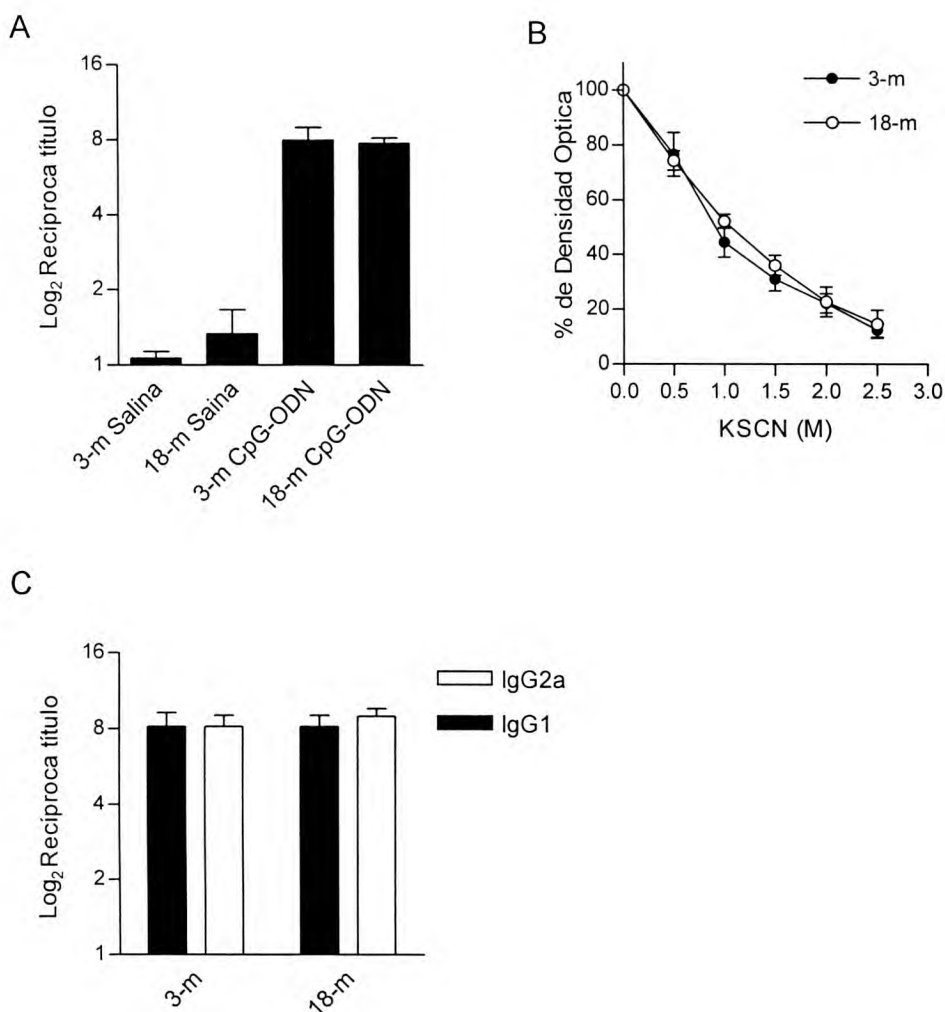


Figura 22. Respuesta humoral específica contra OVA en el suero de animales inmunizados con OVA/CpG-ODN. (A) Los niveles de IgG específica contra OVA, fueron determinados mediante ELISA en los sueros obtenidos de animales jóvenes y viejos 7 días luego de la última inmunización oral. El resultado se expresa como el log₂ de la recíproca de la última dilución de suero que posee una D.O. superior a dos veces la D.O. correspondiente al suero de animales no inmunes. (B) Ensayo de avidéz de los anticuerpos de tipo IgG inducidos por la inmunización oral en los animales jóvenes y viejos. La avidéz de los anticuerpos se evaluó mediante un ensayo de resistencia al lavado con KSCN, siguiendo el procedimiento descripto en materiales y métodos. La D.O. de los pocillos tratados con KSCN se expresa como un porcentaje de la D.O. obtenida en los pocillos no tratados con KSCN. (C) Perfil de isotipos de IgG (IgG1 e IgG2a) específicos contra OVA en suero. El resultado se expresa como el log₂ de la recíproca de la última dilución de suero que posee una D.O. superior a dos veces la D.O. correspondiente al suero de animales no inmunes. Los resultados representan la media ± SD (n=3).

Avidéz de los anticuerpos específicos contra OVA

Uno de los cambios en la inmunidad humoral asociados con el envejecimiento es una disminución en la afinidad de los anticuerpos luego de las inmunizaciones. Con el objetivo de conocer si los anticuerpos inducidos luego de la inmunización oral con OVA CpG-ODN en los animales jóvenes y viejos se unen al antígeno con igual fuerza, se evaluó la avidéz de los anticuerpos inducidos 7 días luego de la última inmunización mediante la resistencia al lavado con soluciones de concentración creciente de KSCN. Se observó que los anticuerpos inducidos como resultado de la inmunización en los animales viejos tuvieron una avidéz similar a la de los animales jóvenes en todas las concentraciones de KSCN probadas (Figura 22B).

Perfil de isotipos de IgG específica contra OVA en suero

La presencia de diferentes isotipos de IgG es indicativa del perfil de respuesta inducido, siendo el isotipo IgG1 característico de un perfil de respuesta Th2 e IgG2a de un perfil de respuesta Th1. Luego de la inmunización oral con OVA/CpG-ODN, se observó la presencia de ambos isotipos en el suero de animales jóvenes y viejos, y los niveles de anticuerpos no fueron significativamente diferentes entre los animales de ambas edades (figura 22C).

Respuesta inmune celular en bazo

La inmunización oral con OVA/CpG-ODN indujo respuesta inmune celular a nivel de las superficies mucosas, sin embargo, en este punto resultó necesario determinar si la inmunización oral es capaz de provocar además la inducción de respuesta inmune celular a nivel sistémico. Es por ello, que se estudió la respuesta proliferativa de células T en bazo luego de la inmunización oral con OVA/CpG-ODN o con OVA/salina en animales jóvenes y viejos. A tal fin, se obtuvieron células del bazo de los animales inmunizados por vía oral 7 días luego de la última inmunización y fueron cultivadas *in vitro* con OVA. Como resultado, se observó que las células de los animales viejos presentaron una respuesta proliferativa positiva contra OVA. Además, se encontró que esta

respuesta fue similar a la encontrada en los cultivos de células de animales jóvenes (Figura 23).

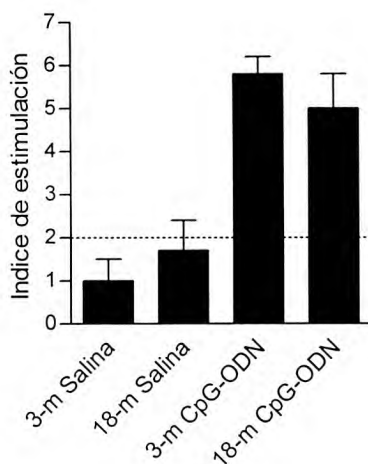


Figura 23. Respuesta proliferativa específica contra OVA en bazo. Las células obtenidas de bazo de los animales jóvenes y viejos inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN o con OVA/Salina fueron estimuladas *in vitro* con OVA durante 6 días. Dieciocho horas antes de la recolección se agregó en el cultivo 3H-Timidina ($1\mu\text{Ci}$ / pocillo). El cultivo fue recolectado y la incorporación de timidina se midió en un contador de centelleo líquido. El resultado se expresa como un índice de estimulación (media de las c.p.m. de los pocillos que contienen OVA/ media de las c.p.m. de los pocillos sin OVA). La línea punteada corresponde a un índice de estimulación de dos, que fue considerado como el mínimo índice de estimulación positivo. Los resultados representan la media \pm SD ($n=3$).

Perfil de citocinas en bazo

El perfil de citocinas liberadas en los sobrenadantes de cultivo de células de bazo fue determinado mediante ELISA de captura. El patrón de citocinas observado fue similar al encontrado en los sobrenadantes de cultivo de células de placas de Peyer. Se detectó producción de $\text{IFN-}\gamma$, mientras que no hubo producción de IL-5 (resultado no mostrado). Sin embargo, los niveles de $\text{IFN-}\gamma$ liberados por las células de bazo de los animales viejos fueron menores que los de animales jóvenes (Figura 24A). En los sobrenadantes de cultivo de animales inmunizados con OVA/salina, no se detectó producción de $\text{IFN-}\gamma$ ni de IL-5.

Fenotipo de las células productoras de IFN- γ en bazo

Al igual que en placas de Peyer, los niveles de IFN- γ producidos en el sobrenadante de cultivo de células de bazo de animales viejos fueron menores, por lo que se decidió estudiar la contribución de las células T CD4 y CD8 a la producción de IFN- γ en animales jóvenes y viejos inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN. Para ello, células de bazo de animales jóvenes y viejos fueron obtenidas 7 días luego de la última inmunización, estimuladas *in vitro* con OVA y procesadas para citometría de flujo intracelular. Se seleccionaron las células T CD8⁺/CD4⁻ o CD8⁻/CD4⁺ y se analizaron para la producción de IFN- γ . Mientras que la frecuencia de células T CD4 IFN- γ fue similar en animales jóvenes y viejos, se observó un menor porcentaje de células productoras CD8 IFN- γ en los animales viejos luego de la estimulación *in vitro* con OVA (Figura 24B).

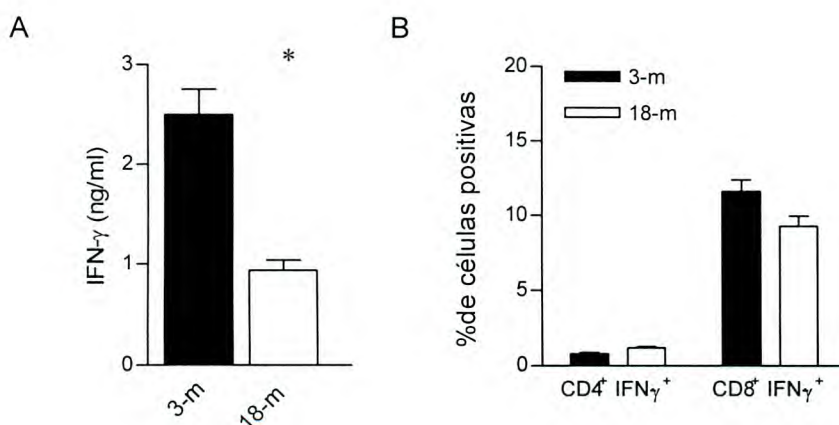
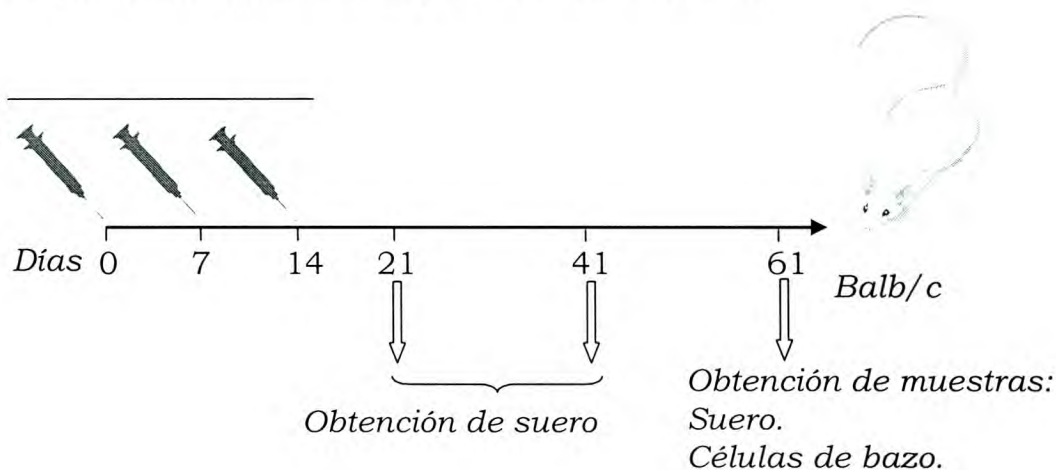


Figura 24. Perfil de citocinas inducidos por la inmunización oral con OVA/CpG-ODN en bazo. (A) Producción de IFN- γ . Las células obtenidas de bazo de animales jóvenes y viejos inmunizados por vía oral, fueron estimuladas *in vitro* con OVA. Los niveles de IFN- γ liberados en el sobrenadante de cultivo fueron dosadas mediante ELISA de captura. (B) Fenotipo de las células T productoras de IFN- γ . Las células de bazo de los animales jóvenes y viejos inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN fueron estimuladas *in vitro* con OVA durante 48 horas. Posteriormente, los cultivos fueron recogidos y las células se procesaron y analizaron mediante citometría de flujo intracelular para detectar IFN- γ , utilizando como marcadores poblacionales anticuerpos monoclonales específicos contra CD4 y CD8. Los resultados representan la media \pm SD (n=3). * p < 0.05 respecto al animal de 3 meses.

II-iii Duración de la respuesta inmune inducida por la inmunización oral con OVA/CpG-ODN

Esquema de Inmunización por vía oral de 61 días

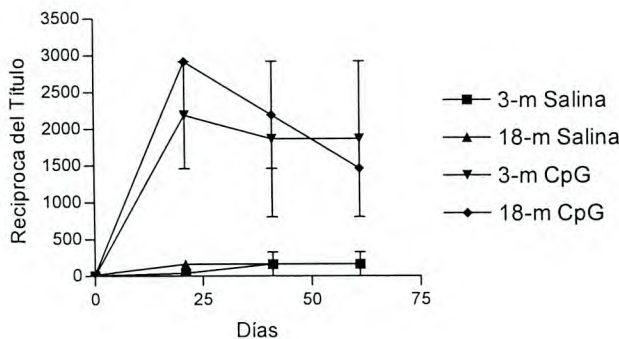


Una medida de la efectividad de un esquema de inmunización es la presencia de una respuesta inmune celular y anticuerpos específicos por períodos de tiempo prolongados luego de la última inmunización. Es por ello, que se estudió la respuesta inmune humoral a distintos tiempos y la respuesta celular 40 días luego de la última inmunización.

Los niveles de IgG específica contra OVA fueron analizados 7, 20 y 40 días luego de la última inmunización oral, observándose un pico en la respuesta inmune específica en el día 7 luego de la última inmunización y una disminución a partir del día 21 luego de la última inmunización. Se observó una respuesta inmune positiva con elevados niveles de IgG específica contra OVA hasta 40 días luego de la última inmunización. Además, los niveles de anticuerpos específicos contra OVA detectados en los animales viejos fueron similares a los detectados en los animales jóvenes (Figura 25A).

Con respecto a la respuesta inmune celular se observó que aún 40 días luego de la última inmunización, la respuesta proliferativa específica fue positiva en los animales viejos. Sin embargo, el índice de estimulación fue menor en los animales viejos (Figura 25B).

A



B

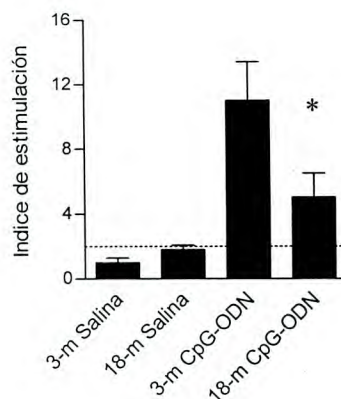


Figura 25. Respuesta inmune humoral y celular específicas contra OVA observadas 40 días luego de la última inmunización oral con OVA/CpG-ODN. (A) Respuesta de anticuerpos de tipo IgG específicos contra OVA. Los anticuerpos específicos contra OVA presentes en suero obtenido 7, 20 y 40 días luego de la última inmunización con OVA/CpG-ODN o con OVA/Salina fueron dosados mediante ELISA. El resultado se expresa como la recíproca de la última dilución de suero que posee un D.O. dos veces superior a la D.O. del suero preinmune. (B) Respuesta proliferativa específica contra OVA observada 40 días luego de la última inmunización oral. Las células obtenidas de bazo de los animales jóvenes y viejos inmunizados por vía oral con OVA/CpG-ODN o con OVA/Salina fueron estimuladas *in vitro* con OVA durante 6 días. Dieciocho horas antes de la recolección se agregó en el cultivo 3H-Timidina ($1\mu\text{Ci}$ / pocillo). El cultivo fue recolectado y la incorporación de timidina se midió en un contador de centelleo líquido. El resultado se expresa como un índice de estimulación (media de las c.p.m. de los pocillos que contienen OVA/ media de las c.p.m. de los pocillos sin OVA). La línea punteada corresponde a un índice de estimulación de dos, que fue considerado como el mínimo índice de estimulación positivo. Los resultados representan la media \pm SD ($n=3$). * $p < 0.05$ respecto al animal de 3 meses.

Discusión

Discusión

El sistema inmune de un individuo joven tiene una gran capacidad para desarrollar una respuesta inmune que permita mantener la homeostasis, mientras que durante el envejecimiento se produce una desregulación que resulta en una disminución en la respuesta inmunológica. Esto lleva a mayor incidencia de las enfermedades infecciosas y de cáncer, y una menor eficacia de la vacunas contra infecciones comunes. Es por ello que existe la necesidad de desarrollar esquemas de vacunación efectivos en este período de la vida (Grubeck-Loebenstein and Wick, 2002).

La mayoría de las infecciones ocurren y se diseminan a través de las superficies mucosas. Por lo tanto, el sistema inmune asociado a mucosas tiene un rol fundamental en la protección contra las infecciones, ya que actúa como una primera línea de defensa valiéndose de mecanismos pertenecientes a la inmunidad innata y adaptativa. Es por ello que existe un gran interés en inducir respuesta inmune a través de estas vías. Una de las ventajas de inducir respuesta inmune a través de las superficies mucosas es que se puede generar protección local y a distancia mediante un sistema integrado denominado sistema inmune común de mucosas, y también a nivel sistémico, lo que permite una protección más efectiva (Holmgren and Czerkinsky, 2005). A pesar del avance en el conocimiento de los cambios asociados al envejecimiento y en el análisis celular y molecular de la inducción y regulación de la respuesta inmune asociada a mucosas, la información actual sobre los cambios producidos en este sistema durante el envejecimiento es limitada y los modelos experimentales no muestran esquemas de inmunización efectivos (Koga et al., 2000). Debido a que, como se mencionó anteriormente, durante el envejecimiento existe un aumento en la frecuencia y severidad de las infecciones, es necesario conocer el estado del sistema inmune asociado a mucosas con el fin de desarrollar estrategias de inmunización efectivas a través de estas vías.

En trabajos previos de nuestro grupo se estudió la respuesta inmune específica inducida por distintos esquemas de inmunización y el efecto de

distintos adyuvantes a nivel sistémico (Maletto et al., 2002; Maletto et al., 2005). En la presente tesis, nuestros estudios se enfocaron en el sistema inmune asociado a mucosas y la respuesta inmune específica inducida por vía oral.

Los resultados demuestran que los animales viejos presentan un aumento en el porcentaje de células B en los ganglios mesentéricos (con un porcentaje un 30% mayor que en los animales jóvenes), además se observó que el porcentaje de linfocitos B1 de cavidad peritoneal está aumentado en animales viejos. Ambos sitios anatómicos están estrechamente relacionados con la respuesta inmune en la mucosa intestinal.

En las placas de Peyer, el principal sitio de encuentro entre las células del sistema inmune y los antígenos presentes en lumen intestinal, la composición porcentual en linfocitos B (CD19+) y T (CD4+ y CD8+) fue comparable la de los ratones jóvenes. Sin embargo, los animales viejos presentaron una disminución en el número de células de las placas de Peyer. Estos resultados concuerdan con trabajos previos (Koga et al., 2000) en los que se encontró un menor número de linfocitos en las placas de Peyer de los animales envejecidos, con un menor número de células T vírgenes, asociados a una menor respuesta inmune.

Mientras tanto, en los ganglios mesentéricos, que son los ganglios linfáticos drenantes de la mucosa intestinal, no se encontraron diferencias en el número de células totales. El hecho de que el número de células en los ganglios mesentéricos sea semejante entre animales jóvenes y viejos, a pesar de las diferencias encontradas en las placas de Peyer puede deberse a que los ganglios mesentéricos están interpuestos en la circulación linfática proveniente de la mucosa intestinal y es en estos ganglios en donde se produce la acumulación de los antígenos presentes en distintos sitios de la mucosa intestinal. También son un sitio de paso para las células que se estimulan en la mucosa intestinal, pero que deben migrar hacia otras mucosas del organismo o hacia la lámina propia intestinal. Por lo tanto, es probable que, siendo el intestino un órgano que está sometido a una estimulación antigénica permanente, haya células continuamente migrando desde los sitios inductores de la mucosa intestinal con diferentes destinos y que el número de células que se encuentran en los ganglios mesentéricos en condiciones no inflamatorias sea relativamente constante.

Existen evidencias que demuestran que los ganglios mesentéricos están interpuestos en la circulación de los linfocitos B de la cavidad peritoneal hacia la lámina propia intestinal (Fagarasan and Honjo, 2000; Fagarasan et al., 2000; Watanabe et al., 2000) y por lo tanto, el pequeño incremento en el porcentaje de linfocitos B que se observa en los ganglios mesentéricos puede deberse a un aumento en la migración de linfocitos B1 de la cavidad peritoneal, cuyo porcentaje se encontró aumentado en los animales viejos. Sin embargo, la distribución porcentual de estas células en los ratones viejos no mostró diferencias con lo observado en los animales jóvenes, por lo que resulta difícil establecer si esto se debe a un aumento en la migración de linfocitos B de cavidad peritoneal. Además, los linfocitos B pierden sus marcadores característicos al abandonar la cavidad peritoneal, y por eso resulta difícil identificarlos fuera de ella. Por otro lado, en la lámina propia intestinal no se observó un aumento en el número de linfocitos B productores de IgA en los animales viejos. Esto apoya la idea de que aunque el porcentaje de linfocitos B1 está aumentado en la cavidad peritoneal de los ratones viejos, es probable que no exista una migración aumentada de estas células hacia la lámina propia intestinal. Sin embargo, cuando se midieron los niveles de anticuerpos contra microorganismos de la flora comensal intestinal (producidos en gran parte por linfocitos B provenientes de la cavidad peritoneal (Bos et al., 1996; Kroese et al., 1996)) se observó que los animales viejos presentan niveles significativamente superiores de IgA contra microorganismos de la flora comensal intestinal que los animales jóvenes, indicando que aunque el número de células B en la lámina propia intestinal no sea diferente, probablemente las poblaciones de linfocitos B productoras de los anticuerpos contra microorganismos de la flora comensal se encuentren en mayor número que las células B inducidas de manera específica en las placas de Peyer en los animales viejos. Este fenómeno podía darse como una respuesta al contacto con la flora comensal durante un período de tiempo más prolongado en los animales viejos. Mientras tanto, en los animales jóvenes existiría un equilibrio entre las células que provienen de las placas de Peyer y las provenientes de la cavidad peritoneal. En efecto, los trabajos que estudiaron la migración de los linfocitos B desde las placas de Peyer hacia la lámina propia intestinal demuestran que la misma se encuentra disminuida en los animales viejos (Schmucker et al., 1996; Thoreux et al., 2000). Se ha demostrado que la

migración de las células productoras de anticuerpos contra microorganismos de la flora comensal intestinal es dependiente de la presencia de los mismos en el lumen intestinal, que resulta más prolongada en los animales viejos (Macpherson et al., 2000).

Con respecto a los linfocitos T, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ en las placas de Peyer y los ganglios mesentéricos. Sin embargo, cuando se analizaron las poblaciones de linfocitos T de memoria y vírgenes, se encontró que los ratones viejos presentan un menor porcentaje de linfocitos con fenotipo de células vírgenes (positivos para la molécula de CD45RB), y un mayor porcentaje de linfocitos T de memoria (CD45RB-). En las placas de Peyer, el número total de células está disminuido. Además, se encontró un disminuido porcentaje de linfocitos T vírgenes lo que indicaría que la capacidad de estos órganos para responder a nuevos antígenos está comprometida.

Nuestros resultados demuestran que el sistema inmune asociado a la mucosa intestinal de los animales viejos presenta diferencias respecto al de los jóvenes. Estas diferencias se encuentran más acentuadas en el compartimiento de linfocitos T, mostrando una desvío en el perfil de respuesta inmune hacia Th2 y potencialmente menor número de células capaces de responder a nuevos estímulos antigénicos. Por lo tanto, en el momento de desarrollar nuevas estrategias que permitan inducir respuesta inmune en los animales viejos es necesario buscar adyuvantes cuya acción no sea fuertemente dependiente de la función de los linfocitos T.

Existen distintos caminos para explorar las estrategias que mejoren la eficacia de la vacunación durante el envejecimiento. La inclusión de nuevos adyuvantes, la frecuencia y el aumento de las dosis de antígeno son algunas de ellas.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los estudios en animales viejos fueron realizados con adyuvantes estimulantes de la respuesta Th2 como CT, cuya capacidad inmunoestimulante es fuertemente dependiente de la activación de linfocitos T (Koga et al., 2000; Xu-Amano et al., 1994), durante el desarrollo de este trabajo de tesis decidimos utilizar un nuevo adyuvante de mucosas, cuya efectividad no había sido probada hasta el momento en animales viejos, los CpG-ODN.

Los adyuvantes pueden dividirse según su mecanismo de acción en: sistemas que transportan antígenos (como por ejemplo emulsiones, micropartículas, liposomas, entre otros) y adyuvantes inmunoestimulatorios. Los inmunoestimulatorios son predominantemente estructuras derivadas de patógenos (por ejemplo lipopolisacáridos bacterianos, CpG-ODN, monofosforil lípido A, entre otros) (Elson, 1999; Ogra, 2001).

Un prerrequisito para combatir una infección es que las células del sistema inmune innato reconozcan el peligro de la infección y activen a los linfocitos B y T. Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) juegan un papel fundamental en este proceso ya que son reconocidos por al menos 11 receptores de la inmunidad innata, los receptores tipo toll (TLR) (Kirk and Bazan, 2005). Dentro de los PAMPS, los CpG-ODN son reconocidos por el TLR9 (que se encuentra en linfocitos B, células dendríticas y macrófagos) y tienen la capacidad de inducir un medio que favorece la activación de linfocitos T cooperadores Th1 (Krieg, 2002). Además, si se lo compara con otros PAMPS, CpG-ODN puede ser sintetizado con pureza y composición definidas, lo que lo transforma en un excelente candidato para estudios clínicos como inmunoestimulante. Por todo esto, CpG-ODN se ha convertido en un promisorio adyuvante para iniciar y dirigir la respuesta inmune durante la vacunación o para modular una respuesta alérgica (Krieg, 2002). Además, está ampliamente demostrado que CpG-ODN actúa como adyuvante en animales jóvenes y desarrolla una respuesta inmune Th1 a través de la liberación de citocinas proinflamatorias y la maduración y/o activación de células presentadoras de antígenos profesionales como macrófagos, linfocitos B y CD4 (Krieg, 2002).

Los CpG-ODN, han demostrado ser efectivos adyuvantes cuando son administrados a través de diferentes vías en distintos modelos experimentales (Krieg and Davis, 2001). Sin embargo, a pesar de que es posible obtener una protección más efectiva contra antígenos o patógenos cuando se realiza administración por mucosas, ya que habitualmente la respuesta inducida involucra la inmunidad de mucosas y la inmunidad sistémica, en la mayoría de estos estudios se realizó administración a través de vías sistémicas y sólo en trabajos recientes se evaluó la efectividad de CpG-ODN como adyuvante de mucosas (Davis et al., 1998; McCluskie and Davis, 2000). Igualmente, a pesar de que se han realizado estudios sobre los efectos tempranos de CpG-ODN a

nivel sistémico, no hay datos sobre que ocurre en el sistema inmune asociado a la mucosa intestinal luego de la administración temprana de CpG-ODN.

Nuestros trabajos previos, en concordancia con trabajos de otros autores demuestran que CpG-ODN es un adyuvante efectivo cuando se administra por vía subcutánea en los animales viejos, induciendo una respuesta específica contra el antígeno desviada hacia un perfil Th1, caracterizada por la producción de anticuerpos de tipo IgG2a y la producción de IFN- γ en forma comparable a los animales jóvenes (Maletto et al., 2002; Manning et al., 2001). Sin embargo, a pesar del avance en el conocimiento de los efectos de CpG-ODN como adyuvante de mucosas, no se han realizado estudios en individuos o en animales viejos. En el presente trabajo se evaluó la efectividad de CpG-ODN como adyuvante de mucosas en animales viejos.

Los resultados obtenidos en animales viejos nos permitieron observar que la administración oral de CpG-ODN junto con un antígeno proteico como la OVA induce, en la mucosa intestinal y en la inmunidad sistémica, una respuesta específica de antígeno que se caracteriza por la producción de IFN- γ (indicativa de un perfil Th1), sin producción de IL-5 ni de IL-10 (indicativas de un perfil Th2).

Es importante destacar que este desvío en el perfil de respuesta se observó en los animales jóvenes, como había sido demostrado anteriormente, pero también en los animales viejos, en los que previamente encontramos una predisposición de las células de placas de Peyer y bazo para producir un perfil de tipo Th2 cuando son estimuladas con activadores policlonales de células T como la concanavalina A. Estos resultados concuerdan con el hallazgo de que luego de la estimulación *in vitro* de células de placas de Peyer de animales viejos se encuentra IL-12 en el sobrenadante de cultivo y los niveles producidos son comparables a los de animales jóvenes. Sin embargo, mediante los experimentos de estimulación *in vitro* de células de animales jóvenes y viejos, no se pueden descartar diferencias en el microambiente de los animales viejos que lleven a una menor producción de IL-12 *in vivo* y por ende a una menor producción de citocinas de tipo Th1, y que esta sea suficiente para estimular una respuesta de anticuerpos específica comparable a de los animales jóvenes. Cuando administramos CpG-ODN por vía oral y se obtuvieron células de ganglios mesentéricos 24 horas más tarde, se observó

que frente a una nueva estimulación *in vitro* con CpG-ODN, las células provenientes de los animales de ambas edades producen mayores niveles de IL-12 que las células de los animales no tratados. Este es un importante hallazgo, ya que no hay estudios que evalúen cuales son los efectos de CpG-ODN a tiempos cortos luego de la administración por mucosas, y estos eventos son claves para el desarrollo de la respuesta inmune posterior. En consecuencia se puede inferir que CpG-ODN es un efectivo adyuvante en los animales viejos porque es capaz de estimular, entre otras cosas la producción de IL-12 que posteriormente ayudará al desarrollo de un perfil de respuesta de tipo Th1.

Respecto a los modelos experimentales en los que se ha probado la efectividad de la inmunización oral en animales viejos existen trabajos que demuestran que la inmunización oral, utilizando la OVA como antígeno y la CT como adyuvante de mucosas, es menos efectiva en los animales viejos, induciendo una menor respuesta proliferativa, una menor respuesta humoral en suero y en mucosas, y una menor producción de citocinas en respuesta al antígeno que la que se induce en los animales jóvenes (Koga et al., 2000). Estos hallazgos fueron encontrados en el sistema inmune de mucosas de ratones de 12 meses y en los de 24 meses. Sin embargo, la respuesta inmune sistémica de los animales de 12 meses fue similar a la de los de 3 meses, por lo que estos estudios concluyen que en el sistema inmune asociado a mucosas las alteraciones asociadas al envejecimiento se manifiestan antes que a nivel sistémico. Estos cambios en la función del sistema inmune asociado a mucosas estuvieron relacionados a un menor número de linfocitos T vírgenes en las placas de Peyer de los animales de 12 y 24 meses de edad respecto a los de 3 meses (Koga et al., 2000).

La CT es uno de los más potentes inmunoestimulantes de mucosas probados en modelos experimentales, y se ha establecido que su mecanismo de acción involucra principalmente el desarrollo de respuestas de tipo Th2 (Xu-Amano et al., 1993). Como se mencionó anteriormente, los estudios realizados en animales viejos indican que es muy importante que exista un número suficiente de linfocitos T que puedan diferenciarse a células productoras de citocinas Th2 para que la toxina colérica pueda ejercer su acción como adyuvante de mucosas, ya que los animales de 12 y 24 meses, que presentan

características de un sistema inmune de mucosas envejecido, con un menor número de linfocitos T vírgenes, son incapaces de desarrollar una respuesta de mucosas de igual intensidad a la de los animales de 3 meses. Más aún, los animales de 24 meses, que presentan características de un sistema inmune envejecido en mucosas y en la inmunidad sistémica, tampoco pueden desarrollar respuestas similares a las de los adultos jóvenes a nivel sistémico luego de una inmunización oral. Esta dependencia de un adecuado número de linfocitos T vírgenes para la efectividad de la toxina colérica como adyuvante de mucosas en las mucosas, es evidenciada en estudios que se realizaron recientemente inmunizando animales de 12 y 24 meses por vía nasal (Hagiwara et al., 2003). En estos estudios se encontró que los animales de 12 meses son capaces de desarrollar respuestas inmunes en la mucosa nasal y a nivel sistémico de igual intensidad que los animales de 3 meses, y que el desarrollo de estas respuestas inmunes se relacionó a que los animales de 12 meses presentan un número 2-4 veces mayor de linfocitos T vírgenes en el tejido linfoide asociado a la mucosa nasal.

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se encontró que los animales viejos (18 meses) inmunizados por vía oral utilizando CpG-ODN como adyuvante son capaces de montar respuestas proliferativas y de anticuerpos en mucosas y en suero y la intensidad de esta respuesta es, durante un fase efectora, similar a la de los animales de 3 meses. Además, los niveles de anticuerpos en suero se mantuvieron elevados hasta 40 días luego de la última inmunización.

Las diferencias encontradas entre los estudios realizados con CpG-ODN y en los que se utilizó toxina colérica como adyuvante, son probablemente una consecuencia de las propiedades intrínsecas de cada uno de los inmunoestimulantes, y dependen fundamentalmente de los tipos celulares estimulados por cada uno de ellos. Así, CpG-ODN es un potente estimulante de células dendríticas monocitos/macrófagos y linfocitos B, (entre otros) y la toxina colérica es altamente dependiente de los linfocitos T vírgenes, que son una población disminuida en el sistema inmune asociado a la mucosa intestinal y, además, una de las principales poblaciones afectadas durante el envejecimiento. En efecto, los estudios *in vitro* demuestran que la estimulación de células de ganglios mesentéricos y placas de Peyer de animales viejos con CpG-ODN induce la expresión de moléculas coestimuladoras y del complejo mayor de histocompatibilidad en los linfocitos B, y la producción de

anticuerpos de tipo IgM en el sobrenadante de cultivo de manera semejante a los animales jóvenes. Además, como se mencionó anteriormente, también se estimula la producción de IL-12 en el sobrenadante de cultivo de los animales viejos, una citoquina importante para desarrollo de una respuesta inmune Th1.

Sin embargo, es claro que existe una desregulación del sistema inmune en los animales viejos, ya que los niveles de IFN- γ producidos en respuesta a OVA en el sobrenadante de cultivo de las células de animales viejos inmunizados fueron menores que los observados en los animales jóvenes. Este resultado se correlaciona con la disminución en el porcentaje de células CD8+ productoras de IFN- γ en las placas de Peyer y el bazo, pero no con una disminución en el porcentaje de células CD4+ productoras de IFN- γ .

Se ha descrito que durante el envejecimiento se produce una alterada expansión clonal de las células T CD8+, relacionada a un defecto en la función de las células presentadoras de antígeno (Plowden et al., 2004). Sin embargo, los trabajos sobre la función de las células presentadoras de antígenos en los animales viejos son contradictorios, en consecuencia, se necesitan más estudios para evaluar la participación de las células presentadoras de antígenos en la disminución de la función de las células CD8+. Por otro lado, una causa de la disminución en la producción de IFN- γ en respuesta al antígeno puede ser el hecho de que en los animales viejos se observó un menor número de linfocitos T vírgenes, tanto CD4+ como CD8+, por lo que durante el desarrollo de la respuesta inmune específica contra OVA *in vivo* se active un menor número de células Th que lleven a una menor producción de citocinas.

Igualmente, la menor producción de IFN- γ también podría ser explicada por una menor producción de GM-CSF, ya que esta citoquina se encontró en el sobrenadante de cultivo de las células de los animales viejos inmunizados por vía oral y estimuladas *in vitro* con OVA. Aunque GM-CSF no es una citoquina considerada clásicamente como Th1 ni como Th2, hay trabajos que indican que la misma puede aumentar la producción de IFN- γ *in vivo* (Khatami et al., 2001) y que tiene influencia en el desarrollo de respuestas de tipo Th1 que son protectoras contra microorganismos como *Micobacterium tuberculosis*

(Gonzalez-Juarrero et al., 2005). Por lo tanto, la menor producción de IFN- γ puede estar relacionada a una menor producción de GM-CSF.

Con respecto a la respuesta proliferativa de células T específicas, se pudo observar que la inmunización oral con OVA/CpG-ODN indujo una respuesta proliferativa comparable entre los animales jóvenes y viejos 7 días luego de la última inmunización. Sin embargo, la respuesta proliferativa disminuye en los animales viejos 40 días luego de la última inmunización respecto a los animales jóvenes. Normalmente, la intensidad de la respuesta inmune efectora es determinante en la duración de la respuesta de memoria, por lo tanto la inducción de una menor respuesta celular efectora en los animales viejos, reflejada por una disminución en la producción de citocinas en respuesta al antígeno, puede ser la causa de una menor respuesta celular de memoria. Además, estudios recientes de Mittler et al. demostraron que el microambiente presente en los animales viejos permite el desarrollo de respuestas inmunes primarias pero falla para mantener respuestas inmunes de memoria de células T frente a inmunizaciones secundarias, lo que indica que el microambiente inmunológico de los animales viejos, puede llevar a una disminución en la respuesta inmune de memoria en estos animales (Mittler and Lee, 2004a; Mittler and Lee, 2004b). Así, una menor respuesta celular de memoria puede estar relacionada a un menor número de linfocitos T vírgenes en los animales viejos capaces de responder al antígeno en el inicio de la respuesta inmune específica y por lo tanto, un menor número de clones de linfocitos T específicos contra el antígeno que persiste en el tiempo, o a defectos en la generación de linfocitos T de memoria en los animales viejos.

Varios trabajos han abordado el estudio de la respuesta de memoria en ratones, Haynes y col. demostraron que luego de la transferencia de linfocitos T efectores provenientes de animales viejos con un TCR transgénico, en animales jóvenes, se observan defectos en la activación *in vivo* (Eaton et al., 2004; Haynes et al., 2003). Además, estas células proliferan menos y liberan menores niveles de citocinas cuando son re estimuladas *ex vivo* con el antígeno (Haynes et al., 2004; Haynes et al., 1999). Igualmente, en un modelo de infección con el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV), las células T CD4+ de memoria que se generan en los animales jóvenes y viejos persisten durante un período de 24 semanas, pero las de los animales viejos producen un 50% menos de IFN- γ cuando son reestimuladas con antígenos virales

(Kapasi et al., 2002). En coincidencia con estos trabajos, un estudio realizado en humanos demuestra que la cantidad de células T CD4+ de memoria que se generan como consecuencia de la vacunación con el virus de influenza, y que son capaces de producir IFN- γ y TNF- α , luego de la reestimulación *in vitro* con antígenos virales, está significativamente reducida en los individuos viejos (Kang et al., 2004).

Sin embargo, a pesar de que estudios recientes demuestran que existen deficiencias en la función cooperadora de los linfocitos T de los animales viejos que llevan a una menor formación de centros germinales y menor producción de anticuerpos de tipo IgG (Eaton et al., 2004; Haynes et al., 2003), nosotros encontramos que luego de la inmunización oral con OVA/CpG-ODN se detectan anticuerpos en suero y lavados intestinales en los animales viejos, y que estos se mantuvieron en niveles similares a los de los ratones jóvenes hasta 40 días luego de la última inmunización. Estos hallazgos son de gran importancia ya que sugieren que, debido a sus propiedades inmunoestimulantes, CpG-ODN es capaz de generar fuertes respuestas de anticuerpos en los animales viejos, sobreponiéndose a las deficiencias observadas en el compartimiento de células T en estos animales.

Habitualmente la efectividad de una inmunización oral se mide por la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno. Como se mencionó anteriormente, la inmunización oral con OVA/CpG-ODN fue capaz de inducir respuesta de anticuerpos en los animales viejos con niveles y avidéz similar a los encontrados en animales jóvenes. Estos hallazgos indican que a pesar de que se observaron diferencias en el compartimiento de células T y que la producción de citocinas específicas contra el antígeno fue menor en los animales viejos, la inmunización oral con OVA/CpG-ODN fue efectiva en los animales viejos, ya que en estos se mantiene una respuesta humoral de memoria comparable a la de animales jóvenes hasta 40 días luego de la última inmunización.

Frecuentemente, el perfil de isotipos de anticuerpos de tipo IgG es usado junto con el patrón de citocinas para determinar el perfil de respuesta inmune inducido. El perfil de citocinas que se observó en los animales de ambas edades inmunizados por vía oral con OVA y CpG-ODN, como se discutió previamente, estuvo marcadamente desviado hacia Th1 con producción de IFN- γ y sin producción de IL-5 e IL-10. Luego de la inmunización oral se

observó que el perfil de isotipos de IgG fue una mezcla de los isotipos IgG1 (característicos de un perfil Th1) e IgG2a (característicos de un perfil Th2). Este resultado concuerda con los de trabajos previos que indican que la modificación en la molécula de oligonucleótido de los CpG-ODN, que involucra un cambio en las uniones fosfodiéster a uniones fósforotioato (lo que le confieren resistencia a la degradación por nucleasas), se asocia con la producción de anticuerpos característicos de un perfil neutral o desviado hacia Th2 (McCluskie and Davis, 2000), ya que un oligonucleótido control que no posee motivos CpG pero sintetizado con la misma modificación produce preferencialmente anticuerpos del isotipo IgG1, y la adición de motivos CpG en la estructura de la molécula estimula la producción de anticuerpos indicativos de un perfil Th1 (IgG2a). En paralelo, Maletto y col. encontraron que luego de la inmunización subcutánea utilizando OVA como antígeno y CpG-ODN o un oligonucleótido control (que no contiene motivos CpG) como adyuvantes, los animales inmunizados con OVA CpG-ODN producen un perfil de isotipos mixto en el que se encuentran ambos isotipos, mientras que los animales inmunizados con el oligonucleótido control producen preferencialmente anticuerpos del isotipo IgG1. Teniendo en cuenta estos resultados se puede inferir que la respuesta inducida por la inmunización oral fue netamente Th1 y que la presencia de anticuerpos de tipo IgG1 puede ser atribuible a la naturaleza química del oligonucleótido utilizado como adyuvante en la inmunización oral.

La inmunización oral estimuló también la producción de anticuerpos de tipo IgA en lavados intestinales de los animales jóvenes y viejos. La producción de anticuerpos de tipo IgA es frecuente durante el desarrollo de tolerancia oral hacia un antígeno y es dependiente de citocinas de tipo Th2 como IL-5 e IL-10 (Czerkinsky et al., 1999; Mowat, 2003). Por otro lado, se ha demostrado que la secreción de IgA puede estar aumentada por citocinas de tipo Th1 como el IFN- γ y que esta citoquina estimula a las células B que fueron activadas a través de su Ig de superficie aumentando su capacidad de células presentadoras de antígenos y su capacidad para estimular células T (Kuchroo et al., 1995; Morokata et al., 1995; Mostov, 1999). Nuestros resultados muestran que luego del estímulo de células de animales inmunizados con OVA *in vitro*, no encontramos producción de IL-10 específica, y se observó una respuesta inmune específica contra el antígeno en lugar de tolerancia oral.

Además, durante el desarrollo de la tolerancia oral hacia un antígeno no se producen anticuerpos de tipo IgG, IgM o IgE específicos (Mowat, 1999), y luego de la inmunización oral encontramos producción de anticuerpos de tipo IgG específicos contra OVA en suero en ambos grupos de animales, lo que indica que la inmunización fue efectiva induciendo una respuesta inmune específica de antígeno en lugar de tolerancia oral.

En conclusión podemos decir que la administración oral de CpG-ODN induce, a las 24 horas, un aumento en la producción de IL-12 en las células de ganglios mesentéricos *in vivo* en animales jóvenes y viejos. Por otra parte, los estudios *in vitro*, demuestran que las células B presentes en las placas de Peyer y los ganglios mesentéricos de los animales viejos pueden ser activadas por CpG-ODN, ya que este induce la expresión de moléculas coestimuladoras y del complejo mayor de histocompatibilidad y estos aumentos son comparables a los observados en los animales jóvenes. En relación con la respuesta inmune específica, se observó que luego de la inmunización oral es posible inducir la producción de niveles similares de anticuerpos específicos contra OVA en suero y lavados intestinales. Además, es posible obtener una adecuada respuesta inmune celular de tipo Th1 en mucosas y a nivel sistémico. Estos hallazgos son indicativos de que CpG-ODN puede ser un inmunoestimulante efectivo en los animales viejos, principalmente porque es capaz de estimular tanto a las células de la inmunidad innata como las de la inmunidad adaptativa y puede de alguna forma sobreponerse a las deficiencias observadas en el compartimiento de células T.

Nuestros resultados sugieren que la correcta elección del adyuvante en un esquema de inmunización permite lograr una adecuada respuesta inmune durante el envejecimiento. Esto apoyaría la idea de es posible lograr esquemas de vacunación óptimos para los individuos ancianos adecuando los mismos a la situación inmunológica de estos individuos y utilizando inmunoestimulantes adecuados.

Materialles y Métodos

Materiales y Métodos

Animales

En los diferentes experimentos fueron utilizados ratones hembra de la cepa Balb/c de 3 (jóvenes) y 18 meses (viejos) de edad. Los ratones fueron adquiridos en el Bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Ezeiza, Provincia de Buenos Aires, y envejecidos en el Bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas donde dispusieron de alimento balanceado y agua *ad libitum*. Los diferentes procedimientos experimentales fueron realizados bajo anestesia con éter sulfúrico, a excepción de las inmunizaciones por vía oral en las que los ratones no fueron anestesiados. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (expediente N° 15-01-44195).

Antígenos y Adyuvantes

Las inmunizaciones orales se realizaron utilizando como antígeno la proteína ovoalbúmina (OVA) grado V (Sigma chemicals Co., St Louis USA). Como adyuvante se utilizó un oligodeoxinucleótido no metilado conteniendo motivos citosina-guanina en un contexto particular de bases (CpG-ODN) cuya secuencia fue 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3' (CpG-ODN 1826, Operon Technologies, Inc. Alameda, USA). El oligodeoxinucleótido utilizado fue sintetizado con una cadena resistente a nucleasas con uniones fosforotioato (S-oligo), sin lipopolisacáridos contaminantes.

Anticuerpos

Especie de origen	Especificidad	Clon	Tipo de Marca
-------------------	---------------	------	---------------

Anticuerpos obtenido de BD Pharmingen

Rata	CD32/CD16 de ratón	2.4G2	S/marca
Rata	CD19 de ratón	1D3	PE
Rata	CD4 de ratón	H129.19	PE
Rata	CD8 α de ratón	53-6.7	PE
Rata	CD8 de ratón	53-6.7	PerCP
Hámster	B7-1 de ratón	16-10A1	FITC
Hámster	B7-2 de ratón	GL-1	Biotina
Rata	MHC II de ratón	2G9	Biotina
Rata	CD40 de ratón	3/23	FITC
Rata	IFN- γ de ratón	R4-6A2	S/marca
Rata	FN- γ de ratón	XMG1.2	Biotina
Rata	IFN- γ de ratón	XMG1.2	FITC
Rata (IgG1)	Control de Isotipo	R3-34	FITC
Rata	IL-5 de ratón	TRFK5	S/marca
Rata	IL-5 de ratón	TRFK4	Biotina
Rata	IL-10 de ratón	JES5-2A5	S/marca
Rata	IL-10 de ratón	JES5-E16E3	Biotina
Rata	GM-CSF de ratón	MP1-22E9	S/marca
Rata	GM-CSF de ratón	MP1-31G6	Biotina

Anticuerpos obtenidos de Sigma Chemicals Co.

Cabra	IgG de ratón	Antisuero	HRP
Cabra	IgG2a de ratón	Antisuero	S/marca
Cabra	IgG1 de ratón	Antisuero	S/marca
Cabra	IgM de ratón	Antisuero	S/marca
Cabra	IgM de ratón	Antisuero	HRP
Cabra	IgA de ratón	Antisuero	Biotina

Estreptavidinas obtenidas de BD Pharmingen

SAV-Cychrome 5

SAV-HRP

Métodos de ensayo

Obtención de muestras de plasma y lavados intestinales:

Suero

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante punción retroorbital bajo ligera anestesia con éter sulfúrico antes de la inmunización por vía oral y a diferentes tiempos luego de la última inmunización oral. Posteriormente, luego de centrifugar las muestras durante 5 minutos a 3000 r.p.m. se obtuvo el suero correspondiente a cada muestra. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su análisis.

Lavados intestinales

Las muestras de lavados intestinales correspondientes a animales no inmunizados e inmunizados por vía oral, fueron obtenidas extrayendo el intestino entero y pasando 3 ml de una solución de PBS conteniendo distintos inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, aprotinina $1,5\mu\text{M}$, EDTA 10 mM). Inmediatamente, las muestras fueron centrifugadas a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y posteriormente a 10000 r.p.m. durante 10 minutos. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su análisis.

Obtención de suspensiones celulares:

Células de Placas de Peyer

Los intestinos de animales de 3 y 18 meses de edad fueron extraídos en condiciones de esterilidad y colocados en placas de Petri conteniendo medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 2% SFB y $40\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. Posteriormente, en gabinete de flujo laminar, se extrajeron las placas de Peyer, las que se identificaron a simple vista. Las suspensiones celulares fueron obtenidas por medio de disgregación mecánica utilizando una malla metálica, y posterior lavado en RPMI 1640. Se determinó la viabilidad celular utilizando

azul de tripán y se realizó el recuento celular. Las células así obtenidas fueron utilizadas para realizar cultivo celular o citometría de flujo.

Células de Bazo

Los bazos de animales de 3 y 18 meses fueron extraídos y colocados en placas de Petri conteniendo RPMI 1640 2% SFB y gentamicina. Las suspensiones celulares se obtuvieron por disgregación mecánica de los órganos a través de una malla metálica. Posteriormente, se trataron con buffer de lisis durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar los glóbulos rojos. Luego de 2 lavados en RPMI 1640, se realizó el recuento y se midió la viabilidad celular. Las células así obtenidas fueron utilizadas en citometría de flujo y cultivo celular.

Células de ganglios mesentéricos

La extracción de los ganglios mesentéricos, que se observan como una cadena ganglionar adherida al intestino, se realizó en condiciones de esterilidad y los ganglios fueron colocados en RPMI 1640 2% SFB y gentamicina. Las suspensiones celulares se obtuvieron por disgregación mecánica de los órganos a través de una malla metálica. Luego de 2 lavados en RPMI 1640, se realizó el recuento y se midió la viabilidad celular. Las células así obtenidas fueron utilizadas para citometría de flujo y cultivo celular.

Células de cavidad peritoneal

Para obtener las células, se inyectó la cavidad peritoneal de los ratones en condiciones de esterilidad con 10 ml de RPMI sin rojo fenol conteniendo gentamicina. Luego de realizar suaves movimiento en la región abdominal, se extrajo el RPMI de la cavidad peritoneal conteniendo las células residentes, mediante el uso de una jeringa. Posteriormente, las células fueron centrifugadas y lavadas con RPMI, se realizó el recuento y se midió la viabilidad celular. Las células así obtenidas fueron utilizadas para citometría de flujo y cultivo celular.

Cultivo celular

Las células obtenidas del procesamiento de placas de Peyer, ganglios mesentéricos o bazo fueron lavadas en RPMI 1640 2% SFB y gentamicina,

posteriormente se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 2 mM L-glutamina, 50 μ M 2-mercaptoetanol (2-ME) y 40 μ g/ml gentamicina. Las células fueron contadas en cámara de Neubauer o de Malazzes y se midió la viabilidad celular. Las células fueron luego colocadas en placas de 96 o 48 pocillos tratadas para cultivo celular, y cultivadas con medio de cultivo o los estímulos correspondientes a cada experimento, en una estufa a 37°C y 5% de saturación de dióxido de carbono.

En los ensayos de proliferación celular, las células (2×10^6 células/ml) fueron cultivadas durante 6 días con medio de cultivo, OVA (1 mg/ml) o ConA (5 μ M) y pulsadas con timidina tritiada 18 hs antes de la recolección del cultivo. Posteriormente, se midió la incorporación de timidina en un contador de centelleo. Para la medición de citoquinas en el sobrenadante de cultivo, las células (5×10^6 células/ml para estímulos específicos o $2,5 \times 10^6$ células/ml en el caso de estímulos inespecíficos) fueron cultivadas en presencia de medio de cultivo, OVA (1 mg/ml), ConA (5 μ M) o CpG (3 μ M) durante 72 horas.

Ensayos Histológicos y técnicas de coloración

Técnica histológica según Sainte-Marie

Para realizar estudios histológicos, los órganos fueron fijados durante 15-24 horas en etano 96° previamente enfriado a 4 °C. Luego de la fijación, y con el fin de eliminar los restos de fijador, los órganos se lavaron exhaustivamente con agua corriente. Para permitir la inclusión en parafina, los tejidos se deshidrataron mediante cuatro pasajes sucesivos a través de etanol absoluto frío, durante 1-2 horas en cada uno. Una vez deshidratados, los cortes se aclararon mediante tres baños consecutivos en xilol en frío de 2 horas cada uno. Finalmente, la inclusión en parafina se realizó colocando los órganos en cuatro baños de parafina fundida a 56°C de 2 horas cada uno. Una vez formados los bloques de parafina conteniendo los órganos, se procedió a realizar los cortes. Los cortes de 5 μ m se recogieron en portaobjetos cubiertos con gelatina y se dejaron secar para su posterior coloración. Los cortes histológicos obtenidos de esta forma pueden ser utilizados para realizar técnicas de coloración convencionales como para inmunohistoquímica.

Técnica de Tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E)

Los cortes obtenidos de acuerdo al procesamiento según Sainte-Marie se colorearon con la técnica de H&E. Para ello, los cortes se desparafinaron colocándolos en 2 baños de xilol de 5 minutos cada uno y se hidrataron mediante pasajes sucesivos a través de soluciones de graduación decreciente de alcohol etílico (desde 100% a 50%) y posterior colocación en agua destilada. Se colocaron en la solución de hematoxilina de Meyer durante aproximadamente 5 minutos, y luego se hizo virar la hematoxilina en agua corriente durante 15 minutos. En el paso siguiente, los cortes se colorearon con eosina durante 3 minutos. Posteriormente, se procedió a la deshidratación mediante pasajes sucesivos a través de soluciones de alcohol etílico de graduación creciente (desde 50 a 100 %). Finalmente, los cortes se aclararon en baños de etanol-xilol y xilol para luego montarlos en bálsamo de Canadá.

Técnica de coloración con PAS-Hematoxilina

Los cortes fueron procesados para su hidratación de la misma forma que para realizar la coloración con H&E. Posteriormente, los corte fueron colocados 5 minutos en un solución de ácido peryódico, lavadas en un baño de agua corriente y un baño de agua destilada. Luego del tratamiento con ácido peryódico, los cortes fueron sumergidos en reactivo de Schiff durante 15 minutos. Luego de dos pasajes por ácido sulfuroso, los cortes fueron lavados en agua destilada y contra coloreados con Hematoxilina de Meyer durante 5 minutos y agua corriente durante 15 minutos. El procedimiento de deshidratación y montaje se realizó como ya fue descrito para la técnica de H&E. La coloración con PAS-Hematoxilina se realizó con el objetivo de distinguir la membrana basal del epitelio intestinal para poder identificar y cuantificar los linfocitos intraepiteliales intestinales.

Técnica para inmunohistoquímica en cortes de intestino

Los intestinos extraídos de animales de 3 y 18 meses de edad fueron abiertos longitudinalmente colocados sobre un papel de filtro humedecido con PBS, enrollados y atados con hilo de cirugía. Posteriormente fueron procesados según la técnica de Sainte-Marie. Una vez obtenidos los cortes se procedió a realizar la técnica de inmunohistoquímica para la identificación y cuantificación de células IgA⁺ en la lámina propia intestinal. Los cortes fueron deshidratados en 2 baños de xilol de 5 minutos cada uno, tres baños de

alcohol etílico 100% de 4 minutos cada uno y 2 baños de alcohol 96% frío de 3 minutos cada uno y posteriormente se colocaron en PBS a temperatura ambiente. La actividad de peroxidasa endógena del tejido fue bloqueada incubando los cortes de tejido durante 30 minutos en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno en alcohol metílico. Luego de un lavado de 20 minutos en PBS, los cortes fueron bloqueados con una solución al 5% de suero de cabra durante 45 minutos a temperatura ambiente. Sin lavar, se agregó sobre cada corte de tejido una dilución adecuada de un anticuerpo anti-IgA marcado con biotina y se incubaron los cortes durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Al día siguiente, se lavaron los cortes de tejido en PBS y se incubaron durante 40 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente con estreptavidina marcada con la enzima peroxidasa. Luego de lavados en PBS, se incubaron los cortes con el sustrato de la enzima peroxidasa y un cromógeno insoluble luego de la reacción enzimática (peróxido de hidrógeno y diaminobencidina, respectivamente) durante 6 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Los cortes fueron luego lavados, deshidratados, aclarados y montados, para su posterior conservación a temperatura ambiente.

Citometría de Flujo

Citometría de flujo para marcadores de superficie

Para realizar a técnica de marcación se utilizaron poblaciones celulares de placas de Peyer, ganglios mesentéricos, y bazo de animales de 3 y 18 meses de edad. Las células (1×10^6) se incubaron durante 25 minutos a 4°C con un anticuerpo anti-CD16/CD32 para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos a los receptores para la porción Fc de inmunoglobulinas. Luego de 3 lavados en HBSS conteniendo 2% SFB y 0,1% de azida sódica, las suspensiones celulares fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales correspondientes marcados con los diferentes fluorocromos y en diluciones previamente establecidas durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo (Cytoron Absolute Cytometer, Ortho Diagnostic System, R, NJ). Los datos obtenidos en el citómetro de flujo fueron analizados utilizando el programa WinMDI versión 2.8 (Joseph Trotter©, The Scrip Research Institute, La Jolla, CA).

Determinación de citoquinas intracelulares

Para la determinación de citoquinas intracelulares, las suspensiones celulares de placas de Peyer y bazo fueron estimuladas durante 24 horas en cultivo en presencia de OVA (1mg/ml). Cinco horas antes de la recolección de las células se agregó Monensin (Sigma Chemical Co., St Louis MO). Las células fueron luego recolectadas, lavadas 2 veces con HBSS conteniendo 1% SFB y 0,1% de azida sódica y teñidas con anticuerpos anti-CD4 marcado con Phicoeritrin (PE) y anti-CD8 marcado con Peridinin chlorophyll protein (PerCP). Luego las células fueron fijadas en paraformaldeído al 4% en PBS durante 20 minutos a 4°C y posteriormente permeabilizadas con HBSS conteniendo 2% SFB, 0,1% de azida sódica y 0,1% de saponina. Para realizar la tinción intracelular, las células fueron luego incubadas con un anticuerpo anti-INF- γ marcado con isotiocianato de fluoresceína durante 45 minutos a 4°C. Luego de 2 lavados en el buffer de permeabilización, las células fueron adquiridas en el citómetro de flujo. Normalmente, se adquirieron 65000 células por muestra. Los datos obtenidos en el citómetro de flujo fueron analizados utilizando el programa WinMDI versión 2.8 (Joseph Trotter©, The Scirpt Research Institute, La Jolla, CA).

Enzimo inmuno ensayo en fase sólida (ELISA)

Anticuerpos específicos en suero y lavados intestinales

Placas de poliestireno de 96 pocillos fueron sensibilizadas con 100 μ l por pocillo de OVA (100 μ g/pocillo) en solución de tampón de carbonato-bicarbonato (pH=9,6) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, la unión inespecífica fue bloqueada incubando los pocillos con 200 μ l/pocillo de PBS/gelatina 0,5%/Tween durante 45 minutos a 37°C. Luego de tres lavados con PBS/Tween, se agregaron a las filas de las placas diluciones seriadas de las muestras de suero o lavados intestinales individualmente durante 1 hora a 37°C. Los anticuerpos unidos se detectaron, después de lavar 3 veces, agregando en cada caso los anticuerpos de detección correspondientes marcados con peroxidasa (anti-IgG de ratón-HRP, anti-IgA de ratón-HRP, anti

IgG1 de ratón-HRP o anti- IgG2a de ratón-HRP) diluidos en PBS/gelatina/Tween durante 1 hora a 37°C. La presencia de peroxidasa se reveló, luego de lavar el exceso de anticuerpo de detección unido, agregando el sustrato de la enzima y un cromógeno soluble luego de la reacción enzimática (peróxido de hidrógeno y orto-fenilendiamina) diluidos en buffer fosfato-citrato (pH=4,5-5,0) en oscuridad. Luego de 15-30 minutos la reacción fue detenida mediante el agregado de H₂SO₄ 4N. La absorbancia se midió en un lector de placas de 96 pocillos (Microplate Reader Bio-Rad450) a 490 nm. Las pruebas se realizaron procesando muestras de suero preinmune en paralelo con las muestras de suero inmune.

Avidez de anticuerpos en suero

Para la determinación de la avidéz de los anticuerpos en suero se realizó un ensayo basado en la resistencia de los anticuerpos específicos, presentes en las muestras de suero, al lavado con soluciones concentración creciente de tiocianato de potasio (KSCN). Para ello, placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con OVA (1 mg/ml) diluida en buffer carbonato-bicarbonato (pH= 9,6) de la misma forma que para la determinación de anticuerpos en suero. Posteriormente, las muestras de suero fueron incubadas durante 1 hora a 37°C a una dilución tal que tiene una densidad óptica de 1-2 unidades en un ensayo de ELISA convencional. Las placas fueron lavadas posteriormente con PBS/Tween, y luego, se agregaron a la placa 200 µl de concentraciones crecientes de KSCN (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5M) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron procesadas por duplicado para cada concentración de KSCN. Luego de 3 lavados con PBS/Tween, se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa. La presencia de peroxidasa fue revelada de la misma forma que en el ensayo de ELISA para anticuerpos en suero. Los valores de densidad óptica de los pocillos tratados con KSCN fueron expresados como un porcentaje de los pocillos de referencia, no tratados con KSCN.

Citoquinas en sobrenadante de cultivo

Placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con 50 µl de anticuerpo de captura específico para la citoquina a determinar, diluido en buffer de sensibilización, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los pocillos fueron bloqueados

durante 90 minutos a temperatura ambiente con 200 μl de buffer de bloqueo. Luego de tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0,05%, se agregaron 100 μl del sobrenadante de cultivo de las muestras problemas y en paralelo 100 μl de diluciones seriadas de una solución testigo de concentración conocida de la citoquina a determinar, y se incubó durante toda la noche a 4°C. La incubación con 100 μl de anticuerpo de detección biotinilado se realizó durante 90 minutos a temperatura ambiente, luego de lavar cuatro veces durante 5 minutos con PBS-Tween 0,05%. Finalmente, se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 0,05% y se agregaron 100 μl de estreptavidina marcada con peroxidasa. La presencia de peroxidasa fue revelada de la misma forma que en el ensayo de ELISA para anticuerpos en suero.

Soluciones

Solución buffer salino de fosfatos (PBS) pH 7,2-7,4

NaCl	7,20 g
KH_2PO_4 anhidro	0,43 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	14,80 g
H_2O	c.s.p. 1000 ml

Soluciones utilizadas en Enzimoimmunoensayo (ELISA)

Solución tampón sensibilizante carbonato-bicarbonato pH 9,6:

Na_2CO_3	1,59 g
NaHCO_3	2,93 g
H_2O	c.s.p. 1000 ml

Solución tampón sensibilizante de fosfatos para ELISA de citoquinas:

Solución A

Na_2HPO_4	14,2 g
H_2O	c.s.p. 1000

Solución B

NaH ₂ PO ₄	12,0 g
H ₂ O	c.s.p. 1000

Ajustar el pH de la solución A a pH=9 con la solución B

Solución bloqueante PBS/gelatina:

Gelatina de uso bacteriológico	5 g
PBS	c.s.p. 1000 ml

Solución bloqueante para ELISA de citoquinas:

SFB	100 ml
PBS pH 7,2-7,4	900 ml

Solución diluyente PBS/Tween/gelatina:

Gelatina de uso bacteriológico	5 g
Tween 20	500 µl
PBS	c.s.p. 1000 ml

Solución de lavado PBS/Tween:

Tween 20	500 µl
PBS	c.s.p. 1000 ml

Solución tampón fosfato-citrato pH 4,9-5,2:

NaHPO ₄	7,25 g
Ácido cítrico	3,50 g
H ₂ O	c.s.p. 1000 ml

Solución reactivo de color *:

Bicloruro de o-fenilendiamina	0,4 g
H ₂ O ₂	0,6 ml
Tampón fosfato citrato	c.s.p. 1000 ml

*Se preparó inmediatamente antes de usar y se mantuvo protegido de la luz hasta su empleo.

Solución para finalizar la reacción de color:

H ₂ SO ₄ 4N

Soluciones utilizadas para preparar las suspensiones celulares**Medios de cultivo**

El medio de cultivo RPMI 1640 se adquirió en Sigma Chemical Co., St. Louis, EEUU y preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Solución salina balanceada de Hank's (HBSS) sin rojo fenol:

KCl	0,40 g
Na ₂ HPO ₄	0,04788 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
NaCl	8,0 g
Glucosa	1,0 g
H ₂ O	c.s.p. 1000 ml

Antes de su uso se agregó Na₂EDTA, pH 8,0, a una concentración de 5mM y azida sódica, a una concentración de 0,02%.

Para la preparación de RPMI 1640 y de HBSS se utilizó H₂O bidestilada (Laboratorio de Hemoderivados, UNC, Argentina), o H₂O tipo I (procesada en un equipo Mili Q de Millipore, Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC).

Soluciones para lisar glóbulos rojos:

Buffer de lisis, que se obtuvo en Sigma Chemical Co, St. Louis, EEUU.

Solución de NH₄Cl:

NH ₄ Cl	8,29 g
KHCO ₃	0,1 g
Na ₂ EDTA	3,72 mg
Agua destilada	c.s.p. 100ml

Solución utilizada para analizar viabilidad celular:

Solución A:

Azul de Trypan	0,50 g
H ₂ O	c.s.p. 1000 ml

Solución B:

NaCl	4,25 g
H ₂ O	c.s.p. 1000 ml

En el momento de uso se diluye 1 parte de la solución B con 4 partes de la solución A

Soluciones utilizadas en los estudios histológicos:**Fijadores:**

Formol al 10% tamponado:

Formalina (formaldehído al 40%)	10 ml
PBS 1X	c.s.p. 100 ml

Alcohol etílico 96°

Reactivo de Color para la reacción de Inmunohistoquímica:**Solución de sustrato de peroxidasa sin níquel:**

Diaminobencidina	1g
TRIS 0,1M pH 7,2	c.s.p. 100 ml

Solución de TRIS:

Trizma Base	1,21g
H ₂ O destilada	c.s.p. 100 ml

Ajustar el pH a 7,2 utilizando HCl 1N.

Modo de preparación del reactivo de color:

La DAB debe ser pesada en oscuridad y colocada en un Erlenmeyer forrado con papel metálico. En el momento de su uso, disolver en 100 ml de TRIS en

agitación. Filtrar la solución 2 veces (siempre protegiendo de la luz). Se debe agregar a último momento 0,1 ml de H₂O₂ 100 volúmenes, agitar y usar inmediatamente. La solución final será DAB/TRIS/0,03% H₂O₂. Es importante no preparar la solución con anterioridad. La solución recién preparada debe ser transparente, si se torna marrón debe ser desechada. Utilizando esta solución como reactivo de color se obtiene finalmente en tejido un producto insoluble de color marrón.

Colorantes:

Hematoxilina de Meyer:

Hematoxilina	1 g
Alumbre de K(SO ₄) Al K	50,0 g
Ácido cítrico	1,0 g
Hidrato de cloral	50,0 g
Iodato de Na	0,2 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 1000 ml

Forma de preparación de la Hematoxilina:

Se disuelve la Hematoxilina en 100 ml de alcohol absoluto. El alumbre se disuelve en agua caliente (sin hervir); luego la solución se enfría y se le agrega la hematoxilina, el hidrato de cloral, ácido cítrico y finalmente el yodato de Na. Se completa con H₂O destilada hasta un volumen final de 1000 ml. Esta solución debe tener color rojo vino y con agua corriente debe virar a un color violeta. Así preparada está en condiciones de ser utilizada inmediatamente.

Solución de Eosina:

Solución de eosina madre (1%):

Eosina	1,0 g
Alcohol 70°	c.s.p. 100 ml

Solución de eosina:

Sol. de eosina madre	1 ml
H ₂ O destilada	15 ml

Solución para la Reacción de PAS:

Solución de Ácido Periódico:

Acido Periódico	0,5 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 100 ml

Reactivo de Schiff:

Fuccina básica	1 g
HCl 1N	20 ml
Metabisulfito sódico anhidro	1 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 200 ml

Modo de preparación del reactivo de Schiff:

Método de Tomasi: Disolver la fuccina básica en H₂O destilada hirviendo en agitación. Enfriar a 52 °C y filtrar, luego añadir el HCl 1N y dejara enfriar hasta 25 °C. Agregar el metabisulfito sódico. Después de que la solución haya permanecido en la oscuridad durante 16-24 hs, agregar 2 g de carbón vegetal activado, agitar hasta la desaparición de color y filtrar, colocar la solución filtrada en un recipiente al resguardo de la luz.

Baño de ácido sulfurado

Bisulfito sódico al 10%	5 ml
HCl 1N	5 ml
H ₂ O destilada	c.s.p. 100 ml

Bibliografija

Bibliografia**-A-**

- Al-Mariri, A., Tibor, A., Mertens, P., De Bolle, X., Michel, P., Godefroid, J., Walravens, K. and Letesson, J.J. (2001) Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun* 69, 4816-22.
- Alugupalli, K.R., Leong, J.M., Woodland, R.T., Muramatsu, M., Honjo, T. and Gerstein, R.M. (2004) B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 21, 379-90.
- Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., Little, S., Havlir, D.V., Richman, D.D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., McMichael, A.J. and Rowland-Jones, S.L. (2002) Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8, 379-85.
- Arranz, E., O'Mahony, S., Barton, J.R. and Ferguson, A. (1992) Immunosenescence and mucosal immunity: significant effects of old age on secretory IgA concentrations and intraepithelial lymphocyte counts. *Gut* 33, 882-6.
- Asano, T., Kaneko, H., Terada, T., Kasahara, Y., Fukao, T., Kasahara, K. and Kondo, N. (2004) Molecular analysis of B-cell differentiation in selective or partial IgA deficiency. *Clin Exp Immunol* 136, 284-90.
- Ashkar, A.A., Bauer, S., Mitchell, W.J., Vieira, J. and Rosenthal, K.L. (2003) Local delivery of CpG oligodeoxynucleotides induces rapid changes in the genital mucosa and inhibits replication, but not entry, of herpes simplex virus type 2. *J Virol* 77, 8948-56.

-B-

- Baggio, G., Donazzan, S., Monti, D., Mari, D., Martini, S., Gabelli, C., Dalla Vestra, M., Previato, L., Guido, M., Pigozzo, S., Cortella, I., Crepaldi, G. and Franceschi, C.

- (1998) Lipoprotein(a) and lipoprotein profile in healthy centenarians: a reappraisal of vascular risk factors. *Faseb J* 12, 433-7.
- Ballas, Z.K., Rasmussen, W.L. and Krieg, A.M. (1996) Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 157, 1840-5.
- Beharka, A.A., Paiva, S., Leka, L.S., Ribaya-Mercado, J.D., Russell, R.M. and Nibkin Meydani, S. (2001) Effect of age on the gastrointestinal-associated mucosal immune response of humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56, B218-23.
- Bernstein, E., Kaye, D., Abrutyn, E., Gross, P., Dorfman, M. and Murasko, D.M. (1999) Immune response to influenza vaccination in a large healthy elderly population. *Vaccine* 17, 82-94.
- Bilsborough, J. and Viney, J.L. (2004) Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology* 127, 300-9.
- Boehmer, E.D., Goral, J., Faunce, D.E. and Kovacs, E.J. (2004) Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. *J Leukoc Biol* 75, 342-9.
- Bos, N.A., Bun, J.C., Popma, S.H., Cebra, E.R., Deenen, G.J., van der Cammen, M.J., Kroese, F.G. and Cebra, J.J. (1996) Monoclonal immunoglobulin A derived from peritoneal B cells is encoded by both germ line and somatically mutated VH genes and is reactive with commensal bacteria. *Infect Immun* 64, 616-23.
- Bowman, C.C. and Clements, J.D. (2001) Differential biological and adjuvant activities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin hybrids. *Infect Immun* 69, 1528-35.
- Brandtzaeg, P., Baekkevold, E.S., Farstad, I.N., Jahnsen, F.L., Johansen, F.E., Nilsen, E.M. and Yamanaka, T. (1999a) Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today* 20, 141-51.
- Brandtzaeg, P., Farstad, I.N. and Haraldsen, G. (1999b) Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol Today* 20, 267-77.
- Brazolot Millan, C.L., Weeratna, R., Krieg, A.M., Siegrist, C.A. and Davis, H.L. (1998) CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15553-8.

-C-

- Cardenas-Freytag, L., Cheng, E., Mayeux, P., Domer, J.E. and Clements, J.D. (1999) Effectiveness of a vaccine composed of heat-killed *Candida albicans* and a

novel mucosal adjuvant, LT(R192G), against systemic candidiasis. *Infect Immun* 67, 826-33.

Cardenas-Freytag, L., Steele, C., Wormley, F.L., Jr., Cheng, E., Clements, J.D. and Fidel, P.L., Jr. (2002) Partial protection against experimental vaginal candidiasis after mucosal vaccination with heat-killed *Candida albicans* and the mucosal adjuvant LT(R192G). *Med Mycol* 40, 291-9.

Carozzi, S., Salit, M., Cantaluppi, A., Nasini, M.G., Barocci, S., Cantarella, S. and Lamperi, S. (1989) Effect of monophosphoryl lipid A on the in vitro function of peritoneal leukocytes from uremic patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 27, 1748-53.

Castle, S.C. (2000) Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis* 31, 578-85.

Chelvarajan, R.L., Collins, S.M., Van Willigen, J.M. and Bondada, S. (2005) The unresponsiveness of aged mice to polysaccharide antigens is a result of a defect in macrophage function. *J Leukoc Biol* 77, 503-12.

Cheng, E., Cardenas-Freytag, L. and Clements, J.D. (1999) The role of cAMP in mucosal adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT). *Vaccine* 18, 38-49.

Chiaromonte, M.G., Hesse, M., Cheever, A.W. and Wynn, T.A. (2000) CpG oligonucleotides can prophylactically immunize against Th2-mediated schistosome egg-induced pathology by an IL-12-independent mechanism. *J Immunol* 164, 973-85.

Clements, J.D., Hartzog, N.M. and Lyon, F.L. (1988) Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 6, 269-77.

Czerkinsky, C., Anjuere, F., McGhee, J.R., George-Chandy, A., Holmgren, J., Kieny, M.P., Fujiyashi, K., Mestecky, J.F., Pierrefite-Carle, V., Rask, C. and Sun, J.B. (1999) Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunol Rev* 170, 197-222.

-D-

Davila, D.R., Edwards, C.K., 3rd, Arkins, S., Simon, J. and Kelley, K.W. (1990) Interferon-gamma-induced priming for secretion of superoxide anion and tumor necrosis factor-alpha declines in macrophages from aged rats. *Faseb J* 4, 2906-11.

Davis, H.L., Weeratna, R., Waldschmidt, T.J., Tygrett, L., Schorr, J., Krieg, A.M. and Weeranta, R. (1998) CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in

mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 160, 870-6.

-E-

Eastcott, J.W., Holmberg, C.J., Dewhirst, F.E., Esch, T.R., Smith, D.J. and Taubman, M.A. (2001) Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid. *Vaccine* 19, 1636-42.

Eaton, S.M., Burns, E.M., Kusser, K., Randall, T.D. and Haynes, L. (2004) Age-related defects in CD4 T cell cognate helper function lead to reductions in humoral responses. *J Exp Med* 200, 1613-22.

Effros, R.B., Boucher, N., Porter, V., Zhu, X., Spaulding, C., Walford, R.L., Kronenberg, M., Cohen, D. and Schachter, F. (1994) Decline in CD28⁺ T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp Gerontol* 29, 601-9.

Effros, R.B. and Pawelec, G. (1997) Replicative senescence of T cells: does the Hayflick Limit lead to immune exhaustion? *Immunol Today* 18, 450-4.

Elkins, K.L., Rhinehart-Jones, T.R., Stibitz, S., Conover, J.S. and Klinman, D.M. (1999) Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* 162, 2291-8.

Elson, C.O., and Dertzbaugh, M.T., (1999) Mucosal Adjuvants. In Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienestock, J., and McJhee, J.R. (ed.), *Mucosal Immunology*, 2nd ed Academic Press, New York, pp. 817-838.

Enioutina, E.Y., Visic, V.D. and Daynes, R.A. (2000) Enhancement of common mucosal immunity in aged mice following their supplementation with various antioxidants. *Vaccine* 18, 2381-93.

-F-

Fagarasan, S. and Honjo, T. (2000) T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 290, 89-92.

Fagarasan, S., Shinkura, R., Kamata, T., Nogaki, F., Ikuta, K., Tashiro, K. and Honjo, T. (2000) A lymphoplasia (aly)-type nuclear factor kappaB-inducing kinase (NIK) causes defects in secondary lymphoid tissue chemokine receptor signaling and

- homing of peritoneal cells to the gut-associated lymphatic tissue system. *J Exp Med* 191, 1477-86.
- Fleming, H.E. and Paige, C.J. (2001) Pre-B cell receptor signaling mediates selective response to IL-7 at the pro-B to pre-B cell transition via an ERK/MAP kinase-dependent pathway. *Immunity* 15, 521-31.
- Franceschi, C., Bonafe, M. and Valensin, S. (2000a) Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 18, 1717-20.
- Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E. and Benedictis, G. (2000b) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908, 244-54.
- Frank, F.M., Petray, P.B., Cazorla, S.I., Munoz, M.C., Corral, R.S. and Malchiodi, E.L. (2003) Use of a purified *Trypanosoma cruzi* antigen and CpG oligodeoxynucleotides for immunoprotection against a lethal challenge with trypomastigotes. *Vaccine* 22, 77-86.
- Fulop, T., Larbi, A., Douziech, N., Fortin, C., Guerard, K.P., Lesur, O., Khalil, A. and Dupuis, G. (2004) Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* 3, 217-26.

-G-

- Ginaldi, L., Loreto, M.F., Corsi, M.P., Modesti, M. and De Martinis, M. (2001) Immunosenescence and infectious diseases. *Microbes Infect* 3, 851-7.
- Globerson, A. and Effros, R.B. (2000) Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today* 21, 515-21.
- Gluck, U., Gebbers, J.O. and Gluck, R. (1999) Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* heat-labile toxin in adult volunteers. *J Virol* 73, 7780-6.
- Gonzalez-Juarrero, M., Hattle, J.M., Izzo, A., Junqueira-Kipnis, A.P., Shim, T.S., Trapnell, B.C., Cooper, A.M. and Orme, I.M. (2005) Disruption of granulocyte macrophage-colony stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Leukoc Biol* 77, 914-22.
- Goodrich, M.E. and McGee, D.W. (1998) Regulation of mucosal B cell immunoglobulin secretion by intestinal epithelial cell-derived cytokines. *Cytokine* 10, 948-55.
- Grubeck-Loebenstien, B. and Wick, G. (2002) The aging of the immune system. *Adv Immunol* 80, 243-84.



Grupta, R.K., Griffin, P., Chang, A.C., Rivera, R., Anderson, R., Rost, B., Cecchini, D., Nicholson, M., Siber, G.R. (1996) The role of adjuvants and delivery systems in modulation of immune responses to vaccines. *Adv Exp Med Biol* 397, 105-113.

-H-

Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, M.N., Tamura, S., Kurata, T., Takeda, Y. and Kiyono, H. (2003) Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4+ T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J Immunol* 170, 1754-62.

Haneberg, B., Kendall, D., Amerongen, H.M., Apter, F.M., Kraehenbuhl, J.P. and Neutra, M.R. (1994) Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infect Immun* 62, 15-23.

Hardy, R.R. and Hayakawa, K. (2001) B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19, 595-621.

Hartmann, G. and Krieg, A.M. (2000) Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 164, 944-53.

Hartmann, G., Weeratna, R.D., Ballas, Z.K., Payette, P., Blackwell, S., Suparto, I., Rasmussen, W.L., Waldschmidt, M., Sajuthi, D., Purcell, R.H., Davis, H.L. and Krieg, A.M. (2000) Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 164, 1617-24.

Hartmann, G., Weiner, G.J. and Krieg, A.M. (1999) CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9305-10.

Hashigucci, K., Ogawa, H., Ishidate, T., Yamashita, R., Kamiya, H., Watanabe, K., Hattori, N., Sato, T., Suzuki, Y., Nagamine, T., Aizawa, C., Tamura, S., Kurata, T. and Oya, A. (1996) Antibody responses in volunteers induced by nasal influenza vaccine combined with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit containing a trace amount of the holotoxin. *Vaccine* 14, 113-9.

Haynes, L., Eaton, S.M., Burns, E.M., Randall, T.D. and Swain, S.L. (2003) CD4 T cell memory derived from young naive cells functions well into old age, but memory generated from aged naive cells functions poorly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15053-8.

- Haynes, L., Eaton, S.M., Burns, E.M., Rincon, M. and Swain, S.L. (2004) Inflammatory cytokines overcome age-related defects in CD4 T cell responses in vivo. *J Immunol* 172, 5194-9.
- Haynes, L., Linton, P.J., Eaton, S.M., Tonkonogy, S.L. and Swain, S.L. (1999) Interleukin 2, but not other common gamma chain-binding cytokines, can reverse the defect in generation of CD4 effector T cells from naive T cells of aged mice. *J Exp Med* 190, 1013-24.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-5.
- Henricson, B.E., Manthey, C.L., Perera, P.Y., Hamilton, T.A. and Vogel, S.N. (1993) Dissociation of lipopolysaccharide (LPS)-inducible gene expression in murine macrophages pretreated with smooth LPS versus monophosphoryl lipid A. *Infect Immun* 61, 2325-33.
- Hogarth, P.J., Jahans, K.J., Hecker, R., Hewinson, R.G. and Chambers, M.A. (2003) Evaluation of adjuvants for protein vaccines against tuberculosis in guinea pigs. *Vaccine* 21, 977-82.
- Holmgren, J. and Czerkinsky, C. (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11, S45-53.

-I-

- Iho, S., Yamamoto, T., Takahashi, T. and Yamamoto, S. (1999) Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production in vitro. *J Immunol* 163, 3642-52.
- Iwasaki, A. and Kelsall, B.L. (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, 229-39.

-J-

- Jakob, T., Walker, P.S., Krieg, A.M., Udey, M.C. and Vogel, J.C. (1998) Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 161, 3042-9.

- Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Johnson, S.A., Rozzo, S.J. and Cambier, J.C. (2002) Aging-dependent exclusion of antigen-inexperienced cells from the peripheral B cell repertoire. *J Immunol* 168, 5014-23.
- K-
- Kang, I., Hong, M.S., Nolasco, H., Park, S.H., Dan, J.M., Choi, J.Y. and Craft, J. (2004) Age-associated change in the frequency of memory CD4+ T cells impairs long term CD4+ T cell responses to influenza vaccine. *J Immunol* 173, 673-81.
- Kapasi, Z.F., Murali-Krishna, K., McRae, M.L. and Ahmed, R. (2002) Defective generation but normal maintenance of memory T cells in old mice. *Eur J Immunol* 32, 1567-73.
- Katz, J.M., Lu, X., Young, S.A. and Galphin, J.C. (1997) Adjuvant activity of the heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* for oral administration of inactivated influenza virus vaccine. *J Infect Dis* 175, 352-63.
- Kawanishi, H., Senda, S. and Ajitsu, S. (1989) Aging-associated intrinsic defects in IgA production by murine Peyer's patch B cells stimulated by autoreactive Peyer's patch T cell hybridoma-derived B cell stimulatory factors (BSF). *Mech Ageing Dev* 49, 61-78.
- Kelsall, B., and Strober, W. (1999) Gut-associated Lymphoid Tissue: antigen handling and T-lymphocyte responses. In Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienestock, J., and McJhee, J.R. (ed.), *Mucosal Immunology*, 2nd ed Academic Press, New York, pp. 293-317.
- Khatami, S., Brummer, E. and Stevens, D.A. (2001) Effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in vivo on cytokine production and proliferation by spleen cells. *Clin Exp Immunol* 125, 198-201.
- Kirk, P. and Bazan, J.F. (2005) Pathogen recognition: TLRs throw us a curve. *Immunity* 23, 347-50.
- Kissin, E., Tomasi, M., McCartney-Francis, N., Gibbs, C.L. and Smith, P.D. (1997) Age-related decline in murine macrophage production of nitric oxide. *J Infect Dis* 175, 1004-7.
- Kiyono, H. and Fukuyama, S. (2004) NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 4, 699-710.
- Kline, G.H., Hayden, T.A. and Klinman, N.R. (1999) B cell maintenance in aged mice reflects both increased B cell longevity and decreased B cell generation. *J Immunol* 162, 3342-9.

- Klinman, D.M. (1998) Therapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8, 181-4.
- Klinman, D.M., Conover, J. and Coban, C. (1999) Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect Immun* 67, 5658-63.
- Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J. and Krieg, A.M. (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2879-83.
- Koga, T., McGhee, J.R., Kato, H., Kato, R., Kiyono, H. and Fujihashi, K. (2000) Evidence for early aging in the mucosal immune system. *J Immunol* 165, 5352-9.
- Krieg, A.M. (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20, 709-60.
- Krieg, A.M. and Davis, H.L. (2001) Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA. *Curr Opin Mol Ther* 3, 15-24.
- Krieg, A.M., Love-Homan, L., Yi, A.K. and Harty, J.T. (1998a) CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 161, 2428-34.
- Krieg, A.M., Wu, T., Weeratna, R., Efler, S.M., Love-Homan, L., Yang, L., Yi, A.K., Short, D. and Davis, H.L. (1998b) Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12631-6.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. and Klinman, D.M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-9.
- Kroese, F.G., de Waard, R. and Bos, N.A. (1996) B-1 cells and their reactivity with the murine intestinal microflora. *Semin Immunol* 8, 11-8.
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N. and Glimcher, L.H. (1995) B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80, 707-18.

-L-

- Labrie, J.E., 3rd, Sah, A.P., Allman, D.M., Cancro, M.P. and Gerstein, R.M. (2004) Bone marrow microenvironmental changes underlie reduced RAG-mediated recombination and B cell generation in aged mice. *J Exp Med* 200, 411-23.

- Larbi, A., Douziech, N., Dupuis, G., Khalil, A., Pelletier, H., Guerard, K.P. and Fulop, T., Jr. (2004) Age-associated alterations in the recruitment of signal-transduction proteins to lipid rafts in human T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 75, 373-81.
- Laude, A.J. and Prior, I.A. (2004) Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol* 21, 193-205.
- Lee, C.K. (2001) Vaccination against *Helicobacter pylori* in non-human primate models and humans. *Scand J Immunol* 53, 437-42.
- Lee, C.K., Weltzin, R., Thomas, W.D., Jr., Kleanthous, H., Ermak, T.H., Soman, G., Hill, J.E., Ackerman, S.K. and Monath, T.P. (1995) Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*. *J Infect Dis* 172, 161-72.
- LeMaout, J., Delassus, S., Dyall, R., Nikolic-Zugic, J., Kourilsky, P. and Weksler, M.E. (1997) Clonal expansions of B lymphocytes in old mice. *J Immunol* 159, 3866-74.
- Lencer, W.I., Constable, C., Moe, S., Jobling, M.G., Webb, H.M., Ruston, S., Madara, J.L., Hirst, T.R. and Holmes, R.K. (1995) Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J Cell Biol* 131, 951-62.
- Levine, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E. and Clements, M.L. (1983) New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev* 47, 510-50.
- Liang, H., Nishioka, Y., Reich, C.F., Pisetsky, D.S. and Lipsky, P.E. (1996) Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest* 98, 1119-29.
- Linton, P.J. and Dorshkind, K. (2004) Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5, 133-9.
- Looney, R.J., Falsey, A., Campbell, D., Torres, A., Kolassa, J., Brower, C., McCann, R., Menegus, M., McCormick, K., Frampton, M., Hall, W. and Abraham, G.N. (1999) Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin Immunol* 90, 213-9.
- Lu, Q., Ceddia, M.A., Price, E.A., Ye, S.M. and Woods, J.A. (1999) Chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytotoxicity in young and old mice. *Am J Physiol* 276, R482-9.
- Lycke, N., Tsuji, T. and Holmgren, J. (1992) The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur J Immunol* 22, 2277-81.

-M-

- Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (2000) A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288, 2222-6.
- Maletto, B., Ropolo, A., Moron, V. and Pistoresi-Palencia, M.C. (2002) CpG-DNA stimulates cellular and humoral immunity and promotes Th1 differentiation in aged BALB/c mice. *J Leukoc Biol* 72, 447-54.
- Maletto, B.A., Ropolo, A.S., Liscovsky, M.V., Alignani, D.O., Glocker, M. and Pistoresi-Palencia, M.C. (2005) CpG oligodeoxynucleotides functions as an effective adjuvant in aged BALB/c mice. *Clin Immunol* 117, 251-61.
- Manning, B.M., Enioutina, E.Y., Visic, D.M., Knudson, A.D. and Daynes, R.A. (2001) CpG DNA functions as an effective adjuvant for the induction of immune responses in aged mice. *Exp Gerontol* 37, 107-26.
- Martin, F. and Kearney, J.F. (2002) Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2, 323-35.
- McCluskie, M.J. and Davis, H.L. (1998) CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J Immunol* 161, 4463-6.
- McCluskie, M.J. and Davis, H.L. (2000) Oral, intrarectal and intranasal immunizations using CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Vaccine* 19, 413-22.
- McCluskie, M.J., Weeratna, R.D. and Davis, H.L. (2001a) The potential of oligodeoxynucleotides as mucosal and parenteral adjuvants. *Vaccine* 19, 2657-60.
- McCluskie, M.J., Weeratna, R.D., Payette, P.J. and Davis, H.L. (2001b) The use of CpG DNA as a mucosal vaccine adjuvant. *Curr Opin Investig Drugs* 2, 35-9.
- McHeyzer-Williams, L.J. and McHeyzer-Williams, M.G. (2005) Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 23, 487-513.
- McJhee, J.R., Lamm, M.E. and Strober, W. (1999) Mucosal immune responses: an overview. In Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienestock, J., and McJhee, J.R. (ed.), *Mucosal immunology*, 2nd ed Academic Press, New York, pp. 485-506.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9, 4-9.
- Mendez, S., Tabbara, K., Belkaid, Y., Bertholet, S., Verthelyi, D., Klinman, D., Seder, R.A. and Sacks, D.L. (2003) Coinjection with CpG-containing immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live

- vaccine against cutaneous Leishmaniasis but maintains its potency and durability. *Infect Immun* 71, 5121-9.
- Mestecky, J., Blumberg, R.S., Kiyono, H., McJhee, J.R., (2003) The Mucosal Immune System. In Paul, W.E. (ed.), *Fundamental Immunology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 965-1020.
- Miller, C. and Kelsoe, G. (1995) Ig VH hypermutation is absent in the germinal centers of aged mice. *J Immunol* 155, 3377-84.
- Mittler, J.N. and Lee, W.T. (2004a) Antigen-specific CD4 T cell clonal expansion and differentiation in the aged lymphoid microenvironment. I. The primary T cell response is unaffected. *Mech Ageing Dev* 125, 47-57.
- Mittler, J.N. and Lee, W.T. (2004b) Antigen-specific CD4 T cell clonal expansion and differentiation in the aged lymphoid microenvironment. II. The memory T cell response is diminished. *Mech Ageing Dev* 125, 59-68.
- Mocchegiani, E., Giacconi, R., Cipriano, C., Gasparini, N., Bernardini, G., Malavolta, M., Menegazzi, M., Cavalieri, E., Muzzioli, M., Ciampa, A.R. and Suzuki, H. (2004) The variations during the circadian cycle of liver CD1d-unrestricted NK1.1+TCR gamma/delta+ cells lead to successful ageing. Role of metallothionein/IL-6/gp130/PARP-1 interplay in very old mice. *Exp Gerontol* 39, 775-88.
- Mocchegiani, E. and Malavolta, M. (2004) NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell* 3, 177-84.
- Mocchegiani, E., Muzzioli, M., Giacconi, R., Cipriano, C., Gasparini, N., Franceschi, C., Gaetti, R., Cavalieri, E. and Suzuki, H. (2003) Metallothioneins/PARP-1/IL-6 interplay on natural killer cell activity in elderly: parallelism with nonagenarians and old infected humans. Effect of zinc supply. *Mech Ageing Dev* 124, 459-68.
- Moldoveanu, Z., Love-Homan, L., Huang, W.Q. and Krieg, A.M. (1998) CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine* 16, 1216-24.
- Montes, C.L., Maletto, B.A., Acosta Rodriguez, E.V., Gruppi, A. and Pistoiresi-Palencia, M.C. (2006) B cells from aged mice exhibit reduced apoptosis upon B-cell antigen receptor stimulation and differential ability to up-regulate survival signals. *Clin Exp Immunol* 143, 30-40.
- Morokata, T., Kato, T., Igarashi, O. and Nariuchi, H. (1995) Mechanism of enhanced antigen presentation by B cells activated with anti-mu plus interferon-gamma: role of B7-2 in the activation of naive and memory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 25, 1992-8.



- Moron, G., Maletto, B., Orsilles, M., Depiante-Depaoli, M. and Pistoiresi-Palencia, M.C. (2000) Age-related alterations in inflammatory response during experimental autoimmune prostatitis. *Mech Ageing Dev* 118, 71-85.
- Mostov, k., Kaetzel, C. (1999) Immunoglobulin Transport and the Polimeric Immunoglobulin Receptor. In Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienestock, J., and McJhee, J.R. (ed.), *Mucosal Immunology*, 2nd ed Academic Press, New York, pp. 181-211.
- Mowat, A., Weiner, HL., (1999) Oral Tolerance. In Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienestock, J., and McJhee, J.R. (ed.), *Mucosal Immunology*, 2nd ed Academic Press, New York, pp. 587-618.
- Mowat, A.M. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-41.
- Mufson, M.A. (1999) Pneumococcal Pneumonia. *Curr Infect Dis Rep* 1, 57-64.
- Murasko, D.M., Bernstein, E.D., Gardner, E.M., Gross, P., Munk, G., Dran, S. and Abrutyn, E. (2002) Role of humoral and cell-mediated immunity in protection from influenza disease after immunization of healthy elderly. *Exp Gerontol* 37, 427-39.
- Mutsch, M., Zhou, W., Rhodes, P., Bopp, M., Chen, R.T., Linder, T., Spyr, C. and Steffen, R. (2004) Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 350, 896-903.
- Myers, K.R., Beining, P., Betts, M., Snippe, H., Inman, J. and Golding, B. (1995) Monophosphoryl lipid A behaves as a T-cell-independent type 1 carrier for hapten-specific antibody responses in mice. *Infect Immun* 63, 168-74.

-N-

- Nataro, J.P., and Levine, M.M., (1999) Enteric Bacterial Vaccines: Salmonella, Shigella, Cholera, Escherichia coli. In Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienestock, J., and McJhee, J.R. (ed.), *Mucosal Immunology*, 2nd ed Acad Press, New York, pp. 851-865.
- Nel, A.E. and Slaughter, N. (2002) T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 109, 901-15.
- Nicoletti, C., Yang, X. and Cerny, J. (1993) Repertoire diversity of antibody response to bacterial antigens in aged mice. III. Phosphorylcholine antibody from young and aged mice differ in structure and protective activity against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 150, 543-9.

-O-

- Ogra, P.L., Faden, H., and Welliver R.C. (2001) Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. *Clinical Microbiological Reviews* 12, 430-445.
- O'Mahony, L., Holland, J., Jackson, J., Feighery, C., Hennessy, T.P. and Mealy, K. (1998) Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. *Clin Exp Immunol* 113, 213-9.

-P-

- Pawelec, G. (1999) Immunosenescence: impact in the young as well as the old? *Mech Ageing Dev* 108, 1-7.
- Pawelec, G., Akbar, A., Caruso, C., Effros, R., Grubeck-Loebenstein, B. and Wikby, A. (2004) Is immunosenescence infectious? *Trends Immunol* 25, 406-10.
- Pawelec, G., Hirokawa, K. and Fulop, T. (2001) Altered T cell signalling in ageing. *Mech Ageing Dev* 122, 1613-37.
- Pawelec, G., Sansom, D., Rehbein, A., Adibzadeh, M. and Beckman, I. (1996) Decreased proliferative capacity and increased susceptibility to activation-induced cell death in late-passage human CD4+ TCR2+ cultured T cell clones. *Exp Gerontol* 31, 655-68.
- Plackett, T.P., Boehmer, E.D., Faunce, D.E. and Kovacs, E.J. (2004) Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol* 76, 291-9.
- Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Gangappa, S., Engleman, C., Katz, J.M. and Sambhara, S. (2004) Impaired antigen-induced CD8+ T cell clonal expansion in aging is due to defects in antigen presenting cell function. *Cell Immunol* 229, 86-92.
- Powers, D.C. (1992) Immunological principles and emerging strategies of vaccination for the elderly. *J Am Geriatr Soc* 40, 81-94.
- Pyles, R.B., Higgins, D., Chalk, C., Zalar, A., Eiden, J., Brown, C., Van Nest, G. and Stanberry, L.R. (2002) Use of immunostimulatory sequence-containing oligonucleotides as topical therapy for genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol* 76, 11387-96.

-R-

- Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J. and Sambhara, S. (2002) Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* 169, 4697-701.
- Rudd, C.E. and Schneider, H. (2003) Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 3, 544-56.
- Ruh, M.F., Bi, Y., Cox, L., Berk, D., Howlett, A.C. and Bellone, C.J. (1998) Effect of environmental estrogens on IL-1beta promoter activity in a macrophage cell line. *Endocrine* 9, 207-11.

-S-

- S Sanderson, I.R., and Walker W.A. (1999) Mucosal Barrier: an overview. In Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienestock, J., and McJhee, J.R. (ed.), *Mucosal Immunology*, 2nd ed Academic Press, New York, pp. 5-17.
- Sandmand, M., Bruunsgaard, H., Kemp, K., Andersen-Ranberg, K., Pedersen, A.N., Skinhoj, P. and Pedersen, B.K. (2002) Is ageing associated with a shift in the balance between Type 1 and Type 2 cytokines in humans? *Clin Exp Immunol* 127, 107-14.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. and Herzog, V. (2000) Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol* 148, 1203-12.
- Schmucker, D.L., Daniels, C.K., Wang, R.K. and Smith, K. (1988) Mucosal immune response to cholera toxin in ageing rats. I. Antibody and antibody-containing cell response. *Immunology* 64, 691-5.
- Schmucker, D.L., Heyworth, M.F., Owen, R.L. and Daniels, C.K. (1996) Impact of aging on gastrointestinal mucosal immunity. *Dig Dis Sci* 41, 1183-93.
- Senda, S., Cheng, E. and Kawanishi, H. (1988) Aging-associated changes in murine intestinal immunoglobulin A and M secretions. *Scand J Immunol* 27, 157-64.
- Shearer, G.M. (1997) Th1/Th2 changes in aging. *Mech Ageing Dev* 94, 1-5.
- Sherwood, E.M., Blomberg, B.B., Xu, W., Warner, C.A. and Riley, R.L. (1998) Senescent BALB/c mice exhibit decreased expression of lambda5 surrogate light chains and reduced development within the pre-B cell compartment. *J Immunol* 161, 4472-5.
- Sherwood, E.M., Xu, W., King, A.M., Blomberg, B.B. and Riley, R.L. (2000) The reduced expression of surrogate light chains in B cell precursors from senescent BALB/c mice is associated with decreased E2A proteins. *Mech Ageing Dev* 118, 45-59.

- Sparwasser, T., Koch, E.S., Vabulas, R.M., Heeg, K., Lipford, G.B., Ellwart, J.W. and Wagner, H. (1998) Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 28, 2045-54.
- Sparwasser, T., Vabulas, R.M., Villmow, B., Lipford, G.B. and Wagner, H. (2000) Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur J Immunol* 30, 3591-7.
- Spaulding, C., Guo, W. and Effros, R.B. (1999) Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol* 34, 633-44.
- Stephan, R.P., Lill-Elghanian, D.A. and Witte, P.L. (1997) Development of B cells in aged mice: decline in the ability of pro-B cells to respond to IL-7 but not to other growth factors. *J Immunol* 158, 1598-609.
- Stephan, R.P., Sanders, V.M. and Witte, P.L. (1996) Stage-specific alterations in murine B lymphopoiesis with age. *Int Immunol* 8, 509-18.
- Swift, M.E., Burns, A.L., Gray, K.L. and DiPietro, L.A. (2001) Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol* 117, 1027-35.

-T-

- Taner, S.B., Onfelt, B., Pirinen, N.J., McCann, F.E., Magee, A.I. and Davis, D.M. (2004) Control of immune responses by trafficking cell surface proteins, vesicles and lipid rafts to and from the immunological synapse. *Traffic* 5, 651-61.
- Tasat, D.R., Mancuso, R., O'Connor, S. and Molinari, B. (2003) Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages. *Aging Cell* 2, 159-64.
- Taylor, L.D., Daniels, C.K. and Schmucker, D.L. (1992) Ageing compromises gastrointestinal mucosal immune response in the rhesus monkey. *Immunology* 75, 614-8.
- Temperton, N.J., Quenelle, D.C., Lawson, K.M., Zuckerman, J.N., Kern, E.R., Griffiths, P.D. and Emery, V.C. (2003) Enhancement of humoral immune responses to a human cytomegalovirus DNA vaccine: adjuvant effects of aluminum phosphate and CpG oligodeoxynucleotides. *J Med Virol* 70, 86-90.
- Thoreux, K., Owen, R.L. and Schmucker, D.L. (2000) Intestinal lymphocyte number, migration and antibody secretion in young and old rats. *Immunology* 101, 161-7.

Trzonkowski, P., Mysliwska, J., Szmit, E., Wieckiewicz, J., Lukaszuk, K., Brydak, L.B., Machala, M. and Mysliwski, A. (2003) Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence. *Vaccine* 21, 3826-36.

Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W.I. and Rapoport, T.A. (2001) Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* 104, 937-48.

Tumpey, T.M., Renshaw, M., Clements, J.D. and Katz, J.M. (2001) Mucosal delivery of inactivated influenza vaccine induces B-cell-dependent heterosubtypic cross-protection against lethal influenza A H5N1 virus infection. *J Virol* 75, 5141-50.

-U-

Uyemura, K., Castle, S.C. and Makinodan, T. (2002) The frail elderly: role of dendritic cells in the susceptibility of infection. *Mech Ageing Dev* 123, 955-62.

-V-

Verthelyi, D., Gursel, M., Kenney, R.T., Lifson, J.D., Liu, S., Mican, J. and Klinman, D.M. (2003) CpG oligodeoxynucleotides protect normal and SIV-infected macaques from *Leishmania* infection. *J Immunol* 170, 4717-23.

Villari, P., Manzoli, L. and Boccia, A. (2004) Methodological quality of studies and patient age as major sources of variation in efficacy estimates of influenza vaccination in

-W-

Walker, P.S., Scharton-Kersten, T., Krieg, A.M., Love-Homan, L., Rowton, E.D., Udey, M.C. and Vogel, J.C. (1999) Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6970-5.

Watanabe, N., Ikuta, K., Fagarasan, S., Yazumi, S., Chiba, T. and Honjo, T. (2000) Migration and differentiation of autoreactive B-1 cells induced by activated

gamma/delta T cells in antierythrocyte immunoglobulin transgenic mice. *J Exp Med* 192, 1577-86.

Webster, R.G. (2000) Immunity to influenza in the elderly. *Vaccine* 18, 1686-9.

Weeratna, R.D., McCluskie, M.J., Xu, Y. and Davis, H.L. (2000) CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* 18, 1755-62.

Weltzin, R., Kleanthous, H., Guirakhoo, F., Monath, T.P. and Lee, C.K. (1997) Novel intranasal immunization techniques for antibody induction and protection of mice against gastric *Helicobacter felis* infection. *Vaccine* 15, 370-6.

Wild, J., Grusby, M.J., Schirmbeck, R. and Reimann, J. (1999) Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J Immunol* 163, 1880-7.

Wu, H.Y., Nahm, M.H., Guo, Y., Russell, M.W. and Briles, D.E. (1997) Intranasal immunization of mice with PspA (pneumococcal surface protein A) can prevent intranasal carriage, pulmonary infection, and sepsis with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 175, 839-46.

-X-

Xu-Amano, J., Jackson, R.J., Fujihashi, K., Kiyono, H., Staats, H.F. and McGhee, J.R. (1994) Helper Th1 and Th2 cell responses following mucosal or systemic immunization with cholera toxin. *Vaccine* 12, 903-11.

Xu-Amano, J., Kiyono, H., Jackson, R.J., Staats, H.F., Fujihashi, K., Burrows, P.D., Elson, C.O., Pillai, S. and McGhee, J.R. (1993) Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J Exp Med* 178, 1309-20.

-Y-

Yamamoto, M., Kiyono, H., Kweon, M.N., Yamamoto, S., Fujihashi, K., Kurazono, H., Imaoka, K., Bluethmann, H., Takahashi, I., Takeda, Y., Azuma, M. and McGhee, J.R. (2000) Enterotoxin adjuvants have direct effects on T cells and antigen-presenting cells that result in either interleukin-4-dependent or -independent immune responses. *J Infect Dis* 182, 180-90.

Yamamoto, M., Vancott, J.L., Okahashi, N., Marinaro, M., Kiyono, H., Fujihashi, K., Jackson, R.J., Chatfield, S.N., Bluethmann, H. and McGhee, J.R. (1996) The

role of Th1 and Th2 cells for mucosal IgA responses. *Ann N Y Acad Sci* 778, 64-71.

Yamamoto, T., Yamamoto, S., Kataoka, T. and Tokunaga, T. (1994) Lipofection of synthetic oligodeoxyribonucleotide having a palindromic sequence of AACGTT to murine splenocytes enhances interferon production and natural killer activity. *Microbiol Immunol* 38, 831-6.

Yi, A.K., Chang, M., Peckham, D.W., Krieg, A.M. and Ashman, R.F. (1998) CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol* 160, 5898-906.

Yi, A.K., Hornbeck, P., Lafrenz, D.E. and Krieg, A.M. (1996) CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL. *J Immunol* 157, 4918-25.

Yoon, P., Keylock, K.T., Hartman, M.E., Freund, G.G. and Woods, J.A. (2004) Macrophage hypo-responsiveness to interferon-gamma in aged mice is associated with impaired signaling through Jak-STAT. *Mech Ageing Dev* 125, 137-43.

-Z-

Z Zhu, X., Kim, E., Boman, A.L., Hodel, A., Cieplak, W. and Kahn, R.A. (2001) ARF binds the C-terminal region of the Escherichia coli heat-labile toxin (LTA1) and competes for the binding of LTA2. *Biochemistry* 40, 4560-8.

Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G.B., Rocken, M., Wagner, H. and Heeg, K. (1998) CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 160, 3627-30.

Publicaciones

Como producto de este trabajo de tesis se realizaron las siguientes publicaciones:

Alignani D, Maletto B, Liscovsky M, Ropolo A, Moron G, Pistoiresi-Palencia MC. (2005) Orally administered OVA/CpG-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice. *J Leukoc Biol.* 77, 898-905

Maletto BA, Ropolo AS, Liscovsky MV, Alignani DO, Glocker M, Pistoiresi-Palencia MC. (2005) CpG oligodeoxynucleotides functions as an effective adjuvant in aged BALB/c mice. *Clin Immunol.* 117, 251-61.