Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Respuesta inmune al Streptococcus pneumoniae en pacientes con Asma y pacientes con deficiencia específica de respuesta a antígenos polisacáridos

Otero, Constanza

2013-04-08

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Otero, Constanza. (2013-04-08). Respuesta inmune al Streptococcus pneumoniae en pacientes con Asma y pacientes con deficiencia específica de respuesta a antígenos polisacáridos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Otero, Constanza. "Respuesta inmune al Streptococcus pneumoniae en pacientes con Asma y pacientes con deficiencia específica de respuesta a antígenos polisacáridos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-04-08.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

"Respuesta inmune al *Streptococcus pneumoniae* en pacientes con Asma y pacientes con deficiencia específica de respuesta a antígenos polisacáridos"

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Constanza Otero

Directora de Tesis: Dra. Susana Goldstein de Fink
Consejera de Estudios: Dra. Verónica García

Laboratorio de Respuesta Inmune a Infecciones Humanas
Instituto de Medicina Experimental (IMEX) – CONICET
Academia Nacional de Medicina

Buenos Aires, 2013

RESUMEN

Respuesta Inmune al *Streptococcus pneumoniae* en Pacientes con Asma Y Pacientes con Deficiencia Específica de Respuesta a Antígenos Polisacáridos

Durante años se ha considerado que la defensa inmune frente al *Streptococcus (S.) pneumoniae* (Spn) depende de anticuerpos anticapsulares, que protegen frente a la infección invasiva y a la colonización por este microorganismo. Sin embargo, la inmunidad adaptativa puede ser importante para generar memoria celular frente a la bacteria. Algunas patologías de la infancia como el asma atópico y la deficiencia específica de anticuerpos frente a antígenos polisacáridos (SPAD), parecen predisponer a un riesgo mayor de infección por Spn. Estudiamos la respuesta inmune al Spn en estos pacientes y en individuos sanos (S) en edades pediátricas.

En los pacientes asmáticos (A) se observó una tendencia a una menor expresión de CD69 en linfocitos T (LT) convencionales y LTγδ frente al estímulo con Spn. Los LT CD8+ mostraron un aumento en la expresión de CD25 solo frente al estímulo con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) en las células de los A y no en los S. Para evaluar la respuesta Th1 se midieron los niveles de IFN-γ frente a Spn y a Mtb, encontrándose muy elevados en los A.

Al estudiar los pacientes SPAD (P), encontramos varias diferencias en las subpoblaciones de monocitos (Mo) y LT con respecto a los S. Observamos que los Mo CD14++CD16+, se encuentran en proporciones alteradas con respecto a los S a distintas edades, lo que podría relacionarse con una menor capacidad de respuesta T, dado que frente al neumococo los Mo modulan la diferenciación de LT hacia los perfiles Th1 y Th17. La expresión temprana de CD69 en los LT previene la diferenciación hacia el perfil Th17. En los P, los LT CD69+ y LTCD8+CD25+ se vieron disminuidos con respecto a los S, aún con Mtb, evidenciando alteraciones en su capacidad de respuesta celular.

Creemos que nuestro reporte de alteraciones en los P puede ser útil en la búsqueda de otros métodos diagnósticos. Consideramos que deben evaluarse en los Mo las vías de señalización necesarias para activar a las células presentadoras de antígeno frente al neumococo, encargadas de modular la respuesta T en condiciones normales. Esto podría contribuir a identificar la base molecular de la inmunodeficiencia SPAD, aún desconocida.

Palabras claves: *Streptococcus pneumoniae*, linfocitos T, Asma, deficiencia específica de anticuerpos frente a antígenos polisacáridos (SPAD), Monocitos.

SUMMARY

Immune response to *Streptococcus pneumoniae* in patients with asthma and patients with specific polysaccharide antibody deficiency

The immune defense against *Streptococcus (S.) pneumoniae* (Spn) was considered dependent on capsular antibodies that provide protection against invasive infection and colonization by this microorganism. However, adaptive immunity may be important in the generation of cellular memory against this pathogen. Some childhood diseases like atopic asthma and specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD) seem to be associated to a higher risk of infection with Spn. We studied the immune response to Spn in these patients and in healthy children (H).

In asthmatic patients (A) we observed a reduced expression of CD69 in conventional T lymphocytes (T cells) and γδ T cells with Spn. The CD8 + T cells from A showed an increased expression of CD25 only with *Mycobacterium tuberculosis (*Mtb), when compared to healthy individuals. As a measure of Th1 response, we evaluated the IFN-γ production after stimulating cells from A and H with the bacterial antigens. We found high levels of this cytokine in both groups.

When we studied SPAD patients (S), we found several differences in monocyte (Mo) subpopulations and in T cells, which had never before been described. We observed that in S the proportion of CD16+CD14++ Mo at different ages was altered when compared to healthy individuals. This could be correlated to a decreased T cell responsiveness, since it was described that Mo modulate T cell response towards a Th1 or a Th17 profile, in the defense against Spn. Early up regulation of CD69 in T cells prevents them from generating a Th17 response. In S we observed that the expression of both CD69 and CD25 was reduced when compared to H. We also found lower percentages of CD8+ activated T cells, even with Mtb, suggesting alterations in the T cell response capacity of S.

We believe that the alterations in leukocyte populations we report here can be useful to find new diagnostic methods for S. The necessary signaling pathways activate after Spn recognition in Mo - that will result in a correct antigen presentation to T cells - must be studied in normal conditions. This could also contribute to identify the molecular basis of the SPAD immunodeficiency, still unknown.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, T lymphocytes, Asthma, specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD), Monocytes.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Susana Goldstein de Fink y a mi co-directora Marta Finiasz, por haberme acompañado durante mis cinco años de doctorado en el desarrollo de esta tesis. Estoy eternamente agradecida por la oportunidad que me brindaron.

A Luciana, Barbi, Merceditas y Juan por estar en la mesada y sobre todo en la vida, tanto en los buenos como en los malos momentos. Con cada uno de ustedes he compartido cosas que jamás voy a olvidar. Los adoro.

A Evi (una gran editora), Pau, Pablo y Vero por haberme ayudado en distintas instancias de este proceso y con el desarrollo de la tesis.

A Gabo, Vicky, Daiana, Carmen, Kao, Laurita, Romi, Ana, Pilar, Andy y Anita, por haber compartido la mesada, cursos, tardes de mate y congresos.

A Martín, Maricarmen, Silvia, Mercedes por sus consejos y su apoyo constante. A Nora, Martita y Norma por ayudarme con el citómetro y tenerme paciencia con la compensación de los tubos (que nunca pude dominar).

A Evelia por su luz, su calidez, su cariño y su apoyo incondicional, pero fundamentalmente por su trabajo con en el preparado de nuestro material de trabajo. Sin ella el laboratorio no podría funcionar.

A Liliana Bezrodnik, Rubén D. Paz, Ignacio Uriarte, Damacia Diaz y a toda la gente de Inmunología del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, por haberme proporcionado las muestras para trabajar y por compartir conmigo no solo su amplio conocimiento y experiencia, sino que también su calidez y amabilidad.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que me han brindado lo posible, lo imposible y más. A mi hermana que es un ser maravilloso. Sus ejemplos, sus valores, su amor incondicional, apoyo y contención han sido fundamentales en mi vida. Los amo.

A mi abuela Lidia por estar siempre y llenarme muchas tardes de buñuelos de banana, cafés con leche y cumpleaños enteros de pizza casera y torta de chocolate. Todo indispensable. Te amo abu.

A Barbi, Flor, Marina y Any. Mi vida no sería la misma sin ustedes. Sobre todo porque dudo que me hubiera podido recibir de Licenciada sin su ayuda y su compañía. Siempre serán mis amigas antes que mis compañeras de la facultad. Las adoro, son mis ñoñas preferidas.

A Leo Berninsone por bautizarnos las BANDANA, apodo por el cuál nos han inmortalizado en exactas. A Daiana y Celeste, quienes también me acompañaron mucho en momentos difíciles y con quienes he compartido momentos maravillosos. Las quiero mucho. A Leo Zapata y a Damián Pinasco por tantas risas compartidas.

A Sergio, Ale, Meni, Lucas, Nico, Peje y Cepi. Por haberme dado su amistad durante estos años y regalarme momentos inolvidables.

A mis amigas, hermanas y cómplices en todo: Mercedes, Agustina, Victoria, Mariana y Costi. Las dejo para lo último porque realmente son lo mejor que me regaló la vida. A veces pienso en TODO lo que hemos compartido juntas (y en todo lo que nos falta compartir aún) y no puedo creerlo. Las amo.

A mi Familia, en especial a mis padres y a mi hermana.

A mi Abuelo Héctor que me enseñaba las constelaciones y me leía *Cosmos* antes de dormir.

"The nitrogen in our DNA, the calcium in our teeth, the iron in our blood, the carbon in our apple pies were made in the interiors of collapsing stars. We are made of starstuff."
***Cosmos*, Carl Sagan.**

ABREVIATURAS

APC	Célula Presentadora de Antígeno o CPA
BAL	Lavado Bronco-Alveolar
BCR	Receptor de Células B
BZM	Linfocitos B de la Zona Marginal de Bazo
CD	Células Dendríticas
Cks	Citoquinas
CMNP	Células Mononucleares Periféricas
EIN	Enfermedad Neumocóccica Invasiva
FC	Región Constante de las Inmunoglobulinas o Fragmento Fc
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
Foxp3	Factor de Transcripción *Forkhead Box* P3
GGev	Gamma Globulina Endovenosa
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de los Granulocitos - Macrófagos
IDP	Inmunodeficiencia Primaria
IFN-γ	Interferón Gamma
Igs	Inmunoglobulinas
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-1	Interleuquina 1
IL-10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
IL-13	Interleuquina 13
IL-17	Interleuquina 17
IL-2	Interleuquina 2
IL-21	Interleuquina 21
IL-23	Interleuquina 23
IL-4	Interleuquina 4

IL-5	Interleuquina 5
IL-6	Interleuquina 6
IL-9	Interleuquina 9
iTreg	Células T regulatorias Inducibles o TR1
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
LT CD4+	Linfocito T helper, que expresa CD4 en su membrana
LT CD8+	Linfocito T citotóxico, que expresa CD8 en su membrana
LPS	Lipopolisacárido
MΦ	Macrófago
mAb	Anticuerpo Monoclonal
MAPK	*Mitogen – activated –protein –kinases*
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MHC I	Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I
MHC II	Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II
mIg	Ig de Superficie
Mo	Monocitos
Mtb	*Mycobacterium tuberculosis* H37-RV inactivado por calor
NCRs	Receptores de Citotoxicidad Natural
NK	Células *Natural Killer*
NKT	Células *Natural Killer* T
nTreg	Células T regulatorias Naturales
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Solución Buffer Fosfato Salino
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PGE2	Prostaglandinas E2
Qks	Quemoquinas
SPAD	Specific Polysaccharide Antibody Deficiency
Spn	*Streptococcus pneumoniae* ATCC49619 inactivado por calor
Spn14	*Streptococcus pneumoniae* cepa 14 inactivado por calor

Spn3	*Streptococcus pneumoniae* cepa 3 inactivado por calor
T-dependiente	Timo dependiente
TCR	Receptor de Células T
TGF-β	*Transforming Growth Factor Beta*
Th	Linfocito T colaborador o T *helper*
Th1	Linfocito T *helper* 1
Th17	Linfocito T *helper* 17
Th2	Linfocito T *helper* 2
Th9	Linfocito T *helper* 9
TLRs	*Toll Like Receptors*
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor Alpha*
Treg	Linfocitos T regulatorios

ÍNDICE

RESUMEN 1
SUMMARY 2
AGRADECIMIENTOS 3
ABREVIATURAS 6
1. BREVE INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS 11
2. INTRODUCCIÓN 16
2.1. La neumonía y la bacteria Streptococcus pneumoniae 16
2.1.1. Aspectos Generales 16
2.1.2. Epidemiología de la Enfermedad Invasiva por Neumococo en Argentina ... 16
2.1.3. Vacunas contra el *S. pneumoniae* 17
2.2. El Sistema Inmune y la Infección por S. pneumoniae 19
2.2.1. Respuesta de Fase Aguda y Activación de Complemento 19
2.2.2. Respuesta de Anticuerpos Naturales en Contra de antígenos Polisacáridos 19
2.2.3. Respuesta de Anticuerpos en Contra de Proteínas de la Superficie Bacteriana 21
2.2.4 Respuesta T CD4+ Independiente de Anticuerpos 23
2.3. Patologías con Mayor Predisposición a la Infección por Neumococos 25
2.3.1. Asma atópico 25
2.3.2. Deficiencia de Anticuerpos Específicos para Antígenos Polisacáridos (SPAD) 30
2.4. Otras Moléculas de Relevancia Inmunológica 34
2.4.1. CD25 34
2.4.2. CD69 34
2.4.3. CD40 y CD40L 35
2.4.4. CD127 (IL-7R), CD27, CD45RA y CD45RO 35
3. MATERIALES Y MÉTODOS 36
3.1. Individuos Estudiados 36
3.2. Antígenos 38
3.3. Purificación de células 38
3.4. Determinaciones en sangre Entera 39
3.5. Determinaciones en Células Mononucleares Periféricas 39
3.6. Cultivos Celulares 40
3.7. Evaluación de Citoquinas Intracitoplasmáticas 41
3.8. Evaluación de Citoquinas en Sobrenadantes de cultivo y en Suero 42

4. RESULTADOS 43
4.1. ESTUDIOS EN PACIENTES CON ASMA ATÓPICO 43
4.1.1. Caracterización de Distintos Tipos Celulares del Sistema Inmune 43
4.1.2. Activación de Linfocitos T en Presencia de Antígenos Bacterianos 47
4.1.3. Capacidad de Producción de Citoquinas 53
4.1.4. Producción de Citoquinas en Respuesta a los Antígenos Bacterianos 54
4.2. ESTUDIOS EN PACIENTES SPAD 56
4.2.1. Caracterización de Distintos Tipos Celulares del Sistema Inmune 57
4.2.2. Evaluación de la Respuesta Celular Efectora 66
4.2.3. Activación de Linfocitos T en Presencia de Antígenos Bacterianos 74
5. DISCUSIÓN 78
5.1. Pacientes Asmáticos 78
5.2. Pacientes SPAD 84
5.3. Conclusión General y Perspectivas 91
6. BIBLIOGRAFÍA 94

1. BREVE INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

En los países en vías de desarrollo, las infecciones invasivas por *S. pneumoniae* constituyen un serio problema de salud pública por su alta tasa de mortalidad, siendo una causa prevalente de neumonía en los niños. En la Argentina esta bacteria es característica de las infecciones respiratorias. También es el patógeno más frecuentemente aislado del 50% de las neumonías bacterianas y de las infecciones focalizadas como la otitis media aguda y la sinusitis, siendo el más asociado a las infecciones invasivas en la infancia [1]. Los desafíos que deben afrontarse para su control son múltiples y están determinados por los diversos tipos capsulares, su diferente prevalencia según zonas geográficas, grupos etarios y por las variaciones temporales en los serotipos causantes de la enfermedad [2]. Pero otro aspecto importante a tener en cuenta involucra conocer a fondo cuál es la respuesta inmunológica dependiente de la edad, requerida para controlar la infección y estimular la memoria inmunológica necesaria para prevenir la re-infección por este patógeno. Este conocimiento podría colaborar eventualmente a producir una nueva vacuna que fuera eficaz en la protección frente al *S. pneumoniae*.

Al tratarse de una bacteria extracelular, durante años se ha considerado que la defensa inmune fundamental en contra del neumococo es a través de los anticuerpos anti-polisacáridos, que reconocen la cápsula de la bacteria y previenen la colonización, la infección de mucosas y, así, la enfermedad. Estos anticuerpos son producidos naturalmente por linfocitos B (LB) que no requieren de la colaboración de los linfocitos T (LT) para activarse y esta forma de defensa se desarrolla en las personas a partir de los dos años de edad. En humanos, estos anticuerpos anti-capsulares, inducidos también por la vacuna polisacarídica, protegen frente a la infección invasiva y a la colonización por parte de este microorganismo [3,4]. Sin embargo, en niños mayores de dos años, no inmunizados, la inmunidad adquirida naturalmente - asociada a una reducción progresiva de la tasa de enfermedad invasiva y portación nasofaríngea - no parece deberse solo a la presencia de anticuerpos anti-polisacáridos. La protección frente a esta bacteria puede ocurrir incluso a edades más tempranas, antes del desarrollo de estos anticuerpos en niveles séricos medibles [5].

Esto da cuenta de que la inmunidad adaptativa puede estar jugando un rol importante en la protección frente a este patógeno. Existen evidencias de que la inmunidad T dependiente cumple una función fundamental en la generación de memoria protectiva frente a la bacteria [6,7].

Algunas patologías de la infancia parecen predisponer a un riesgo mayor de infección por *S. pneumoniae*. Entre ellas, se encuentran el asma atópico y algunas inmunodeficiencias primarias. Los niños que a edades tempranas presentan signos de asma y atopía tienen menores concentraciones de inmunoglobulina G1 (IgG1) bacterio-específica con respecto a la población general. Lo mismo ocurre con los niños que son susceptibles a desarrollar exacerbación asmática frente a infecciones virales [8]. En este contexto, concentraciones reducidas de IgG1 sugieren una mayor susceptibilidad a contraer infecciones bacterianas transmucosales y pueden denotar, además, deficiencias subyacentes en cuanto a los mecanismos de inmunovigilancia. Teniendo esto en cuenta es de importancia destacar que varios reportes sugieren que en los individuos asmáticos existe una susceptibilidad aumentada a contraer infecciones invasivas pneumocóccicas [9].

Por otro lado, inmunodeficiencias primarias como la Agammaglobulinemia, la Inmunodeficiencia Común Variable o deficiencias selectivas de anticuerpos - en particular, aquellas que incluyen una deficiencia de la subclase de inmunoglobulinas G2 (IgG2) - se caracterizan por predisponer a los individuos que las padecen, a infecciones con microorganismos recubiertos de antígenos polisacáridos, como los neumococos [10]. Existe un grupo de pacientes inmunodeficientes que presenta una respuesta de anticuerpos pobre frente a antígenos polisacáridos, aunque sus niveles de inmunoglobulinas (Igs) de clase G (IgG) son normales y que, además, parecen ser capaces de responder normalmente frente a antígenos proteicos. Este tipo de disfunción inmunológica se ha definido como deficiencia específica de anticuerpos contra antígenos polisacáridos y a estos pacientes se los denomina SPAD, por sus siglas en inglés (**S**pecific **P**olysaccharide **A**ntibodies **D**eficiency) [11].

Así como los niños menores de dos años de edad y los ancianos, los individuos que presentan patologías asociadas a una mayor probabilidad de infección por

neumococo, se beneficiarían ampliamente con el desarrollo de vacunas y alternativas a los tratamientos existentes para esta bacteria. Por ello, consideramos que resulta de importancia sanitaria conocer qué mecanismos del sistema inmune celular - necesarios para generar una memoria duradera frente a la infección por el *S. pneumoniae* - podrían verse afectados en estos individuos. De esta manera se busca realizar un aporte que contribuya a la elaboración de vacunas nuevas, el diseño de tratamientos adecuados para cada individuo y, en el caso de los pacientes SPAD, nuevos marcadores de diagnóstico.

Teniendo en cuenta esta información, se decidió estudiar y caracterizar algunos aspectos de la respuesta inmune frente al *S. pneumoniae*, utilizando como modelos de estudio el *asma atópico*, la *inmunodeficiencia SPAD* e individuos sanos; todos en edades pediátricas. Para ello se realizaron experimentos que permitieron evaluar parámetros tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. Inicialmente se evaluaron pacientes asmáticos en períodos de estabilidad y en momentos de exacerbación y en una segunda etapa, se estudiaron pacientes SPAD, separándolos en dos grupos correspondientes a dos rangos de edad.

Las **hipótesis de trabajo** planteadas fueron las siguientes:

- En los pacientes con asma atópico existirían diferencias en la respuesta inmune en momentos de estabilidad y de exacerbación asmática, respecto de los individuos sanos, que darían lugar a una respuesta deficiente frente a la infección por *S. pneumoniae*, lo que se manifestaría desde la clínica, como una susceptibilidad a sufrir con mayor frecuencia este tipo de infecciones.

- Los pacientes SPAD, además de la imposibilidad de producir anticuerpos específicos a antígenos polisacáridos, presentarían alteraciones, tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa (que podrían estar asociadas a la deficiencia de anticuerpos o no), respecto de los individuos sanos. Esto podría manifestarse como deficiencias en cuanto a la activación y maduración de diversos tipos celulares, involucrados en la respuesta inmune. Estas alteraciones favorecerían una mayor

- frecuencia de infección por *S. pneumoniae* y podrían servir como indicadores útiles para complementar el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad.

Como **objetivo general** de esta tesis se plantea estudiar la respuesta inmune de pacientes pediátricos de mayor riesgo de infección por *S. pneumoniae*, evaluando factores solubles en suero y células de sangre periférica. En particular, estudiar distintas subpoblaciones linfocitarias efectoras y regulatorias y su comportamiento frente al estímulo con antígenos bacterianos.

En consecuencia, los **objetivos específicos** fueron:

Pacientes con Asma atópico

A) Determinar los porcentajes y valores absolutos de leucocitos basófilos, eosinófilos y LB productores de IgE (LB IgE+), durante la crisis asmática y en períodos de estabilidad, así como en individuos sanos.

B) Caracterizar poblaciones de LT en las células mononucleares periféricas (CMNP) involucradas en la respuesta inmune celular, evaluando el porcentaje de poblaciones linfocitarias consideradas relevantes en la fisiopatogenia de enfermedades alérgicas y de enfermedades infecciosas.

C) Evaluar si existen diferencias en la activación T, estudiando *in vitro* la expresión de marcadores de activación en las CMNP en respuesta a la estimulación con *S. pneumoniae.* Estudiar, a su vez, la producción de Citoquinas (Cks) características de distintos perfiles efectores T helper (Th) en los sobrenadantes obtenidos de cultivos celulares.

D) Evaluar la capacidad de producción de Cks el día de la toma de muestra, midiendo la producción de las mismas frente a un estímulo inespecífico en pacientes asmáticos en períodos de estabilidad, momentos de exacerbación y en individuos sanos. También evaluar la producción de Cks en sueros de pacientes e individuos sanos.

Pacientes SPAD

A) Evaluar los porcentajes de las distintas subpoblaciones de monocitos (Mo) presentes en sangre periférica. Estudiar su capacidad de producción de Cks *in vitro,* en respuesta a antígenos del neumococo.

B) Determinar los porcentajes de LT efectores, LT de memoria y las distintas subpoblaciones de LT relevantes en la respuesta frente al neumococo. Evaluar también la funcionalidad celular mediante la capacidad de producción de Cks de los distintos perfiles Th.

C) Estudiar las células Natural Killer (NK) y su funcionalidad celular a través de la capacidad de producción de IFN-γ en cultivo.

D) Evaluar la respuesta antígeno-específica. Estudiar la expresión de moléculas de activación en LT a distintos tiempos en respuesta a la estimulación con distintas cepas de *S. pneumoniae*. Analizar la frecuencia de las distintas poblaciones T efectoras relevantes para la respuesta frente al *S. pneumoniae*, en células purificadas y estimuladas con antígenos bacterianos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La neumonía y la bacteria *Streptococcus pneumoniae*

2.1.1. Aspectos Generales

La neumonía puede producirse a raíz de infecciones tanto virales como bacterianas, siendo las últimas ocasionadas con mayor frecuencia por dos microorganismos: la bacteria Gram-positiva *S. pneumoniae* y la bacteria Gram-negativa *Haemophilus influenzae*. Se estima que la enfermedad neumocócica causa anualmente 1,3 millones de casos de otitis media aguda, 327 mil casos de neumonía, 1.229 casos de sepsis y 4.000 casos de meningitis en niños menores de cinco años en Latinoamérica [12]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaba, en el año 2000, que el 20% de los fallecimientos en menores de cinco años eran causados por infecciones respiratorias agudas: el 90% de éstas eran neumonías agudas adquiridas de la comunidad de las cuales en más del 50% el agente causante era el neumococo [12]. Esta bacteria es comensal de la flora nasofaríngea, sin embargo, es capaz de convertirse en patógena por su capacidad de diseminarse desde el sitio en donde es "portado" hacia el sitio donde desatará la infección. De hecho, una tasa elevada de colonización nasofaríngea es uno de los factores de predisposición principales para el desarrollo de la enfermedad invasiva neumocócica (EIN) [13].

2.1.2. Epidemiología de la Enfermedad Invasiva por Neumococo en Argentina

El *S. pneumoniae* presenta una diversidad de serotipos que varía según la región del mundo que se analice. Se conocen más de 90 serotipos y solo entre ocho y doce de ellos son responsables de la mayoría de los casos de las neumonías bacterianas. Estos serotipos específicos varían entre adultos y niños, y entre sitios geográficos como ya se ha mencionado [14]. El abuso de terapias antibióticas ha colaborado a la aparición creciente de variantes resistentes a los mismos, en

particular a la penicilina. Hace casi veinte años, se formó el grupo de Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Bacterianos Responsables de Neumonía y Meningitis (SIREVA II). Se trata de un programa regional de vigilancia creado en 1993 y coordinado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), llevado a la práctica en varios países latinoamericanos, incluida la Argentina. La finalidad de los estudios derivados de este proyecto, es determinar la distribución de las cepas de *S. pneumoniae* que causan la enfermedad de forma invasiva (sobre todo en niños), evaluar la cobertura de las vacunas en uso y estudiar la capacidad de resistencia a antibióticos [15]. La distribución por serotipos aislados en Argentina en el año 2009, según los datos del Estudio SIREVA de la OPS, sobre 296 aislamientos, fue: 14 (21,3%), 1 (17,6%), 5 (9,1%), 3 (5,1%), 7F (4,4%), 19A (4,4%), 6B (4,1%), 9V (4,1%), 18C (3,4%), 19F (3,0%) y 23F (2,0%) [12]. Este intento de identificar la combinación de cepas específicas que circulan en nuestra población, podría resultar en un avance en el desarrollo de una nueva vacuna a nivel local que pueda utilizarse en niños menores de dos años. Asimismo, este tipo de estudios permitiría generar nuevas estrategias terapéuticas para combatir las infecciones pneumocóccicas invasivas [16].

El Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles (ProNaCei), siguiendo las recomendaciones de la Comisión Nacional de Inmunizaciones (CONAIN) de septiembre de 2009, consideró la introducción al calendario nacional de una vacuna conjugada contra neumococo que tuviera una amplia cobertura contra los serotipos circulantes en Argentina y que contenga al menos los serotipos 1, 5 y 14, con el propósito de disminuir la morbilidad y la mortalidad asociada a la EIN, lo que se efectivizó a partir del año 2011 [12].

2.1.3. Vacunas contra el *S. pneumoniae*

A pesar del éxito parcial que han tenido las vacunas polisacarídicas como la *Pneumovax23* (Merck) y las vacunas conjugadas (polisacáridos – proteína) como la *Prevenar13®* (Pfizer), no ha sido posible conseguir que protejan ante la mayoría de los serotipos de importancia sanitaria [17]. Aún así, se creyó que si se lograba generar protección en contra de suficientes serotipos con vacunas conjugadas de nueva generación, se lograría controlar la incidencia de infección por neumococo

significativamente, a nivel mundial [18]. Con el tiempo esto no funcionó, dejando de manifiesto que era necesario desarrollar nuevas estrategias de vacunación frente a esta bacteria. En este sentido, se han propuesto diversos antígenos proteicos alternativos como candidatos para una vacuna; entre ellos la pneumolisina, que es un antígeno característico de la especie [19], dado su potencial para inducir protección contra la mayoría de los serotipos del neumococo. El uso de antígenos proteicos tiene como beneficio agregado un menor costo de producción lo que facilitaría su aplicación, sobre todo en países en vías de desarrollo. Además, al ser proteínas comunes a todos los serotipos, este tipo de antígeno aportaría mayor inmunogenicidad y cobertura que la obtenida a través de antígenos polisacáridos, sobre todo en niños menores a dos años y en ancianos [19,20].

Debe considerarse que estas estrategias lo que buscan es estimular la inmunidad humoral, que es importante en el control de la infección invasiva y la colonización, pero ninguna tiene en cuenta el componente de la inmunidad celular que sería importante para controlar la colonización y posiblemente la enfermedad en mucosas[18]. Lo cierto es que aún no se logra una forma de vacunación lo suficientemente abarcativa y efectiva para controlar esta enfermedad a largo plazo y la obtención de la misma es de importancia sanitaria a nivel local y mundial.

2.2. El Sistema Inmune y la Infección por *S. pneumoniae*

A grandes rasgos, la defensa en contra del *S. pneumoniae* involucra: una respuesta de fase aguda y activación de complemento; una respuesta de anticuerpos naturales en contra de antígenos polisacáridos; una respuesta tardía, específica, de anticuerpos en contra de proteínas de la superficie; y una respuesta T CD4+, independiente de anticuerpos, capaz de dar memoria.

2.2.1. Respuesta de Fase Aguda y Activación de Complemento

El sistema de complemento comprende más de treinta proteínas séricas y de membrana que, al activarse, actúan como factores quimiotácticos, opsoninas y agentes bactericidas. Existen tres vías de activación del complemento. La vía clásica es activada cuando los anticuerpos reconocen a su antígeno u a otros factores inmunes, como las proteínas de fase aguda. La vía alterna se amplifica sobre superficies foráneas ante la ausencia de inhibidores que están presentes en las células del hospedero. Y la vía de las lectinas, se activa por reconocimiento de carbohidratos en superficies microbianas, a través de la lectina de unión a manosa[13]. Los pacientes genéticamente deficientes para el factor de complemento C3, el componente común a todas las vías de activación del complemento, sufren de infecciones recurrentes por neumococos y otras bacterias encapsuladas. Experimentos en ratones sugieren que la vía clásica es dominante en cuanto a la defensa al neumococo [21] y que los anticuerpos naturales y las proteínas de fase aguda (como el componente amiloide P sérico y la proteína C reactiva) son importantes en mediar la activación de la misma [22,23]. En estos experimentos también se observó que la vía alterna contribuye a la protección frente a este patógeno, pero en menor medida que la vía clásica.

2.2.2. Respuesta de Anticuerpos Naturales en Contra de antígenos Polisacáridos

Los antígenos polisacáridos son polímeros de alto peso molecular, que poseen numerosos determinantes antigénicos repetidos. Este tipo de moléculas, tienen la capacidad de entrecruzar los receptores del LB y activarlo, sin la participación de los LT; a este tipo de defensa se la denomina “Timo independiente” (T-independiente). El

primer paso en la activación de los LB por antígenos polisacáridos es la unión a inmunoglobulinas de superficie (mIg o BCR) y el entrecruzamiento de las mismas. Esta primera señal puede inducir la activación y proliferación del LB, pero se han planteado segundas señales co-estimulatorias provenientes del sistema de complemento, que actuarían a través del complejo molécula de polisacárido-fragmento C3d y su unión al receptor del complemento CD21 presente en los LB (**Figura 2.2.1.**)[24]. Este tipo de inmunidad puede estar mediada por linfocitos B1 presentes en las cavidades peritoneal y pleural o LB de la zona marginal del bazo (BZM), siendo los BZM los que cumplen un papel relevante en la defensa contra las bacterias encapsuladas. Los BZM son los primeros en entrar en contacto con los antígenos que circulan en la sangre, y responden frente a antígenos polisacáridos de bacterias capsulares como el *S. pneumoniae* con la producción de IgM, IgG2 e IgA.

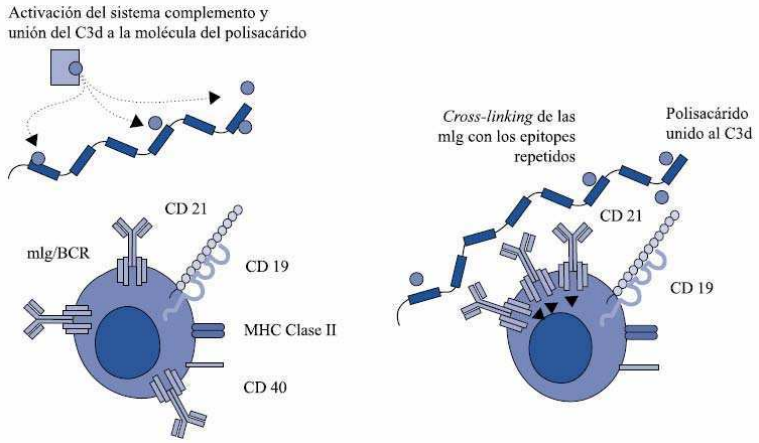

Figura 2.2.1. Esquema de activación del Linfocito B por polisacáridos capsulares (modificado de Rijkers et al, 1998 [25]).

Históricamente éste ha sido el tipo de respuesta estudiado para el neumococo, por ello se ha considerado al *S. pneumoniae* como un antígeno T- independiente. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los LT cumplen un rol importante en la respuesta inmune frente a esta bacteria [26–29]. Más adelante se discutirá la contribución de los LT colaboradores en la respuesta inmune frente al neumococo.

2.2.3. Respuesta de Anticuerpos en Contra de Proteínas de la Superficie Bacteriana

Durante el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa se producen anticuerpos efectores de alta afinidad, específicos para el patógeno o el inmunógeno. Estos se dan como resultado de la interacción entre las células B y las células T colaboradoras CD4 positivas (LT CD4+) (**Figura 2.2.2**). Esta respuesta específica, pero lenta, denominada "Timo dependiente" (T-dependiente), involucra generalmente a las células B2 que constituyen más del 90% de los LB en sangre y en órganos linfoides secundarios.

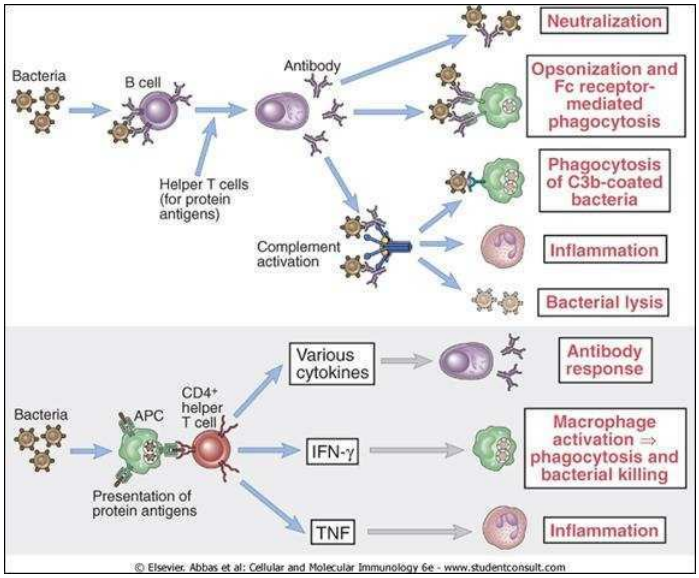

Figura 2.2.2. En la inmunidad humoral T independiente, los LB producen anticuerpos naturales, capaces de eliminar microorganismos extracelulares. En la inmunidad celular T dependiente, los LT colaboradores son capaces de activar LB productores de anticuerpos específicos, macrófagos que pueden matar los microorganismos que fagocitan o a LT citotóxicos que destruyen directamente a las células infectadas (Abbas, 2011 [30]).

Los LT CD4+ y CD8 positivos (CD8+) expresan receptores como el receptor de las células T (TCR) o el co-receptor CD3, que reconocen los péptidos antigénicos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y clase I, respectivamente, expresados en la membrana de las células presentadoras de antígeno (APC), en especial en las células dendríticas (CD). Los péptidos antigénicos que son endocitados por las APC desde el espacio extracelular, son presentados fundamentalmente por moléculas MHC de clase II. En contraste, los péptidos sintetizados endógenamente, a partir de proteínas del citoplasma, son presentados

casi en su totalidad, por el MHC de clase I. De esta manera, aquellos péptidos presentados vía MHC I pueden ser reconocidos por los LT CD8+ que, entre otras funciones, se encargan de eliminar células que han sufrido infecciones intracitoplasmáticas. Por su parte, las moléculas MHC de clase II son las que presentan péptidos provenientes de patógenos extracelulares como el neumococo, que serán reconocidos por LT CD4+, cuya función es ayudar a generar una respuesta humoral y celular específica frente a los mismos [31] (**Figura 2.2.3.**). Cabe destacar que en las CD, también existen otro tipo de moléculas relacionadas con la presentación antigénica; entre ellas las proteínas de la familia CD1. En particular, CD1d, interviene en la presentación de lípidos y glucolípidos propios de patógenos extracelulares, en especial a células NKT y Tγδ [32], cuyas funciones se mencionarán más adelante.

La respuesta específica de anticuerpos IgG frente al neumococo, depende de la colaboración entre los LT CD4+ y de los LB, mientras que la respuesta de anticuerpos IgM, como ya se ha mencionado, es T-independiente [33].

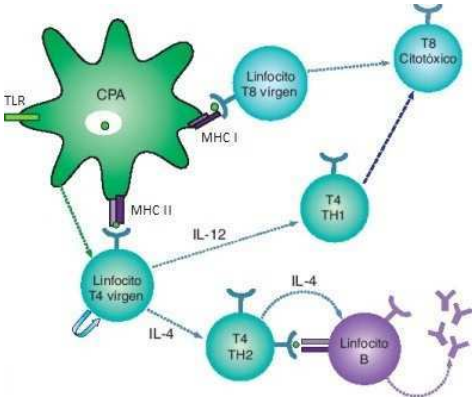

Figura 2.2.3.: Mecanismos de activación del sistema inmune adaptativo. CPA: célula presentadora de antígeno; TLR: receptor de tipo Toll. Activación de LT CD4+ y CD8+, producción de IL-2, IL-12 e IL-4, estimulación de la proliferación de células Th. Estimulación de la respuesta B y de la respuesta T citotóxica (Adaptado de Ligi, 2012 [34]).

Es importante tener en cuenta que los LT estarían involucrados en etapas tempranas, previas a la respuesta adaptativa de anticuerpos en contra de las proteínas bacterianas [6]. Para entender este posible mecanismo de activación T, es necesario mencionar brevemente cómo es que estas células se activan normalmente al encontrarse frente al antígeno específico.

Las APCs que ya han interactuado con antígenos en la periferia y los LT circulantes capaces de reconocer estos antígenos, circulan hacia los órganos linfoides

secundarios, en donde los LT pueden ser activados. El objetivo de activar a los LT es generar, a partir de un pool de LT *naive*, un número mayor de células efectoras funcionales capaces de eliminar al antígeno y además, una población de células de memoria que permanezcan por un largo período, para obtener una respuesta rápida frente a una posible re-exposición a dicho antígeno [30]. El LT, luego de entrar en contacto a través de su TCR con las moléculas MHC en las CD, como ya se ha mencionado, forma un complejo con CD4 o CD8 y CD3. Esta interacción es llamada "primera señal", y su función principal es la activación de los LT. Sin embargo, esta señal por sí sola no es suficiente para producir una respuesta T en si misma. La señal co-estimulatoria necesaria para continuar con la activación T, generalmente proviene de las interacciones entre las moléculas B7 y CD28. La molécula B7 (B7-1: CD80 y B7-2: CD86) se expresa en la membrana de las APC y es capaz de interactuar con CD28 que se expresa en la membrana de las células T, dando lugar a la "segunda señal". Esta interacción promueve la supervivencia de la célula T activada e incluye cambios en la expresión de sus moléculas de membrana, síntesis de Cks y receptores de Cks y proliferación celular y diferenciación hacia células efectoras y de memoria [30]. Una de las moléculas que aumenta su expresión en la membrana de los LT a pocas horas de su activación es CD69. La expresión de esta molécula facilita la permanencia de los LT en los órganos linfoides secundarios, donde reciben las señales de proliferación y diferenciación hacia células efectoras y de memoria.

2.2.4 Respuesta T CD4+ Independiente de Anticuerpos

Al activarse, los LT producen interleuquina dos (IL-2) y expresan altos niveles de la cadena α del receptor de IL-2 (CD25). Esta Ck estimula la proliferación de las células, lo que puede resultar en una marcada expansión de clones T antígeno-específicos. Los LT CD4+, luego de ser activados por las APC, pueden diferenciarse en diversas poblaciones efectoras, dependiendo de las Cks que produzcan ambos tipos celulares en la interacción. Las subpoblaciones clásicamente estudiadas son las células Th1, Th2 y T regulatorias (Treg), pero en los últimos años otras subpoblaciones como las Th17 y Th9 han tomado relevancia (**Figura 2.2.5.**) [30]. Todas difieren en su forma de

inducción, en sus patrones de circulación, en el perfil de Cks que las caracterizan y en los mecanismos efectores que desencadenan [35].

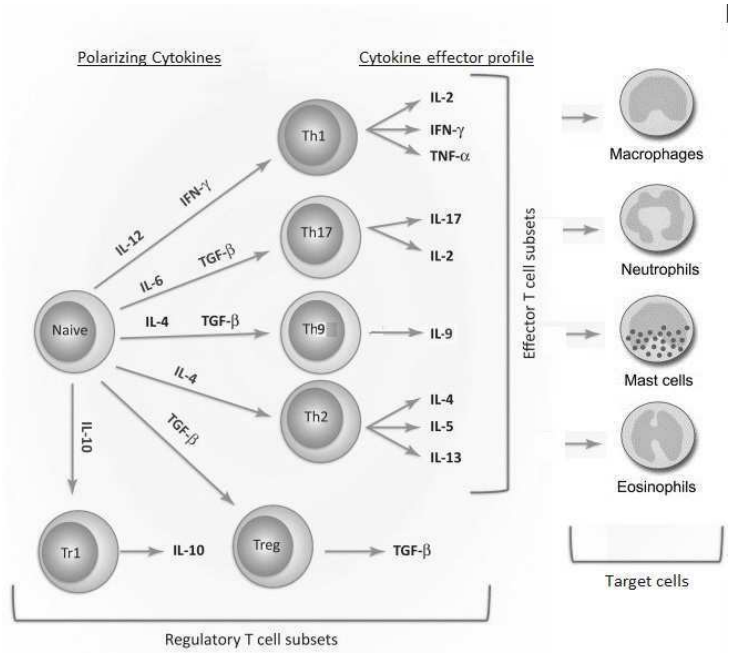

Figura 2.2.4.: Esquema de activación de LT CD4+ y su diferenciación a los distintos LT efectores y regulatorios; tipos celulares diana de las Cks efectoras (modificado de La Sala et al, 2012 [36]).

En los últimos años se ha encontrado evidencia de que la respuesta Th1 es importante para la eliminación del neumococo, dado que pacientes con deficiencias de IL-12 desarrollan infecciones neumocócicas serias; también se ha asociado al IFN- γ en la defensa frente a este microorganismo [6]. Por otro lado, varios grupos han demostrado que (al menos en ratones) los linfocitos Th17 a través de la vía de IL-17A son fundamentales para la protección frente al neumococo [37–39]. Estos datos llevaron a desarrollar la hipótesis de que en humanos, la protección frente a la colonización neumocóccica - y posiblemente también, frente a la enfermedad en mucosas - podría derivar, al menos en parte, del desarrollo de LT CD4+ productores de IL-17A capaces de reconocer antígenos que la bacteria expresa en el curso de la colonización del pulmón. La liberación de esta interleuquina podría reclutar fagocitos como macrófagos (MΦ) o neutrófilos al sitio de colonización, lo que ayudaría a disminuir el tiempo que la bacteria es portada en la zona nasofaríngea [18].

2.3. Patologías con Mayor Predisposición a la Infección por Neumococos

2.3.1. Asma atópico

El asma afecta en nuestro país a más de tres millones de personas y se encuentra en expansión. La mayoría de los casos de asma comienzan en la infancia y están asociados a hipersensibilidad frente a alergenos comunes, en especial aquellos derivados de los ácaros del polvo en el hogar, cucarachas, epitelio animal, hongos y pólenes [8,40]. En general, esto ocurre a través de la expansión selectiva de las células Th2 que secretan Cks características de este perfil celular [41]. Se trata de una enfermedad frecuente, caracterizada por inflamación crónica de las vías aéreas y obstrucción bronquial recurrente, de resolución espontánea o como respuesta al tratamiento [42].

Esta patología inflamatoria se presenta con edemas e hiperemia de la mucosa pulmonar, infiltración de linfocitos, mastocitos y eosinófilos [43]. Estas células inflamatorias liberan mediadores que desencadenan vasoconstricción, secreción de mucus y remodelación del epitelio pulmonar [44]. Los mediadores inflamatorios que intervienen en este proceso incluyen Cks, quimioquinas (Qks), factores de crecimiento (FC), mediadores lipídicos, Igs e histamina. La inflamación está dirigida por Cks del tipo Th2, que actúan a través de un *loop* de *feedback* positivo, promoviendo la producción de más mediadores inflamatorios, incluyendo otras Cks y Qks [33]. Estas moléculas, orquestan una cascada inflamatoria característica de la patología (Figura 2.3.1.), que incluye la supervivencia de las células Th2 (regulado por la IL-4), el cambio de isotipo a IgE en los LB (IL-4 e IL-13), la diferenciación y maduración de mastocitos (IL-3, IL-9 e IL-13), la maduración y supervivencia de eosinófilos (IL-3, IL-5 y GM-CSF) y el reclutamiento de basófilos (IL-3 y GM-CSF) [45].

En los pacientes con asma, el epitelio pulmonar no cumple correctamente con la función de “barrera física”. Las uniones estrechas entre las células epiteliales son incompletas y facilitan la penetración de los alergenos inhalados en el tejido [46]. Algunos alergenos tienen propiedades biológicas que les confieren una capacidad mayor de penetrar este epitelio [47]. Existen otros estímulos como los virus respiratorios

o la contaminación ambiental, que pueden afectar estas uniones celulares e interrumpir la barrera epitelial [48,49].

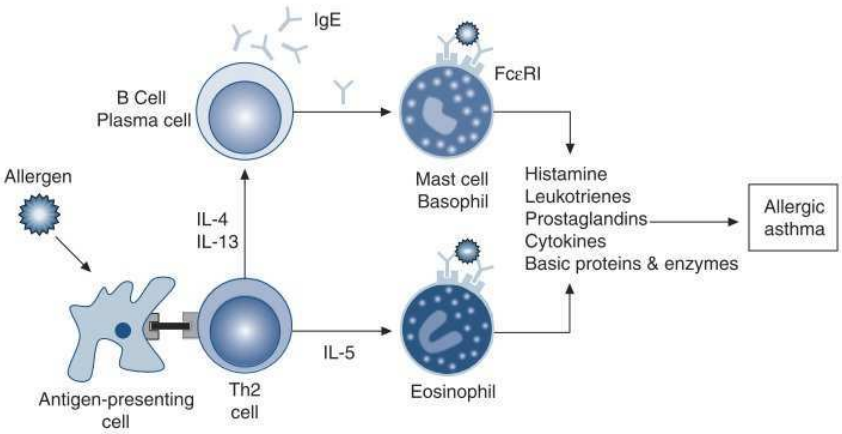

Figura 2.3.1. Representación esquemática de la cascada inflamatoria en asma atópico (Holgate, 2008 [40]).

El estado de inflamación crónica de las vías aéreas que sufren los pacientes asmáticos podría contribuir a la incapacidad de montar una respuesta inmune suficiente y predisponerlos a infecciones de mayor severidad y duración que las que sufren los individuos sanos [50–52]. Las infecciones causadas por virus, son capaces de desencadenar la exacerbación asmática que involucra un proceso inflamatorio, lo que facilitaría infecciones bacterianas secundarias frecuentemente causadas por *S. pneumoniae* [9]. Esto puede deberse al hecho de que en los pacientes asmáticos, el grado de colonización de esta bacteria es mayor que en los individuos sanos. Esto, asociado a estímulos inflamatorios que alteran la permeabilidad pulmonar, favorecería el desarrollo de infecciones pulmonares, generando neumonía. El grupo de Talbot y cols. reportó que los pacientes asmáticos presentan el doble de riesgo de adquirir una infección invasiva con *S. pneumoniae* que los individuos sanos. En los asmáticos la remodelación del epitelio y la producción aumentada de mucinas, tanto como la producción alterada de mucus, probablemente resultan en una incapacidad para eliminar a las bacterias patogénicas del pulmón, facilitando la permanencia de agentes potencialmente infecciosos y contribuyendo a un mayor riesgo de infección invasiva con neumococo [50].

Aspectos a tener en cuenta

A) Tolerancia Inmunológica en Asma

Las células Treg son las encargadas de frenar la respuesta inmune inflamatoria e inducir la tolerancia frente a alergenos. Estas células se pueden caracterizar a través de la co-expresión de distintos marcadores fenotípicos como el factor de transcripción *forkhead box protein 3* (Foxp3), CD4 y CD25; aunque existen otras combinaciones de marcadores para identificarlas, que se discutirán más adelante [53,54]. Estas células pueden generarse en el timo naturalmente (nTreg) o ser inducidas en la periferia (Tr1 o iTreg). La inducción de LT a un perfil de células regulatorias, durante el desafío frente a un alergeno, es un evento vital para generar una respuesta de tolerancia antigénica normal [55].

Las nTreg influyen el desarrollo de la respuesta inmune en patologías de origen atópico al liberar IL-10 y TGF-β, que median la supresión de CD involucradas en la activación de LT CD4+ efectores; inhiben directamente a las células Th1, Th17 y Th2; suprimen la producción de IgE alergeno específica; inhiben a mastocitos, eosinófilos y basófilos; y previenen la migración de LT efectores hacia el sitio blanco (en el caso del asma, el pulmón) [56,57] (Figura 2.3.1.1.).

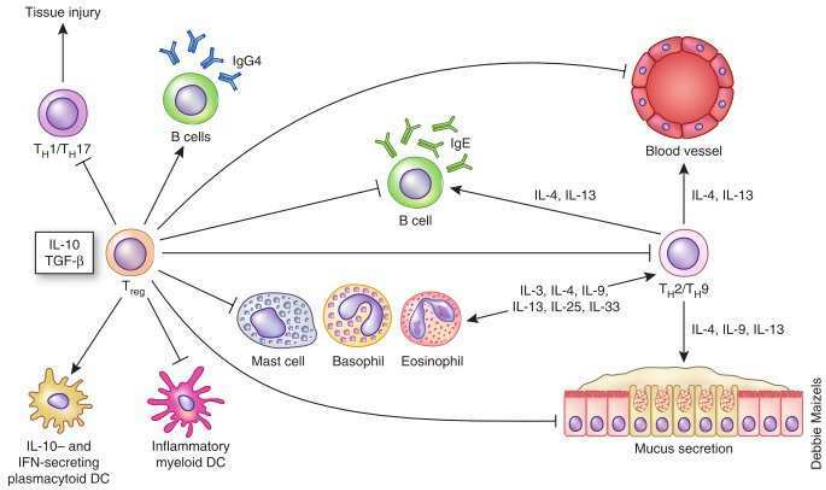

Figura 2.3.1.1. Efectos supresores de las células Treg sobre procesos inflamatorios en asma atópico: el desarrollo de las Treg y su función supresora parece ser fundamental para la protección del tejido pulmonar frente a la sensibilidad mediada por alergenos. Las Treg son inducidas frente a inmunoterapias alergeno-específicas, promoviendo la producción de IgG4 que funciona como anticuerpo bloqueante (Holgate, 2012 [45]).

B) Rol Dual de los LTγδ en las Vías Aéreas

Los LTγδ representan una población escasa (5%) en la mayoría de los tejidos y se denominan así porque el receptor TCR que expresan está compuesto por una cadena glucoproteica "γ" y otra "δ", distinto del TCR "αβ" que expresan los LT convencionales. Esta población de células puede subdividirse en base a la expresión diferencial de cadenas Vγ y Vδ distintas [58,59]. Estudios en modelos murinos sugieren que esta población puede tener un rol dual en sus funciones [60]. En el pulmón de ratón, predominan los LTγδ Vγ1+ y Vγ4+, y se encuentran presentes las células Vγ6+ [60–62]. Cada subtipo posee funciones distintas frecuentemente asociadas a inmunovigilancia e inmunorregulación, siendo capaces de responder a respuestas de estrés endógeno y daño de tejidos [60,63]. Por ejemplo, en las vías aéreas, las células Vγ1+ son pro-inflamatorias, mientras que las Vγ4+ suprimen esta actividad [64].

En ratones se observó que frente a una infección pulmonar con *S. pneumoniae* el número de LTγδ aumenta treinta veces en la resolución de la inflamación inducida por la bacteria y se ha descripto que contribuye a regular la abundancia de MΦ y CD de forma local [65–67]. Se ha visto que los LTγδ Vγ1+ producen IL-5 e IL-13 y, junto con otras células, son capaces de mediar la hipersensibilidad de las vías aéreas. La capacidad de las células Vγ4+ de suprimir una inflamación alérgica establecida depende de su capacidad de producir IL-17A [68]. Estos datos sugieren que dependiendo de la fuente celular y el momento en que se secrete, la IL-17A puede tener distintos roles en las vías aéreas. Es interesante el hecho de que en ratones que no son alérgicos y no poseen LTγδ, se desencadena hipersensibilidad de las vías aéreas, sugiriendo que estas células cumplen un rol en el mantenimiento de la homeostasis pulmonar [69]. Se ha descripto también que las células Tγδ son una fuente rápida de IL-17 frente a diversas infecciones bacterianas [70].

C) Respuesta Celular Adaptativa en Asma

Las CD asociadas al epitelio pulmonar y mucosas representan una población particular de APCs. Las mismas expresan receptores de la inmunidad innata (como los TLRs) y tienen el potencial de captar alergenos, procesarlos y presentarlos vía MHC a LT CD4+. En los individuos atópicos esto puede ocurrir de forma IgE dependiente [71]. Una vez que las CD maduras son "educadas" por el microambiente para promover

sensibilidad frente a alergenos, éstas interactúan con los LT de memoria para iniciar la respuesta T colaboradora mediante su activación, lo que involucra la expresión de moléculas como CD69 y CD25 en la membrana de los LT. Algunos de estos LT colaboran con los LB en el cambio de clase de IgM a IgE y otros desarrollan la respuesta Th2 en pulmón, mediante la liberación de Cks pro-alergénicas [45].

D) Infecciones en Asma

La hipersecreción mucosa disminuye la capacidad del *clearance* ciliar, facilitando infecciones virales que desencadenan el cuadro asmático [44], siendo las infecciones por rinovirus la mayor causa de exacerbación asmática (o crisis). En estas condiciones, pueden producirse infecciones bacterianas secundarias a la infección viral, siendo el *S. pneumoniae* uno de los agentes causales más frecuentes [72]. La condición asmática es entonces un factor de riesgo para la EIN, y estos pacientes sufren infecciones frecuentes por neumococos en mayor medida que los individuos sanos [50]. Por ello, decidimos analizar en los pacientes pediátricos que padecen de asma atópico, la respuesta frente a dos tipos distintos de bacterias: *S. pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Siendo el *M. tuberculosis* un patógeno intracelular, los mecanismos de defensa efectivos contra él son los de tipo celular e incluyen linfocitos T CD4+ y CD8+ convencionales y otros como los linfocitos T $\gamma\delta$ [73,74]. De esta manera, funciona como un control positivo de estímulo específico inflamatorio para nuestro modelo de estudio.

Nos interesó determinar si en el momento de crisis asmática, los pacientes presentaban una respuesta similar o distinta a los dos tipos de bacteria en nuestro sistema experimental, con respecto a los períodos de estabilidad. Asimismo nos planteamos comparar con respecto a los individuos sanos.

2.3.2. Deficiencia de Anticuerpos Específicos para Antígenos Polisacáridos (SPAD)

Esta patología se define como una deficiencia de anticuerpos específicos, con concentraciones normales de Igs y se reconoce como una forma de inmunodeficiencia primaria. El defecto característico que muestran estos pacientes es la imposibilidad de montar una respuesta de anticuerpos frente a antígenos polisacáridos. El 42% de las infecciones que sufren los pacientes SPAD son neumonías causadas mayormente por el *S. pneumoniae* y muchos de estos pacientes sufren de sinusitis recurrentes y/o infecciones pulmonares [75]. El diagnóstico de esta enfermedad se basa en gran parte en el desafío con la vacuna 23-valente (23-PPSV), que se utiliza como prototipo para evaluar la respuesta de anticuerpos frente antígenos polisacáridos. Los títulos de anticuerpos se pueden medir fácilmente en suero antes y después de la inmunización y la ausencia de respuesta de anticuerpos luego de la misma, en presencia de niveles normales de Igs totales, es criterio diagnóstico de SPAD.

Este tipo de "falla" en la respuesta frente al neumococo puede hallarse asociado a otras inmunodeficiencias; incluso puede manifestarse como uno de los primeros síntomas en pacientes que más adelante se diagnostican con una inmunodeficiencia común variable [76].

Aspectos a tener en cuenta

A) Maduración del Sistema Inmune

La inmunodeficiencia SPAD suele diagnosticarse en niños, lo que puede estar asociado al desarrollo dependiente de la edad de los anticuerpos en contra de antígenos polisacáridos y otros componentes del sistema inmune siendo que, como ya se ha mencionado, las respuestas deficientes a este tipo de patógenos son normales en niños sanos de menos de dos años de edad [77].

En estos pacientes se han reportado anomalías en el compartimento B, presentando un menor porcentaje de LB de memoria y un mayor porcentaje de LB transicionales que los individuos sanos, características consecuentes con una maduración y diferenciación B alteradas [78,79].

Considerando el rol que cumplen las CD en la respuesta adaptativa y la maduración de los LB, Jyonouchi y cols. demostraron que los pacientes SPAD presentaban una alteración en los cambios asociados a la edad en las CD, característicos en los individuos sanos [11]. Asimismo, se ha descripto que existen cambios linaje específicos que ocurren con el avance de la edad en los distintos subtipos de estas células en niños sanos, que se ven alterados en los pacientes con esta inmunodeficiencia [11].

B) Inmunidad Frente al Neumococo

En los pacientes SPAD podrían existir defectos en la maduración dependiente de la edad de otros tipos celulares involucrados en la respuesta inmune requerida para la defensa frente al neumococo. Una de las características de la respuesta inmune frente al neumococo es la reacción inflamatoria intensa que involucra el aporte de MΦ del tejido pulmonar, seguida de una infiltración neutrofílica [6]. Pero, como ya se ha discutido, la contribución de otras células del sistema inmune, además de los fagocitos, es fundamental. También es crucial el rol de mediadores pro-inflamatorios tales como el factor de necrosis tumoral TNF-α, la IL-6 y la IL-1β. Estos mediadores reclutan y activan células inflamatorias al sitio de infección. Por ello nos interesó evaluar la funcionalidad de células que participan en la modulación de la respuesta adaptativa como los Mo, o las células NK, y en la respuesta inmune celular mediada por LT efectores y de memoria, dado que, como ya se ha mencionado antes, son de gran importancia en la defensa frente al neumococo.

Las células NK participan como efectores de la inmunidad innata ejerciendo su función citotóxica directa sobre las células infectadas, pero también cumplen un rol fundamental en la modulación de la respuesta adaptativa mediante la liberación de Cks y Qks, en conjunto con los Mo y las CD que, dependiendo de cuál sea el estímulo antigénico, maduran de forma diferencial para modular la respuesta T perfil específica [80].

C) Rol de las Células NK en Infecciones Neumocóccicas y Virales

El IFN-γ - inmunomodulador crítico de la respuesta temprana - es un activador de la muerte mediada por MΦ y también recluta neutrófilos y LT circulantes al sitio de

infección. Las células NK son linfocitos derivados de la médula ósea, que resultan claves en la defensa frente a un amplio espectro de patógenos como virus, bacterias y parásitos intracelulares y son grandes productoras de IFN-γ, entre otras Cks [81]. Se ha reportado que las células NK son importantes para poder controlar la infección por el *S. pneumoniae* [82].

La función efectora de las células NK está finamente regulada por el balance entre las señales inhibitorias y activadoras provenientes de sus receptores de membrana [83]. En humanos, los receptores inhibitorios principales de las células NK son los receptores tipo inmunoglobulina KIRs, que reconocen determinantes polimórficos en el MHC de clase I y los receptores de la familia de las lectinas tipo-C NKG2A. Los principales receptores activadores son el NKG2D [84] y los receptores de citotoxicidad natural (NCRs) NKp30, NKp46 y NKp44, siendo este último expresado en células NK activadas por IL-2 [85]. En un modelo murino, se ha descripto que las células NK expresan el receptor NKp46 en etapas tempranas del control de la infección por *S. pneumoniae*, contribuyendo al *cross-talk* entre células NK y MΦ/CD [81].

En los individuos sanos más del 90% de las células NK maduras son caracterizadas con el fenotipo $CD56^{dim}CD16^{+}$; el 10 % restante se distribuye entre las células $CD56^{bright}CD16^{-}$ y un pequeño subset de células $CD56^{-}CD16^{+}$ [86]. En condiciones normales las células NK $CD56^{dim}$ contienen grandes cantidades de perforina, muestran una citotoxicidad elevada, expresan KIRs clonalmente distribuídos, NCRs y receptores de la familia de lectinas tipo-C y expresan receptores de localización a sitios inflamatorios periféricos [87]. Las células $CD56^{bright}$ no poseen perforina pero secretan grandes cantidades de un amplio espectro de CKs, expresan altos niveles de receptores de la familia de lectinas tipo-C, nada de NCRs y una pequeña fracción expresa KIRs. Estas células NK expresan receptores de homing hacia órganos linfoides secundarios, donde cumplirían funciones inmunoregulatorias [87]. Luego de ser activadas, la actividad citotóxica de las células $CD56^{bright}$ puede ser igual o mayor que la de las células $CD56^{dim}$, y comienzan a expresar KIRs, NCRs y receptores de *homing* hacia tejidos inflamados [87,88].

D) Rol de los Monocitos en Infecciones por Neumococo

Una nueva clasificación define a los subtipos de Mo humanos en tres poblaciones: los Mo clásicos CD14++CD16-, los intermedios CD14++CD16+ y los no clásicos CD14+CD16++ [89]. La relación entre los distintos subtipos ha sido descripta recientemente, aunque todavía no se ha probado unívocamente que los Mo no clásicos deriven de los intermedios [90–92]. En cuanto a las Cks que producen, los Mo CD16+ son los mayores productores de TNF-α, pero no está claro si existen diferencias en cuanto a su producción entre las poblaciones intermedia y no clásica [93,94]. Utilizando muestras de sangre entera, el grupo de Belge y colaboradores demostró que los Mo no clásicos (que expresan menos CD14 en su membrana) producen más TNF-α que los Mo clásicos [94]. En Mo aislados de CMNP, se vio que la población no clásica, en respuesta a LPS, produce los niveles más altos de TNF-α e IL-1β [91]; y en otro estudio también en Mo aislados se observó que la población no clásica producía los mayores niveles de TNF-α en respuesta a ligandos de TLR7/8 [90]. Por lo tanto, parece que esta población no clásica de Mo es capaz de producir Cks pro-inflamatorias en respuesta a una gran variedad de ligandos de TLR y no solo en respuesta a virus o complejos inmunes. Se ha descripto que la población intermedia de Mo es la que más IL-10 produce en respuesta a LPS y zymosan [95]. Sin embargo, otros grupos han reportado que el subtipo que más IL-10 es capaz de producir, es el clásico [90,91,96].

La base molecular de esta enfermedad es aún desconocida y, en los últimos años, el diagnóstico de la misma se ha dificultado con el uso creciente de vacunas conjugadas que incluyen antígenos proteicos. Por ello, es importante estudiar algunos aspectos relacionados con la maduración del sistema inmune tanto innato, como adaptativo. Decidimos evaluar si existen diferencias fenotípicas entre los distintos tipos celulares involucrados en la respuesta celular al neumococo asociadas a la edad, tanto en los individuos sanos como en los pacientes SPAD.

2.4. Otras Moléculas de Relevancia Inmunológica

2.4.1. CD25

El receptor de la IL-2 (IL-2R) está formado por tres proteínas asociadas de forma no covalente: la IL-2Rα (CD25), la IL-2/15Rβ (CD122) y la cadena γc (CD132), siendo CD25 una cadena exclusiva del IL-2R. La expresión de CD25 y, en menor medida de CD122, aumenta con la activación de LT *naive* CD4+ y CD8+, y así la IL-2 puede interactuar con el receptor con mayor afinidad. La IL-2 que se produce frente a la estimulación antigénica es suficiente para inducir la expresión de CD25, lo que proporciona un mecanismo de auto-amplificación de las células T. Los LTreg expresan CD25 de forma constitutiva y dependen de la IL-2 que producen las demás células T para mantener sus funciones regulatorias [30].

2.4.2. CD69

Los LT aumentan la expresión de esta proteína de membrana (luego de ser activados por las APCs) que interactúa con el receptor de esfingosina 1-fosfato (S1PR1), reduciendo su expresión. El S1PR1 media la salida de los LT de los órganos linfáticos secundarios. La consecuencia de la interacción de estas dos moléculas es que los LT activados permanecen allí en los órganos linfáticos secundarios, en donde recibirán las señales necesarias para proliferar y diferenciarse en células de memoria o efectoras. Luego de que los LT se dividen, la expresión de CD69 en su membrana disminuye, aumentan los niveles de expresión de S1PR1 y así pueden salir a circulación [30].

El grupo de Martín y cols. demostró en un modelo murino, que la pérdida de expresión de CD69 afecta la diferenciación a células Th17, independientemente de las APCs. La inducción temprana de la expresión de CD69 en los LT, facilitaría la inhibición de la “tendencia natural” de generar una respuesta Th17, permitiendo otros caminos de diferenciación T (como Th1 o Th2) [97].

2.4.3. CD40 y CD40L

Entre las 24 y las 48 horas luego de ser activados, los LT expresan altos niveles de CD40L. La expresión de esta molécula facilita la colaboración T con los MΦ y los LB, que expresan CD40 en su membrana. Además, CD40L estimula a las CD para mejorar su capacidad de presentación antigénica, permitiendo que exista un *loop* de *feedback* positivo de amplificación de las respuesta T [30].

2.4.4. CD127 (IL-7R), CD27, CD45RA y CD45RO

Los LT de memoria, como los LT *naive*, expresan altos niveles de CD127 y CD27 (cuya función se desconoce); también expresan moléculas de superficie que promueven la migración de estas células hacia los sitios de infección. En humanos, la mayoría de los LT *naive* expresan en su membrana la isoforma A de la proteína CD45: CD45RA. En contraste, la mayoría de los LT activados y de memoria expresan CD45RO. Sin embargo, esta no es una forma perfecta de distinguir entre los LT *naive* y los LT de memoria, dado que puede existir interconversión entre poblaciones CD45RA+ y CD45RO+ [30].

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Individuos Estudiados

Pacientes Asmáticos

Se consideraron pacientes pediátricos a partir de los siete años de edad, dado que a partir de ese momento se puede efectuar un diagnóstico confiable de asma atópico, hasta los diecinueve años de edad. Los mismos fueron seleccionados tomando en cuenta los siguientes criterios:

- Valores de IgE altos en sangre para la edad.
- Historial de hiperreactividad bronquial: más de dos bronco-espasmos por año.
- Valores positivos para tests cutáneos a diferentes alergenos.

Todos los individuos estaban vacunados para la tuberculosis con la vacuna BCG y se encontraban bajo tratamiento con glucocorticoides inhalatorios.

Se estudiaron un total de 41 pacientes asmáticos. Las muestras fueron obtenidas durante el período de estabilidad (n=39) y, en algunos casos, durante el período de exacerbación asmática (o crisis aguda) (n=18). Las tomas de muestra para los pacientes durante el momento de crisis se realizaron previo al tratamiento con medicación para aliviar los síntomas. Comparamos todos los datos obtenidos en pacientes asmáticos con respecto a lo observado en individuos sanos.

Para diecisiete de estos pacientes, comparamos los mismos parámetros en un mismo individuo durante el período de estabilidad y el período de exacerbación asmática.

Pacientes SPAD

Estos pacientes son incapaces de montar una respuesta inmune humoral específica frente a neumococos [10]. Los mismos fueron seleccionados tomando en cuenta los siguientes criterios:

- Infecciones recurrentes, en especial, con patógenos Gram - positivos.

- Título bajo de anticuerpos específicos para antígenos polisacáridos, frente al desafío con la vacuna Pneumovax-23 (no respuesta).
- Valores normales de inmunoglobulinas en sangre.

Todos los individuos estaban vacunados para la tuberculosis con la vacuna BCG y recibieron en algún momento tratamiento con gammaglobulina endovenosa 400-600 mg/Kg/día (GGev). Se estudiaron un total de dieciocho pacientes SPAD. Se consideraron dos grupos etarios para su estudio: pacientes de siete a catorce años de edad (7-14; n=11; hasta los 13 años de edad) y pacientes de catorce a diecinueve años de edad (14-19; n=7; a partir de los 14 años de edad). Las muestras de sangre se obtuvieron antes de recibir el tratamiento con GGev, si éste era administrado al momento de la consulta. A raíz de que se ha descripto que en los niños sanos existen cambios asociados a la edad en el desarrollo y maduración de diversos tipos celulares, que en los pacientes SPAD se verían alterados, cuando las muestras fueron suficientes se separó a los sanos y a los pacientes en los dos rangos etarios previamente mencionados. Cabe destacar la importancia de utilizar controles de edades correspondientes [11].

Grupo control

Como grupo control se consideraron individuos sanos de siete a diecinueve años de edad, no asmáticos, no atópicos, que concurrían a consulta para realizarse estudios de controles prequirúrgicos (n=22). Todos los individuos fueron vacunados para la tuberculosis con la vacuna BCG. Para comparar con respecto a los pacientes SPAD, los individuos sanos se separaron según los rangos etarios de 7-14 (n=7) y de 14-19 (n=15) años de edad.

Manejo de las muestras de pacientes

Las muestras de sangre y suero provienen del servicio de Inmunología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Se obtuvo un consentimiento informado para realizar la extracción de las muestras de sangre e inclusión en el estudio en cada caso particular. El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Niños R. Gutiérrez y por el Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina.

3.2. Antígenos

Se utilizó la cepa de colección de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 cultivado, lavado e inactivado por calor (Spn), provisto por el Laboratorio de Bacteriología Central del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr. Malbrán. La concentración a emplear se determinó a través de una curva dosis-respuesta. Como en los pacientes asmáticos o SPAD las infecciones con otro tipo de patógenos como el *Mycobacterium (M.) tuberculosis* son muy poco frecuentes, se empleó también, como control, *M.tuberculosis* H37-RV (Mtb) provisto por el Servicio de Micobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr. Malbrán. La concentración a utilizar se determinó a través de una curva dosis-respuesta.

Como existen marcadas diferencias antigénicas entre distintas cepas conocidas de neumococo, nos propusimos comparar los resultados obtenidos con la cepa de colección, con respecto a la respuesta a otras dos cepas en algunos de los experimentos. Las mismas fueron obtenidas a partir de aislamientos: la cepa 14 (Spn14), que es la más prevalente en Argentina y la cepa 3 (Spn3), que es una de las más virulentas. Ambas fueron cultivadas, lavadas e inactivadas por calor, provistas también por el Laboratorio de Bacteriología Central del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr. Malbrán. La concentración a emplear se determinó a través de una curva dosis-respuesta.

3.3. Purificación de células

Se tomaron 7ml de sangre en tubos con heparina y las CMNP fueron aisladas mediante un gradiente de centrifugación con Ficoll-“Hypaque” (Ficoll-amidotrizoato de sodio) como ya ha sido descripto [98]. Las células fueron recogidas de la interfase y resuspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco Lab, NY, USA), conteniendo gentamicina (85 µg/ml) y 10% de suero fetal bovino, inactivado por calor (Gibco Lab) (medio completo). La viabilidad celular fue siempre mayor al 98%, de acuerdo al test de exclusión de azul de tripán.

3.4. Determinaciones en sangre Entera

Eosinófilos, Basófilos y células B que expresan IgE, fueron evaluados por citometría de flujo el día de la obtención de la muestra (a 0hs), 100 µl de sangre entera, utilizando anti-CD45PE-Cy5 (BD Pharmingen, CA, USA), anti-CD19FITC (Cytognos, Salamanca, España) y anti-IgE biotinilada (Vector, Ontario, Canada), seguido de estreptavidina-PE (Vector, Ontario, Canada). Los Basófilos fueron definidos como células CD19-CD45+IgE+ y los eosinófilos se determinaron por auto-fluorescencia.

3.5. Determinaciones en Células Mononucleares Periféricas

Para todos los grupos estudiados, las células obtenidas a partir de la purificación fueron resuspendidas a $0.5x10^6$ células/ml en PBS, lavadas e incubadas con los anticuerpos correspondientes.

Las poblaciones celulares que expresan CD3, CD4, CD8, CD25, CD69 y TCRγδ fueron evaluadas en CMNP, también por citometría de flujo, utilizando anti-CD3PE-Cy5 (BD Pharmingen), anti-CD4-PE (BD Pharmingen), anti-CD8-FITC (Caltag Laboratories), anti-CD25-FITC (BD Pharmingen), anti-CD69-PE (BD Pharmingen) y anti-TCRγδ-FITC (BD Biosciences), en pacientes asmáticos, pacientes SPAD e individuos sanos.

En los pacientes SPAD se evaluaron por citometría de flujo los siguientes parámetros o sub-poblaciones celulares en CMNP a 0hs:

- Activación celular: Además de evaluar los LT CD4 y CD8 CD69+ o CD25+, se tuvo en cuenta a los LT CD4+CD27+ como forma alternativa de ver el grado de activación en estas células, al momento de la toma de muestra [99]. Se usaron los anticuerpos anti-CD3 PE-Cy5 (BD Pharmingen), anti-CD27-PE (Biolegend, CA, USA) y anti-CD4-FITC (Caltag).

- Células regulatorias: Se evaluaron las células CD4+CD25+Foxp3+ utilizando el *Foxp3 Staining Buffer Set* (eBioscience, CA, USA), las CD4+CD25+CD127- [100] y las CD4+CD25+CD39+ [101], por citometría de flujo. Se utilizaron los anticuerpos anti-

CD4PE-Cy5 (eBioscience), anti-CD25-PE (eBioscience), anti-Foxp3-FITC (eBioscience), anti-CD127-AlexaFluor488 (Biolegend) y anti-CD39-FITC (Biolegend).

- Células Th17: Sin previa estimulación antigénica no se puede identificar a los LTCD4+IL-17+, por lo tanto se evaluaron las células CD4+CD161+CCR6+ [102,103], utilizando los anticuerpos anti-CD4-FITC (Caltag), anti-CD161-PE (Biolegend) y anti-CCR6-PerCP-Cy5.5 (Biolegend).

- Linfocitos T efectores/memoria: Se evaluó la expresión de CD27 y CD45RA o CD45RO a 0hs en CMNP CD3+, utilizando los anticuerpos anti-CD3-PE-Cy5 (BD Pharmingen), anti-CD27-PE (Biolegend), anti-CD45RA-FITC (Biolegend) y anti-CD45RO-FITC (Biolegend).

Monocitos: Se evaluaron tres poblaciones distintas de Monocitos según la expresión de los marcadores CD14 y CD16. Se utilizaron los anticuerpos anti-CD14-FITC (Biolegend) y anti- CD16-PE (BD Pharmingen).

Células NK: Se estudiaron distintas subpoblaciones de células NK, definiéndolas mediante los marcadores CD14, CD16 y CD56, definiéndolas como células CD14-CD56+ que expresan o no CD16 en su membrana [104]. Se utilizaron los anticuerpos anti-CD14- FITC (Biolegend), anti- CD16-PE (BD Pharmingen) y anti-CD56-PE-Cy5 (BD Pharmingen).

3.6. Cultivos Celulares

Las CMNP se cultivaron a una concentración de $1X10^6$ células/ml, en 1 ml de medio completo, en tubos *Falcon 2003*. Los tubos se mantuvieron a 37ºC en una atmósfera húmeda al 5% de CO_2, en presencia o ausencia de Spn ($2X10^6$ bacterias/ml) 0,01 UDO/ml o Mtb ($3 X10^6$ bacterias/ml), a distintos tiempos. En algunos casos además se utilizaron las cepas Spn3 y Spn14 ($2X10^6$ bacterias/ml) 0,01 UDO/ml a distintos tiempos.

3.7. Evaluación de Citoquinas Intracitoplasmáticas

A 4-5 horas de cultivo

- Linfocitos T: Se evaluó la producción de diversas Cks intracelulares en células de sangre entera proveniente tanto de pacientes asmáticos y SPAD, como de individuos sanos, mediante citometría de flujo.

Las células fueron estimuladas con PMA/ionomicina en presencia de Brefeldina A (*BD GolgiPlug*, BD Biosciences -Pharmingen) durante 5hs y luego fueron marcadas con anticuerpos de membrana anti-CD3-PE-Cy5 (BD Pharmingen) y anti-CD8-FITC (Caltag Laboratories). Luego de fijar y permeabilizar las células (Fix & Perm kit, Caltag Laboratories, CA, USA), se utilizaron anticuerpos conjugados a PE para marcar las distintas Cks: TNF-α (Caltag Laboratories), IL-4 (BD FastImmune), IL-5 (BD Pharmingen), IL-13 (BD FastImmune), IFN-γ (Caltag Laboratories) e IL-10 (BD Pharmingen): en los pacientes SPAD además se marcó con IL-17 (eBioscience) e IL-9 (Biolegend).

- Monocitos: Se realizaron cultivos de sangre entera proveniente de pacientes SPAD o de individuos sanos, en presencia de Brefeldina A, con Spn o sin estímulo, utilizando como control positivo LPS de *Escherichia coli* 011:B4 (Sigma Chemicals Co., Saint Louis, USA). Posteriormente fueron marcadas con anticuerpos de membrana anti-CD14-PE-Cy5 (Biolegend) y anti-CD16 FITC (Biolegend). Luego de fijar y permeabilizar las células (Fix & Perm kit, Caltag Laboratories, CA, USA), se utilizó el anticuerpo anti-TNFα PE (Biolegend). La capacidad de producción de TNF-α se evaluó por citometría de flujo.

A 24 horas de cultivo

- Células NK: Se realizaron cultivos de CMNP provenientes de pacientes SPAD o de individuos sanos, con Spn, Mtb o sin estímulo, durante 24hs. Se determinaron las distintas subpoblaciones de células NK, definidas a través del marcador CD56 y la expresión o no de CD16. Se utilizaron los anticuerpos anti-CD56-PE-Cy5 (BD Pharmingen), anti-CD16-PE (BD Pharmingen) y anti- IFN-γ FITC (eBioscience). La capacidad de producción de IFN-γ se evaluó por citometría de flujo.

A 48 horas de cultivo

- Monocitos: Se realizaron cultivos de CMNP provenientes de pacientes SPAD o de individuos sanos, con Spn, Mtb o sin estímulo, durante 48hs. Se utilizaron los anticuerpos anti-CD14 FITC (Biolegend), anti-IL-10-PE (BD Pharmingen) y anti- TNF-α-PE (Caltag Laboratories). La capacidad de producción de IL-10 y TNF-α en los Mo CD14+ clásicos se evaluó por citometría de flujo.

- Linfocitos Th17 y Th1: Se realizaron cultivos de CMNP provenientes de pacientes SPAD o de individuos sanos, con Spn, Mtb o sin estímulo, durante 48hs. Se utilizaron los anticuerpos anti-CD4PE-Cy5 (eBioscience), anti-IL-17-PE (eBioscience) y anti-IFN-γ-FITC (eBioscience). La capacidad de producción de IL-17 e IFN-γ en los linfocitos CD4+ se evaluó por citometría de flujo.

- Linfocitos CD4+ IL-9+: Se realizaron cultivos de CMNP provenientes de pacientes SPAD o de individuos sanos, con Spn, Mtb o sin estímulo, durante 48hs. Se utilizaron los anticuerpos anti-CD3PE-Cy5 (BD Pharmingen), anti-CD8-FITC (Caltag Laboratories) y anti-IL-9-PE (Biolegend). La capacidad de producción de IL-9 en los linfocitos CD3+CD8+ y en los linfocitos CD3+CD8- (CD4+) se evaluó por citometría de flujo.

3.8. Evaluación de Citoquinas en Sobrenadantes de cultivo y en Suero

La concentración de IL-5, IFN-γ, TGF-β e IL-10 se midió en los sobrenadantes (SN) de los cultivos a 48 horas, con o sin estímulo con Spn o Mtb. Para ello se utilizaron *kits* comerciales de ELISA (eBioscience). Con el fin de evaluar la producción espontánea de Cks, se midieron además las concentraciones de las mismas en las muestras de suero; donde también se midió la presencia de IgE en pacientes asmáticos e individuos sanos, utilizando el *kit* de ELISA UBI Magiwell (United Biotech Inc., CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIOS EN PACIENTES CON ASMA ATÓPICO

4.1.1. Caracterización de Distintos Tipos Celulares del Sistema Inmune

Linfocitos T

Como se ha mencionado, recientemente se ha descripto la participación de varias subpoblaciones de LT en la inmunidad adquirida frente al *S. pneumoniae* [7,18,28]. Por ello decidimos estudiar algunos parámetros relacionados con la respuesta T, tanto en pacientes asmáticos como en individuos sanos (**Tabla 4.1.1**). La finalidad de estos estudios fue determinar si los individuos asmáticos en edades pediátricas presentan alguna diferencia con respecto a los individuos sanos, dentro de los mismos rangos etarios, que pueda ser asociada a la mayor frecuencia de infección por neumococos. También se tuvo en cuenta la posibilidad de que dentro del grupo de pacientes asmáticos, pudieran existir diferencias en cuanto a los momentos de estabilidad y los momentos de exacerbación asmática (**Tabla 4.1.2**).

0 horas	Sanos	Asmáticos
% LT:		
CD3+	68.90 ± 4.35	63.69 ± 3.35
CD3+ γδ+	**7.85 ± 1.40**	**4.00 ± 0.44 ***
CD3+ γδ+ CD69+	9.86 ± 3.00	7.05 ± 1.68
CD3+ CD69+	2.95 ± 0.60	2.61 ± 0.28
CD3+ CD25+	7.38 ± 2.00	8.43 ± 0.80
CD4+ CD25+	6.31 ± 1.72	7.24 ± 0.87
CD8+ CD25+	1.01 ± 0.36	0.63 ± 0.08
CD4+ $CD25^{hi}$	1.14 ± 0.22	1.28 ± 0.28

Tabla 4.1.1. Porcentaje de subtipos de LT analizados *ex vivo* (0hs), en individuos sanos (n=22) y pacientes asmáticos (n=39) – Resultados expresados como media ± error estándar, *$p < 0.05$. Test de Mann Whitney.

Se decidió estudiar a los LTγδ, dado que se los ha implicado fuertemente en la respuesta contra el *M. tuberculosis* [105] y, en una menor medida contra el *S. pneumoniae* [67]. Como se muestra en la **Tabla 4.1.1**, los porcentajes de LTγδ son significativamente menores en los pacientes asmáticos que en los individuos sanos.

Al comparar los distintos parámetros T de un mismo paciente durante un período de estabilidad y un momento de crisis asmática, no se observaron diferencias significativas entre los LTγδ para un mismo paciente asmático en una condición o en la otra (**Tabla 4.1.2**). Tampoco se observaron diferencias significativas para ninguno de los demás parámetros analizados.

0 horas	**Asmáticos**	
	Estabilidad	**Exacerbación**
% LT:		
CD3+ γδ	2.96 ± 0.41	3.11 ± 0.46
CD3+ γδ+ CD69+	5.20 ± 0.95	6.61 ± 1.19
CD3+ CD69+	2.51 ± 0.36	2.18 ± 0.45
CD3+ CD25+	8.40 ± 0.96	7.60 ± 1.24
CD4+ CD25+	7.50 ± 1.11	7.65 ± 4.50
CD8+ CD25+	0.64 ± 0.11	0.88 ± 0.19
CD4+ $CD25^{hi}$	1.27 ± 0.41	1.64 ± 0.40

Tabla 4.1.2. Porcentaje de subtipos de LT analizados *ex vivo* (0hs), en pacientes asmáticos en períodos de estabilidad y en momentos de exacerbación asmática (n=17) – Resultados expresados como media ± error estándar, no significativo. Test de Wilcoxon signed-rank.

Se ha descripto que la modulación que ejercen los LTreg sobre LT efectores sería relevante en respuesta a la exposición frente a alergenos [53,106,107]. Por ello, decidimos evaluar el porcentaje de células CD4+$CD25^{hi}$, entre las que se encuentran las células regulatorias. Como se muestra en la **Tabla 4.1.1**, no existen diferencias significativas entre los porcentajes de LT CD4+$CD25^{hi}$ de pacientes asmáticos e individuos sanos. Cuando se compararon los individuos en período de estabilidad con los individuos en momentos de crisis asmática, tampoco se vieron diferencias significativas (**Tabla 4.1.2**). Sin embargo, si se consideran las medianas correspondientes: **0,37** (min: 0,03; máx: 5,24) vs. **0,56** (mín: 0,01; máx: 4,57), se observa una tendencia a un menor porcentaje de LT CD4+$CD25^{hi}$ en los individuos en período de estabilidad.

Se evaluó *ex vivo* la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25, en distintas subpoblaciones T. Como se muestra en la **Tabla 4.1.1**, no se observaron diferencias significativas en la expresión de estos marcadores, cuando se compararon los valores correspondientes a individuos sanos con los valores de los pacientes asmáticos. Tampoco se observaron diferencias significativas al observar al mismo paciente asmático en período de estabilidad y en momento de crisis (**Tabla 4.1.2**).

Linfocitos B y otras poblaciones leucocitarias de sangre periférica

Se ha descripto que en la patofisiología del asma existen diversas poblaciones leucocitarias involucradas en el desarrollo de la enfermedad; entre ellas los LB que expresan IgE en su membrana, los basófilos y los eosinófilos [43,44]. Por ello decidimos medir los porcentajes de estas células a 0hs, tanto en individuos sanos como en pacientes asmáticos. Los datos se muestran en la **Tabla 4.1.3**. No se observaron diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de basófilos entre sanos y asmáticos. En los pacientes asmáticos, como era de esperarse dado que se trata de pacientes pediátricos, se encontró un porcentaje significativamente mayor de eosinófilos y de LB IgE+, con respecto a los individuos sanos.

0 horas	Sanos	Asmáticos
% Basófilos	0.91 ± 0.17	0.76 ± 0.11
% Eosinófilos	2.47 ± 0.17	**6.39 ± 0.61** ***
% LB IgE+	4.55 ± 0.92	**6.55 ± 0.71** *

Tabla 4.1.3. Basófilos, Eosinófilos y LB IgE+, analizados *ex vivo* (0hs) de individuos sanos (n=22) y de pacientes asmáticos (n=39) – Resultados expresados como media ± error estándar, *p < 0.05; ***p < 0.0001. Test de Mann Whitney.

Asimismo, como medida de la capacidad de los LB de producir IgE, se midió la concentración de esta Ig en muestras de suero provenientes de niños sanos y de pacientes asmáticos. Como era esperado, se encontró una concentración de IgE significativamente mayor en los sueros de pacientes asmáticos, con respecto a la encontrada en los sueros de individuos sanos (**Tabla 4.1.4**). Esto fue así en los

pacientes asmáticos durante el período de estabilidad y el momento de crisis. No se observaron diferencias significativas entre los dos estados asmáticos.

0 horas	Sanos	Asmáticos	
		Estabilidad	Exacerbación
IFN - γ (pg/ml)	> 500 (n=9)	118.30 ± 51.94 (n=7)	85.31 ± 41.05 (n=6)
IL-5 (pg/ml)	< 3.9 (n=9)	80.19 ± 41.41 (n=7)	66.31 ± 29.09 (n=9)
IL-10 (pg/ml)	12.70 ± 3.56 (n=10)	22.46 ± 7.00 (n=11)	23.10 ± 7.16 (n=11)
IgE (IU/ml)	60.15 ± 11.96 (n=11)	**1262.00 ± 304.80** (n=13) **	**1545.00 ± 319.90** (n=11) ***

Tabla 4.1.4. Factores inmunes solubles en suero de individuos sanos y en individuos asmáticos en períodos de estabilidad y de exacerbación asmática – Resultados expresados como media ± error estándar, ***p < 0.0001; **p < 0.001. Test de Mann Whitney.

En esta primera parte se confirmó que los pacientes asmáticos presentaban niveles altos de Eosinófilos y LB IgE+, junto con valores elevados de IgE e IL-5 en suero, en contraste con niveles menores de IFN-γ, con respecto a los individuos sanos. También se encontró que los pacientes asmáticos presentaron un menor porcentaje de LTγδ que los individuos sanos.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas con respecto a este último tipo celular entre individuos sanos y pacientes asmáticos. Sin embargo se observó una tendencia a un menor porcentaje de LT CD4+CD25^{hi} en los individuos asmáticos en período de estabilidad. Esto no se pudo correlacionar con los niveles de IL-10 - que puede ser producida por los LTreg - encontrados en suero donde se observaron valores similares entre los asmáticos en estabilidad y en exacerbación.

4.1.2. Activación de Linfocitos T en Presencia de Antígenos Bacterianos

Para evaluar la respuesta T frente a estímulos bacterianos, se realizaron cultivos de CMNP en presencia de *S. pneumoniae* (Spn) o *M. tuberculosis* Mtb para medir la expresión de marcadores de activación.

Expresión de CD69

Se realizaron cultivos en presencia de los estímulos bacterianos con el fin de determinar los niveles de expresión de CD69. Se ha reportado que el pico de expresión de CD69 frente a antígenos micobacterianos se encuentra entre las 24 y las 48 horas [108]. Debido al escaso volumen de muestra la disponibilidad de células es limitada los experimentos se evaluaron a 48hs, tiempo en el cual se hallan expresados tanto CD69 como CD25. Como se muestra en la **Figura 4.1.1 A** y **B**, tanto en las células de pacientes como de individuos sanos, se observó una mayor expresión de CD69, en respuesta a ambos antígenos bacterianos, con respecto al cultivo sin estímulo. En los pacientes asmáticos se observó una diferencia significativa en el porcentaje de los LT CD3+CD69+ en respuesta a Mtb, con respecto a la respuesta a Spn, que no se observó en las células de los individuos sanos (**Figura 4.1.1 B**).

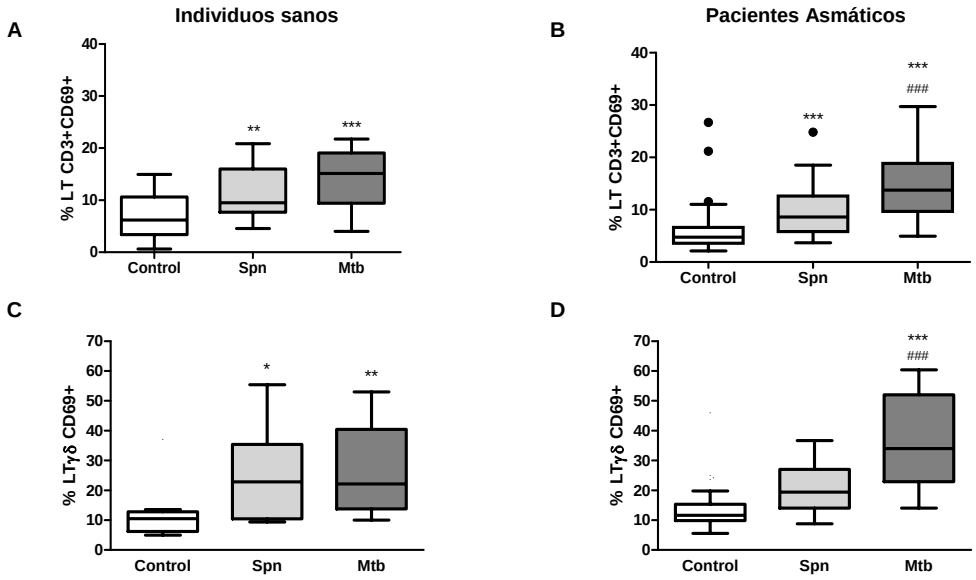

Figura 4.1.1. Porcentaje de LT CD69+ (A; B) LTγδ CD69+ (C; D), estimulados con antígenos bacterianos, provenientes de individuos Sanos (n=22) y de pacientes Asmáticos (n=39), a 48hs de cultivo - *p < 0.05, **p< 0.001 and ***p<0.0001 (vs. control); ### p<0.0001 (vs. Spn). ANOVA de una vía y test *post hoc* de Comparación Múltiple de Tukey.

Para los individuos sanos la expresión de CD69 en las células Tγδ fue significativamente diferente con respecto al control para ambos estímulos bacterianos pero no hubo diferencias significativas entre los dos estímulos (**Figura 4.1.1 C**). En los pacientes asmáticos la expresión de LTγδ CD69+ fue significativamente mayor cuando se estimuló con Mtb, con respecto a las células de los sanos o a aquellas estimuladas con Spn (**Figura 4.1.1 D**). Sin embargo la expresión de CD69 no se vio incrementada significativamente con Spn, con respecto al control sin estímulo. Esto podría indicar que las células Tγδ de los pacientes asmáticos podrían estar respondiendo de manera deficiente frente al Spn.

Para comparar el porcentaje de activación T frente a cada estímulo entre sanos y asmáticos, se relativizaron los datos con respecto a los controles sin estímulo. Los datos obtenidos se muestran en la **Figura 4.1.2**. En los individuos asmáticos se pudo ver que existe una tendencia a un menor porcentaje de expresión de CD69, frente al Spn, en los LT y las células Tγδ (**Figura 4.1.2 A** y **C**) - y a una mayor respuesta al Mtb - aunque las diferencias no son significativas.

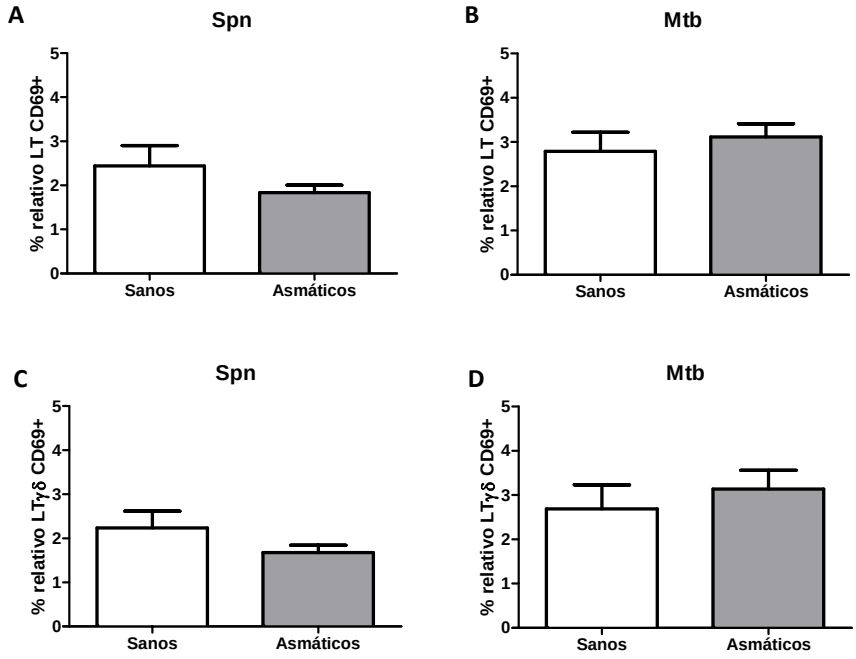

Figura 4.1.2. Porcentaje de LT CD69+ (A; B) y Tγδ CD69+ (C; D) estimulados con antígenos bacterianos, a 48hs de cultivo. Valores relativos para individuos Sanos (n=22) vs. Asmáticos (n=39) – No significativo. Test de Mann Whitney.

Al evaluar a un mismo paciente durante un periodo de estabilidad o durante un momento de crisis asmática, sólo se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de LTγδ CD69+, que fue mayor frente al estimulo con Spn, en los pacientes asmáticos durante la exacerbación (**Figura 4.1.3 C**). Cabe destacar que la significancia estadística obtenida para esta determinación, parece estar dada por tres pares de datos, correspondientes a tres pacientes asmáticos. No se encontró ningún factor particular (en cuanto a la edad o a la presentación clínica) que permitiera agruparlos por fuera del resto de los pacientes.

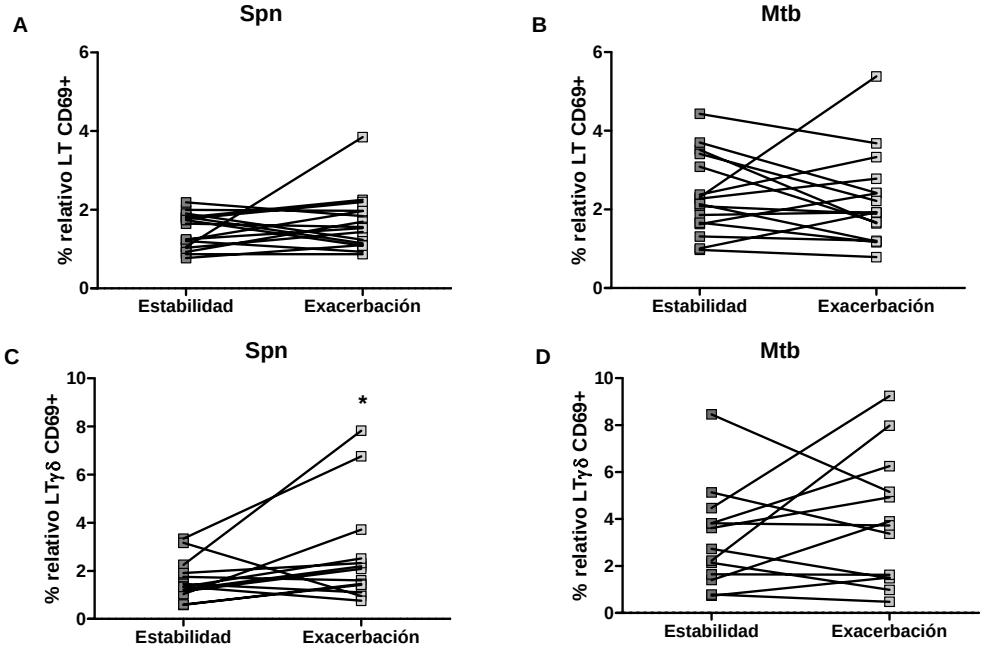

Figura 4.1.3. Porcentaje de LT CD69+ (A y B) y Tγδ CD69+ (C y D) estimulados con antígenos bacterianos, de un grupo de pacientes asmáticos en momentos de estabilidad y de exacerbación asmática (n=13), a 48hs de cultivo – *$p < 0.05$. Test de Wilcoxon signed-rank.

De todos estos datos se puede inferir que los pacientes asmáticos presentan una tendencia a un menor porcentaje de LT CD69+ y LTγδ CD69+ frente al Spn, con respecto a los individuos sanos. Esta diferencia sería más marcada para los LTγδ, que además expresan un menor porcentaje de CD69, cuando los pacientes asmáticos se encuentran durante un período de estabilidad.

Expresión de CD25

Se realizaron cultivos en presencia de los estímulos bacterianos con el fin de determinar los niveles de expresión de CD25 a 48hs y a 96hs dado que se conoce que el pico de expresión de esta molécula frente a antígenos micobacterianos se encuentra entre estos dos puntos [108]. Aunque se realizó la mayor parte de estos experimentos a 48hs de cultivo, en algunos casos evaluados los patrones de activación no fueron significativamente distintos a 96hs de cultivo (datos no mostrados). Como se muestra en la **Figura 4.1.4**, la expresión de CD25 a 48hs en los LT CD3+ y CD4+ aumentó significativamente tanto en individuos sanos como en pacientes asmáticos frente al estímulo con Mtb. La subpoblación CD8+ mostró un aumento en la expresión de CD25 solo frente al estímulo con Mtb en los pacientes asmáticos y no en los individuos sanos.

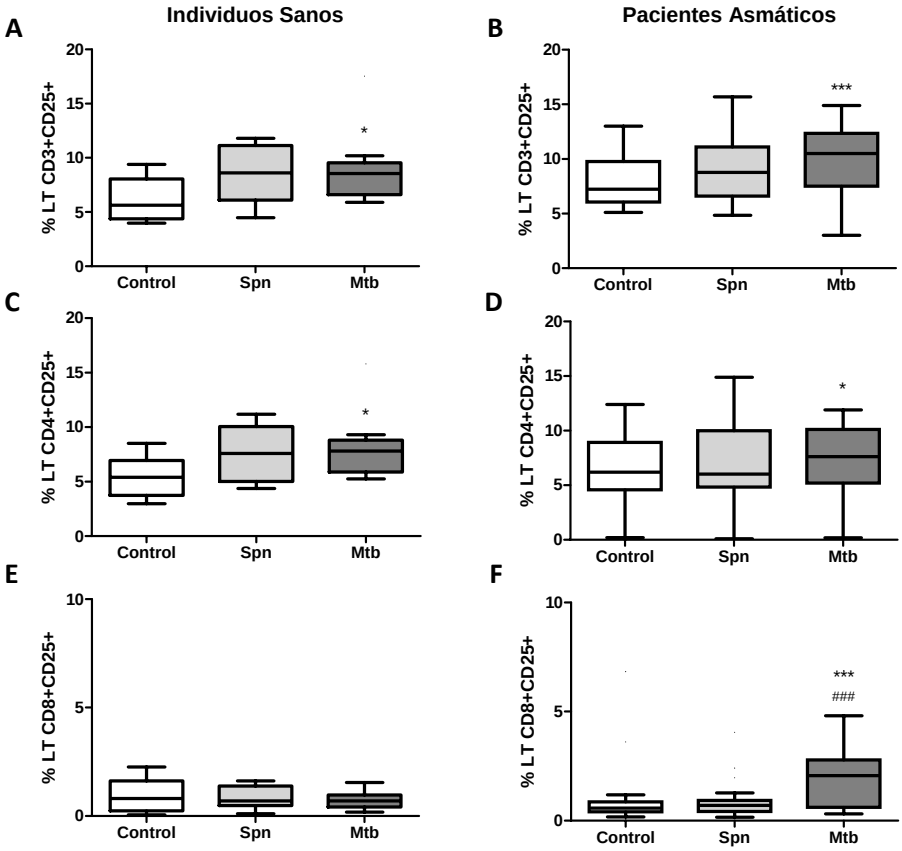

Figura 4.1.4. Porcentaje de LT CD3+CD25+ (A; B), LT CD4+CD25+ (C; D)) y LT CD8+CD25+ (E; F) estimulados con antígenos bacterianos, provenientes de individuos Sanos (n=22) y de pacientes Asmáticos (n=39), a 48hs de cultivo - *p < 0.05 y ***p<0.0001 (vs. control); ### p<0.0001 (vs. Spn). ANOVA de una vía y test *post hoc* de Comparación Múltiple de Tukey.

Para evaluar si existen diferencias entre sanos y asmáticos, en cuanto al porcentaje de las poblaciones T CD4+CD25+ y CD8+CD25+ frente a cada estímulo bacteriano, se relativizaron los datos de cultivos a 48hs y 96hs, con respecto a los controles sin estímulo (**Figura 4.1.5**). En los individuos asmáticos se observó una tendencia a un menor porcentaje de expresión de CD25 frente al Spn en los LT CD4+ y CD8+ a 48hs y 96hs, con respecto a los individuos sanos (**Figura 4.1.5 A** y **C**). Se pudo observar también que a 96hs de cultivo, en ambos grupos, el porcentaje de LT CD4+ y CD8+ que expresan CD25 es menor que a 48hs, siendo significativamente distinto para los LT CD8+CD25+ (**Figura 4.1.5 C**), lo que demuestra que el pico de expresión de esta molécula en nuestro modelo experimental es previo a las 96 horas. También se observó una tendencia a un mayor porcentaje de LT CD8+CD25+ frente al Mtb en los pacientes asmáticos, que no se observó para los LT CD4+CD25+ frente al mismo estímulo tanto a 48hs como a 96hs (**Figura 4.1.5 B** y **D**).

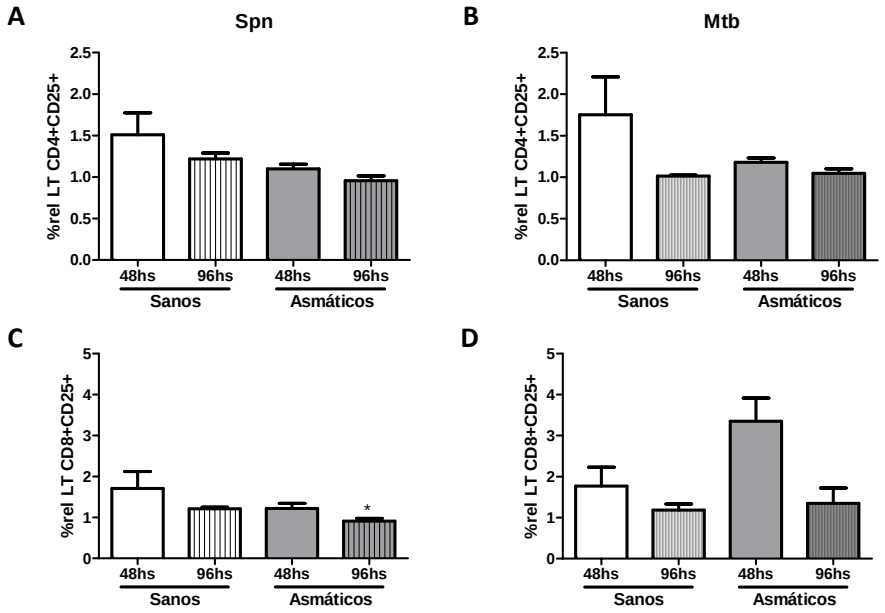

Figura 4.1.5. Porcentaje de LT: CD4+CD25+ (A; B) y CD8+CD25+ (C; D) estimulados con antígenos bacterianos, a 48hs de cultivo. Valores relativos para individuos sanos (48hs n= 22 y 96hs n=10) vs. Asmáticos (48hs n= 39 y 96hs n=20) – *$p < 0.05$. Test de Mann Whitney.

Al comparar para un mismo paciente asmático la expresión de CD25 entre el período de estabilidad y el momento de crisis asmática, no se detectaron diferencias significativas en respuesta al mismo antígeno bacteriano ni para Spn ni para Mtb

(**Figura 4.1.6**). Se observó que el porcentaje de LT CD8+CD25+ para ambas condiciones, es mucho mayor frente al estímulo con Mtb (**Figura 4.1.6 E** y **F**).

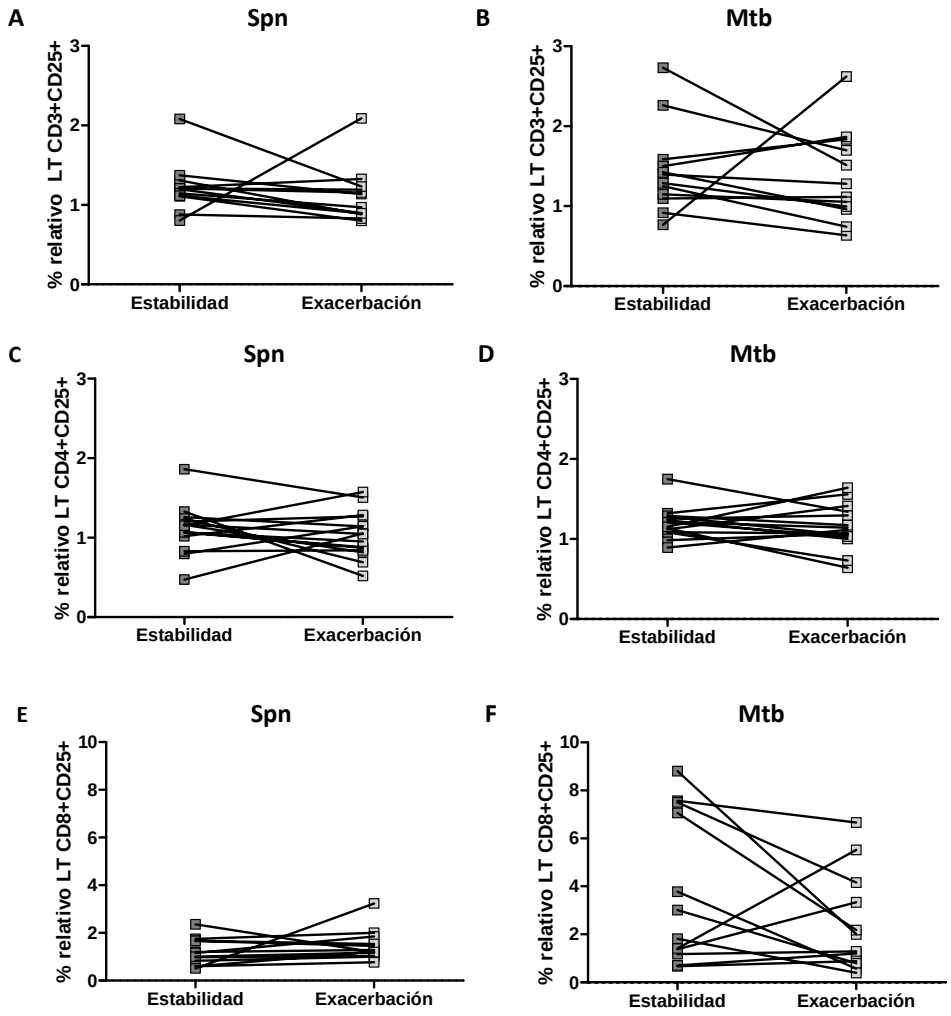

Figura 4.1.6. Porcentaje de LT (CD3+, CD4+ y CD8+) CD25 de un grupo de pacientes asmáticos en momentos de estabilidad y de exacerbación asmática (n=12) – No significativo. Test de Wilcoxon signed-rank.

Al observar los datos a 48 y 96 horas de manera global se puede inferir que en nuestro modelo de estudio el pico de expresión de CD25, frente a ambos estímulos bacterianos, se encontró hacia las 48hs de cultivo. En los individuos asmáticos se observó que existe una tendencia a un menor porcentaje de expresión de CD25 frente al Spn en los LT CD4+ y CD8+, con respecto a los individuos sanos. Solo el porcentaje de LT CD8+CD25+ frente al Mtb fue mayor en los pacientes asmáticos que en los sanos (**Figura 4.1.5. D**). Al comparar entre los pacientes en período de estabilidad y en momento de crisis, no se observaron diferencias significativas aunque se puede

apreciar que el nivel de activación de los LT CD8+CD25+ en ambas condiciones es mayor frente al Mtb, lo que es coherente con lo observado con respecto a los individuos sanos.

4.1.3. Capacidad de Producción de Citoquinas

Para conocer la capacidad de producción de Cks de las células obtenidas a partir de las distintas muestras de sangre, se evaluó la en los LT la producción de Cks frente a un estímulo policlonal. Se compararon los resultados obtenidos de muestras de pacientes asmáticos con respecto a los individuos sanos, los datos se muestran en la **Tabla 4.1.5**.

En los pacientes asmáticos se observó una producción menor de la Ck Th1 TNF-α, con respecto a los individuos sanos. También se observó una tendencia marcada hacia una producción menor de IFN-γ (otra Ck Th1) aunque no resultó ser significativa. En estos pacientes, sin embargo, se observó una producción significativamente mayor de IL-5, una Ck característica Th2, pero no se observaron diferencias para la IL-4 y la individuos IL-13, generalmente aumentadas en asma y en condiciones alérgicas o para IL-10, una Ck regulatoria.

	Sanos	Asmáticos
CD3+ TNF-α+	28,52 ± 5,70 (n=13)	**6.78 ± 2,73** (n=10) **
CD3+ IFN-γ+	15,99 ± 3,09 (n=13)	8,59 ± 3,71 (n=10)
CD3+ IL-4+	0,41 ± 0,11 (n=10)	0,39 ± 0,18 (n=10)
CD3+ IL-5+	0,31 ± 0,04 (n=12)	**1,78 ± 0,73** (n=10) *
CD3+ IL-13+	0,62 ± 0,22 (n=13)	0,60 + 0,27 (n=5)
CD3+ IL-10+	0,19 ± 0,05 (n=12)	0,17 ± 0,05 (n=8)

Tabla 4.1.5. Cks producidas por LT estimulados con PMA/ionomicina. Porcentaje de LTCD3+ que expresan: TNF-α, IFN- γ, IL-4, IL-5, IL-13 o IL-10; luego de la estimulación con PMA, provenientes de individuos sanos y de pacientes asmáticos - Resultados expresados como media ± error estándar, **$p < 0.001$; *$p < 0.05$. Test de Mann Whitney.

Con el fin de determinar el ambiente de Cks al que estaban expuestas las CMNP de los pacientes estudiados *in vivo*, se determinó la concentración de algunas Cks de

interés en muestras de suero. Los resultados que se presentan en la **Tabla 4.1.4**, muestran que en los pacientes asmáticos la concentración de IFN-γ en suero es menor y la de IL-5 es mayor con respecto a individuos sanos, mientras que no se encontraron diferencias significativas para la concentración de IL-10.

4.1.4. Producción de Citoquinas en Respuesta a los Antígenos Bacterianos

Como una segunda medida de la activación T, se evaluó mediante la técnica de ELISA, la producción de Cks en respuesta a los antígenos bacterianos, luego de estimular cultivos de CMNP con Spn o Mtb.

Cultivos a 48 horas	Individuos Sanos	Pacientes Asmáticos	
		Estabilidad	Exacerbación
IFN - γ (pg/ml)			
	(n=3)	(n=7)	(n=5)
Control sin estímulo	96,10 ± 60,10	79,20 ± 51,6	> 500
S. pneumoniae	> 500	> 500	> 500
M. tuberculosis	> 500	> 500	> 500
IL-5 (pg/ml)			
	(n=3)	(n=7)	(n=5)
Control sin estímulo	< 3,9	< 3,9	< 3,9
S. pneumoniae	< 3,9	6,50 ± 4,30	4,20 ± 2,60
M. tuberculosis	< 3,9	25,90 ± 17,00	14,30 ± 9,40
IL-10 (pg/ml)			
	(n=8)	(n=7)	(n=5)
Control sin estímulo	16,67 ± 6,42	20,58 ± 4,10	17,34 ± 6,46
S. pneumoniae	181,20 ± 55,31	169,80 ± 49,21	174,60 ± 27,54
M. tuberculosis	102,20 ± 24,13	140,80 ± 41,57	187,20 ± 39,64

Tabla 4.1.6. Concentración de IFN-γ, IL-5 e IL-10 en sobrenadantes de cultivos de CMNP a 48h en presencia de Spn y Mtb, o en ausencia de estímulo (Control). Los datos corresponden a individuos sanos y a pacientes asmáticos en períodos de estabilidad y en momentos de exacerbación asmática - Resultados expresados como media ± error estándar, no significativo. Test de Wilcoxon signed-rank.

Se midieron las Cks representativas de tres subpoblaciones linfocitarias (Th1, Th2 y Treg) en pacientes asmáticos tanto en período de estabilidad como en momentos de crisis (**Tabla 4.1.6**). En las células de los pacientes asmáticos en exacerbación se encontró una concentración de IFN-γ por encima del límite de detección del test utilizado, aun sin estímulo antigénico. Dado que, como ya se ha mencionado, el volumen de muestra obtenido era escaso, se realizaron diluciones pero no fueron suficientes para poder dar con un valor dentro del rango de la curva de detección y no fue posible obtener más material para repetir las mediciones con diluciones mayores de la muestra. De todos modos, una concentración tan elevada de IFN- γ podría indicar que las células de estos pacientes estaban previamente activadas resultando en una mayor producción de esta citoquina. Esto podría estar asociado a que dichas células provienen de muestras de sangre tomadas durante el momento de la exacerbación asmática. Para los individuos sanos y pacientes en período de estabilidad ese rango de concentración fue alcanzado al estimular con cualquiera de ambos antígenos bacterianos. Por otro lado, se observaron niveles altos de la citoquina Th2 IL-5 en los pacientes asmáticos en período de estabilidad, pero las diferencias no fueron significativas dada la gran dispersión de datos.

Finalmente, se evaluó la IL-10 como citoquina regulatoria. La producción de IL-10 se vio fuertemente estimulada tanto por Spn como por Mtb, al comparar con las células sin estímulo. Sus niveles no fueron significativamente distintos para ambos estímulos bacterianos ni entre asmáticos en períodos de estabilidad o en momentos de crisis.

4.2. ESTUDIOS EN PACIENTES SPAD

En una segunda etapa estudiamos pacientes SPAD teniendo en cuenta que estos niños también presentan una mayor frecuencia de infección por *S. pneumoniae* que los niños sanos. Además, estos pacientes suelen cursar con cuadros clínicos que en parte coinciden con los de los pacientes con asma atópico. En los individuos que presentan esta IDP se habían descripto anteriormente alteraciones en la maduración de los LB [78,79]. Estas alteraciones, así como las descriptas para las células dendríticas [11], se referían a cambios fenotípicos relacionados con la edad. Por este motivo, en los individuos SPAD, se tuvieron en cuenta dos rangos etarios distintos: 7-14 y 14-19 años, utilizando muestras provenientes de individuos sanos de las mismas edades como control. De esta manera se pudo abordar el estudio de cambios fenotípicos en algunos tipos celulares con respecto a la edad.

4.2.1. Caracterización de Distintos Tipos Celulares del Sistema Inmune

Se evaluaron algunas poblaciones celulares del sistema inmune cuyas alteraciones podrían estar relacionadas a una menor respuesta celular frente al *S. pneumoniae*.

Linfocitos T

Para evaluar si los porcentajes de subpoblaciones T de los pacientes SPAD difieren con respecto a los valores obtenidos para los individuos sanos, se evaluó el porcentaje de células T en sangre entera a 0hs, por citometría de flujo. Como puede verse en la **Tabla 4.2.1**, no existen diferencias significativas entre el porcentaje de LT CD3+, CD4+ y CD8+ de los pacientes SPAD y los individuos sanos.

0 horas	Individuos Sanos	SPAD
% LT:		
CD3+	68,0 ± 4,35	60,63 ± 4,38
CD3+ CD4+	53,15 ± 3,60	44,89 ± 3,60
CD3+ CD8+	20,80 ± 2,17	21,07 ± 1,77

Tabla 4.2.1. Porcentaje de células T CD3+, CD4+ y CD8+ analizado ex vivo (0hs), en individuos sanos (n=7) y en pacientes SPAD (n=7). Resultados expresados como media ± error estándar, no significativo. Test de Mann Whitney.

Las poblaciones celulares que expresan CD3, CD4, CD8, TCRγδ y los marcadores de activación CD25 o CD69, fueron evaluados *ex vivo* en CMNP de pacientes SPAD y de individuos sanos. Además de evaluar los LT CD4 y CD8, CD69+ o CD25+, también se evaluó la población de LT CD4+CD27+ como forma alternativa de determinar el grado de activación en estas células, inmediatamente luego de ser tomada la muestra de sangre [99]. Como puede verse en la **Tabla 4.2.2**, en los individuos sanos de 14-19 años de edad existe un menor porcentaje tanto de LT CD3+CD69+, como de LT CD3+CD25+, de LT CD4+CD25+ y de LT CD8+CD25+, que en los individuos sanos de 7-14 años de edad. Estas diferencias asociadas a la edad no se evidencian en los individuos SPAD. No se encontraron diferencias significativas con respecto a la edad en individuos sanos y en pacientes SPAD, ni entre ellos en un mismo rango etario, para la expresión en membrana de la molécula CD27 (**Tabla 4.2.2**).

0 horas	Individuos sanos		SPAD	
% LT:	7 - 14 años	14 - 19 años	7 - 14 años	14 - 19 años
	(n=7)	(n=15)	(n=11)	(n=7)
CD69+ (CD3+)	2.95 ± 0.59	**0.68 ± 0.23** ***	1.41 ± 0.39	1.21 ± 0.58
CD4+ CD69+	0.26 ± 0.05	0.35 ± 0.10	0.65 ± 0.20	0.50 ± 0.12
CD8+ CD69+	0.07 ± 0.02	0.43 ± 0.21	**0.72 ± 0.30** ##	0.48 ± 0.25
CD25+ (CD3+)	6.12 ± 1.62	**0.98 ± 0.13** ***	**1.99 ± 0.51** #	**2.20 ± 0.50** #
CD4+ CD25+	3.94 ± 1.17	**0.72 ± 0.11** **	**0.94 ± 0.22** #	1.33 ± 0.40
CD8+ CD25+	0.66 ± 0.22	**0.18 ± 0.03** *	0.18 ± 0.03	0.38 ± 0.18
CD27+ (CD4+)	55.81 ± 2.72	53.58 ± 5.00	54.75 ± 5.94	43.27 ± 1.46
CD27+ (CD8+)	34.34 ± 3.50	26.41 ± 2.65	33,97 ± 4.14	34.83 ± 5.31

Tabla 4.2.2. Porcentaje de LT CD3+, CD4+ y CD8+ que expresan los marcadores de activación CD69, CD25 y CD27, en individuos sanos y en pacientes SPAD de 7-14 y de 14 a 19 años de edad a 0hs - Resultados expresados como media ± error estándar, *p < 0.05, **p< 0.001 y ***p<0.0001 (7-14 vs. 14-18); # p< 0.05, ## p<0.001 (Sano vs. SPAD). ANOVA de una vía y test *post hoc* de Comparación Múltiple de Tukey.

Para la evaluación de las células regulatorias CD4+CD25+Foxp3+ en los pacientes SPAD se consideró un único grupo y se comparó con respecto a los individuos sanos de 7 - 19 años, dado que fue imposible obtener suficiente volumen de muestra para realizar esta determinación en todos los individuos estudiados y, por lo tanto, poder separarlos por edad. Los datos se muestran en la **Tabla 4.2.3**, donde se observa que los pacientes en general parecen tener un menor porcentaje de células regulatorias Foxp3+ que los individuos sanos.

0 horas	Individuos sanos	SPAD
% Células Treg:	(n=15)	(n=7)
CD4+ CD25+ Foxp3+	0.70 ± 0.09	**0.34 ± 0.07** *
CD25+ Foxp3+ (CD4)	33.50 ± 7.02	18.53 ± 3.72

Tabla 4.2.3. Porcentaje de células CD4+CD25+Foxp3+ en CMNP y proporción de células CD25+Foxp3+ dentro de la población CD4+ a 0hs - Resultados expresados como media ± error estándar, *p < 0.05. Test de Mann Whitney.

Alternativamente, se utilizaron otros marcadores de membrana que son útiles para medir los porcentajes de células regulatorias en CMNP por citometría de flujo. Se consideraron LTreg las poblaciones: CD4+CD25+CD127- [100] y CD4+CD25+CD39+ [101]. En este caso fue posible tener suficiente material para realizar las determinaciones en la mayoría de los individuos estudiados y separar por rangos etarios los datos obtenidos. No se encontraron diferencias significativas con respecto a la edad en individuos sanos y en pacientes SPAD, ni entre ellos para un mismo rango etario (**Tabla 4.2.4**).

0 horas	**Individuos sanos**		**SPAD**	
	7 - 14 años	**14 - 19 años**	**7 - 14 años**	**14 - 19 años**
% Treg:	(n=7)	(n=8)	(n=7)	(n=5)
CD4+CD25+ CD127-	1.46 ± 0.33	1.16 ± 0.34	1.29 ± 0.21	1.72 ± 0.19
CD4+CD25+ CD39+	1.78 ± 0.38	1.54 ± 0.48	1.27 ± 0.23	1.35 ± 0.58
% Th17:	(n=7)	(n=8)	(n=6)	(n=5)
CD4+CD161+ CCR6+	7.95 ± 1.47	7.27 ± 0.62	6.89 ± 1.11	6.53 ± 1.05
% LTγδ:	(n=7)	(n=15)	(n=5)	(n=5)
CD3+γδ	7.85 ± 1.40	6.74 ± 1.19	4.00 ± 0.80	4.17 ± 1.71

Tabla 4.2.4. Porcentaje de células Treg, células Th17 y células Tγδ a 0 hs, en CMNP. Mann Whitney test.

Con el fin de observar si al momento de la toma de la muestra existen diferencias en cuanto al porcentaje de células Th17 , en los individuos sanos y en los pacientes SPAD, se utilizaron marcadores de membrana alternativos a la expresión de IL-17 para detectar dicha subpoblación en las CMNP. Se evaluaron las células CD4+CD161+CCR6+ [109] (**Tabla 4.2.4**) y no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de las mismas asociadas a la edad, ni entre sanos y pacientes.

Al igual que en los pacientes asmáticos, se decidió determinar el porcentaje de LTγδ en las CMNP, dado que se ha descripto su importancia en la respuesta a infecciones bacterianas (**Tabla 4.2.4**). No se observaron diferencias significativas con

respecto a los rangos etarios en los individuos sanos o en los pacientes SPAD. Aunque existe una tendencia a una disminución en el porcentaje de LTγδ en las CMNP de estos pacientes, no se observaron diferencias significativas con respecto a los individuos sanos a una misma edad.

Por otro lado, se consideró importante evaluar en el conjunto de LT CD3+ la expresión de CD45RA o CD45RO para distinguir entre LT *naive* y LT de memoria respectivamente y la expresión en estas células de CD27 como marcador de capacidad de activación celular a 0hs en las CMNP. Se muestran los resultados en la **Tabla 4.2.5**. Si bien no es significativo, se observó que tanto los individuos sanos como los pacientes SPAD mayores a 14 años de edad presentan un menor porcentaje de LT CD45RA+. En cuanto a los LT CD45RO+, se observó que los individuos sanos mayores de 14 años presentan un mayor porcentaje de estas células con respecto a los individuos de 7-14 años; que no se observa en los pacientes SPAD.

0 horas	**Individuos sanos**		**SPAD**	
% LT:	**7 - 14 años**	**14 - 19 años**	**7 - 14 años**	**14 - 19 años**
	(n=7)	(n=15)	(n=11)	(n=7)
C45RA+	71.93 ± 2.49	41.49 ± 2.58	72.19 ± 2.42	36.53 ± 1.73
CD45RA+ CD27+	62.94 ± 3.06	**50.05 ± 2.76** *	59.04 ± 3.41	55.90 ± 2.52
CD45RA+ CD27-	4.00 ± 1.25	15.44 ± 3.78	5.42 ± 0.92	**14.77 ± 2.68** *
CD45RO+	13.21 ± 1.50	**20,68 + 2.47** *	14.41 ± 1.51	11.52 ± 1.18
CD45RO+ CD27+	13,51 ± 1,53	**21.09 ± 3.07** *	16.06 ± 2.08	**11.47 ± 1.32** #
CD45RO+ CD27-	2.96 ± 1.27	4.87 ± 0.73	3.68 ± 0.78	5.83 ± 1.62

Tabla 4.2.5. Porcentaje de LT *naive* y LT de memoria a 0hs - * $p< 0.05$ (7-14 vs. 14-20) - Resultados expresados como media ± error estándar, # $p< 0.05$ (Sanos vs SPAD). Test de Mann Whitney.

En los individuos sanos se observó una disminución significativa de LT CD45RA+CD27+ a edades mayores (**Figura 4.2.1 A** y **Tabla 4.2.5**). A su vez, se observó un aumento significativo de las células CD45RO+CD27+, lo que representa un aumento de la población de LT de memoria (**Figura 4.2.1 B** y **Tabla 4.2.5**).

En los pacientes SPAD dichos cambios no se observaron (**Figura 4.2.1 A** y **B**), lo que sugiere una posible alteración en cuanto al desarrollo asociado a la edad de respuestas de memoria en los pacientes SPAD, con respecto a los individuos sanos.

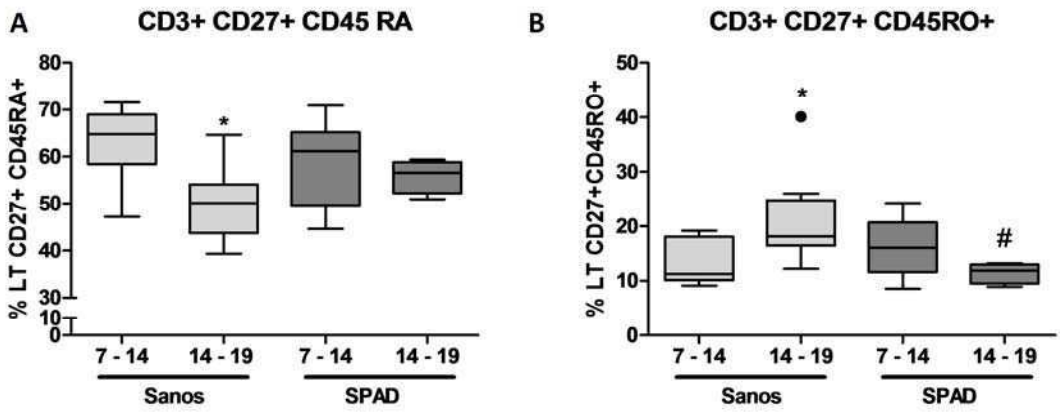

Figura 4.2.1. Porcentaje de LT CD3+CD27+CD45RA+ y CD3+CD27+CD45RO+, en individuos sanos y en pacientes SPAD de 7-14 y de 14 a 20 años de edad a 0hs - * $p< 0.05$ (7-14 vs. 14-20) - # $p< 0.05$ (Sanos vs. SPAD). Test de Mann Whitney.

Monocitos

Los Mo son células que, frente a infecciones bacterianas por neumococos, contribuyen en gran medida a que los LT se perfilen de manera correcta hacia la respuesta celular requerida para desarrollar respuestas, tanto efectora como de memoria, suficientes para controlar la infección [7]. Por ello se decidió caracterizar las distintas subpoblaciones de Mo en los pacientes SPAD.

Se evaluaron a 0hs tres poblaciones distintas de Mo según la expresión de los marcadores CD14 y CD16: los Mo clásicos CD14++CD16-, los Mo CD14++CD16+ y los Mo CD14+CD16+. En los individuos sanos de edades mayores, se observó un aumento del porcentaje de Mo CD14++CD16- a expensas de una disminución en el porcentaje de Mo CD14++CD16+, sin cambios en los porcentajes de Mo CD14+CD16+ (**Tabla 4.2.6** y **Figura 4.2.2**), con respecto a los individuos de 7 -14 años. En los pacientes SPAD, por el contrario, no se observaron estos cambios aparentemente asociados a la edad lo que podría implicar una alteración en el desarrollo normal de los Mo. Hasta donde sabemos no se han reportado aún los valores correspondientes a las tres poblaciones

de Mo evaluadas en individuos sanos pediátricos. Es importante destacar que si se evalúa la proporción de Mo CD14++ CD16-/CD16+, los pacientes SPAD poseen un mayor porcentaje de Mo CD16+ que los individuos sanos de 14 -19 años.

0 horas	Individuos sanos		SPAD	
% Mo	7 - 14 años	14 - 19 años	7 - 14 años	14 - 19 años
	(n=7)	(n=15)	(n=11)	(n=7)
CD14++CD16-	52.64 ± 9.01	**89.79 ± 1.34***	**76.30 ± 4.30 #**	**80.02 ± 5.25 #**
CD14++CD16+	39.83 ± 9.69	**6.97 ± 1.35***	**15.32 ± 3.67 #**	**19.19 ± 4.58 ##**
CD14+CD16+	3.96 ± 0.61	3.11 ± 0.33	6.52 ± 1.23	5.65 ± 1.07

Tabla 4.2.6. Porcentaje de Mo CD14++CD16-, CD14++CD16+ y CD14+CD16+ a 0hs - Resultados expresados como media ± error estándar, * p< 0.05 (7-14 vs. 14-18) ; #p< 0.05; ##p< 0.001 (Sanos vs. SPAD). Test de Mann Whitney.

El grupo de Balboa y colaboradores ha descripto recientemente que en los pacientes tuberculosos, los Mo son menos propensos a diferenciarse a CD capaces de efectuar una correcta presentación antigénica y que esto puede deberse a que en estos pacientes existe una mayor proporción de Mo CD16+ con respecto a los Mo CD16- [110]. La proporción de Mo CD16-/CD16+ alterada que se observa en los pacientes SPAD con respecto a los individuos sanos (para ambos rangos etarios, como se observa en la **Figura 4.2.2 B** y **C**) podría tener consecuencias sobre la respuesta T celular frente al neumococo y a otras bacterias Gram positivas en estos pacientes. Además, estos datos correlacionan con los datos del grupo de Jyonouchi y cols., que ha reportado que en los pacientes SPAD existen alteraciones en cuanto al desarrollo dependiente de la edad de las CD *per se* [11].

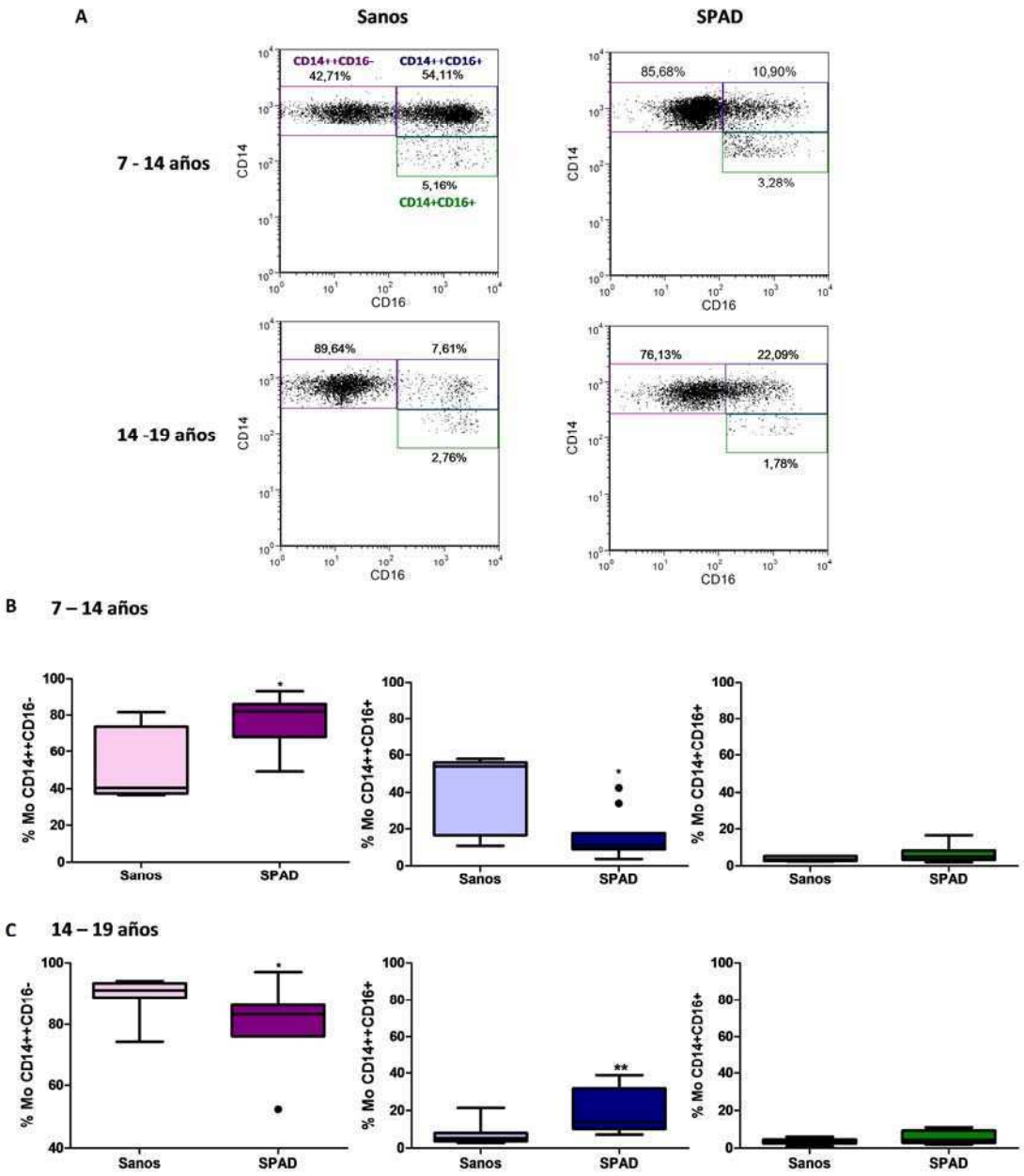

Figura 4.2.2. Subpoblaciones de Mo: CD14++CD16-, CD14++CD16+ y CD14+CD16+ en pacientes SPAD y en individuos sanos (A) dot plots para ambos rangos etarios, (B) sanos (n=7) vs. SPAD (n=11) de 7-14 años y (C) sanos (n=15) vs. SPAD (n=7) de 14-19 años - *p< 0,05; **p<0,001. Test de Mann Whitney.

Células NK

Se estudiaron distintas subpoblaciones de células NK presentes en sangre periférica, definiéndolas mediante los marcadores CD56 y CD16 a 0hs. Las NK $CD56^{dim}$CD16+ que normalmente contienen altas concentraciones de perforina y son altamente citotóxicas,las NK $CD56^{bright}$CD16- que se caracterizan por ser productoras de Cks y cumplen funciones inmunorregulatorias en órganos linfoides secundarios y

las NK CD56-CD16+ que en patologías infecciosas, como la producida por el HIV, se ven aumentadas y se describen como células NK anérgicas [111]. Nuevamente, se estudiaron los datos de pacientes SPAD con respecto a los individuos sanos de 7 - 19 años, dado que fue imposible obtener suficiente volumen de muestra para realizar esta determinación en todos los individuos estudiados y separarlos por edad. Los resultados obtenidos se observan en la **Figura 4.2.3**.

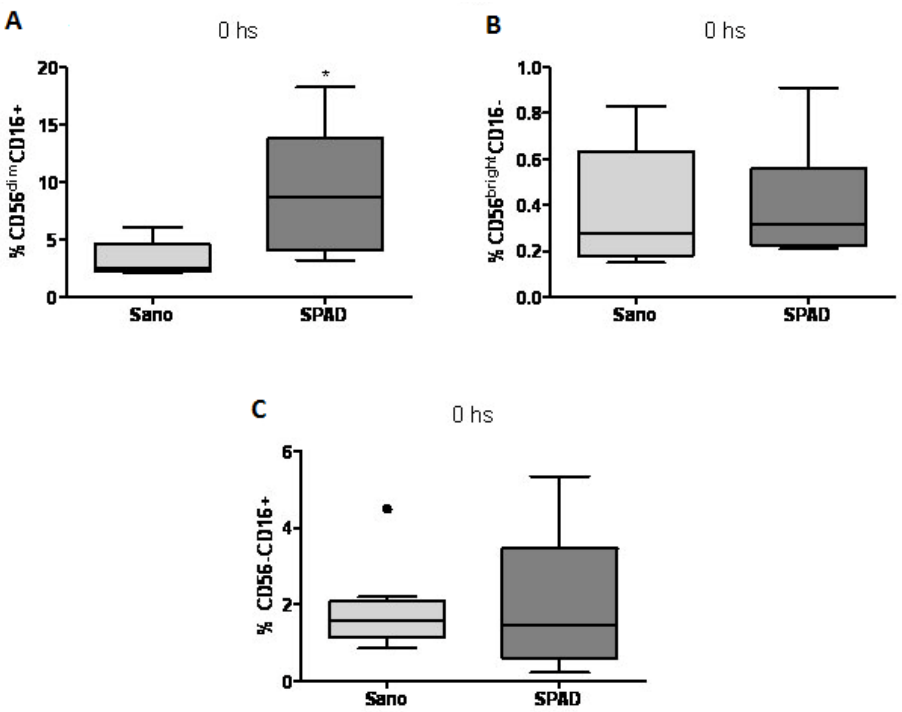

Figura 4.2.3. Porcentaje de células NK presentes en sangre periférica a 0hs: a) $CD56^{dim}CD16+$, b) $CD56^{bright}CD16-$, y c) CD56-CD16+, en individuos sanos (n=8) y pacientes SPAD (n=5) - *p<0,05. Test de Mann Whitney.

Se observó un mayor porcentaje de células $CD56^{dim}CD16+$ en los pacientes SPAD, con respecto a los individuos sanos (**Figura 4.2.3 A**). No se observaron diferencias significativas entre individuos sanos y pacientes SPAD para las otras dos subpoblaciones NK estudiadas (**Figura 4.2.3 B** y **C**), aunque parece haber una tendencia a un aumento en el porcentaje de la población CD56-CD16+ en los pacientes SPAD, con respecto a los individuos sanos (**Figura 4.2.3 C**). Se ha descripto que en los individuos sanos las células NK $CD56^{dim}$ se desarrollan a partir de las células NK $CD56^{bright}$, lo que mantiene un porcentaje menor de estas últimas en sangre periférica [9]. Asimismo, se ha reportado que las NK $CD56^{dim}CD16+$ pueden considerarse

en un grado más avanzado de maduración y diferenciación con respecto a las NK $CD56^{bright}CD16$-, debido a que expresan en mayor proporción KIRs y granzima B, pero son menos activas funcionalmente dado que poseen una menor capacidad de desgranulación y proliferación [112,113]. Si bien estos resultados parecen mostrar una alteración en cuanto a la distribución de las subpoblaciones NK estudiadas en los pacientes SPAD, con respecto a los individuos sanos, sería necesario realizar estudios a distintas edades para confirmarlo. Dado el escaso volumen de la muestra, como ya se ha mencionado, no fue posible realizar estos experimentos en todos los individuos estudiados. Sin embargo, en algunos individuos fue posible estudiar la funcionalidad de estas subpoblaciones NK, evaluando su capacidad de producir IFN-γ, estos datos se muestran más adelante.

4.2.2. Evaluación de la Respuesta Celular Efectora

Dado que en los pacientes SPAD se observaron alteraciones en los porcentajes de muchas de las subpoblaciones de LT, Mo y NK estudiadas a 0hs, se realizaron estudios con el fin de analizar la funcionalidad de estas células, comparando con las de individuos sanos.

Linfocitos T

En algunas subpoblaciones T habíamos encontrado diferencias en cuanto a la expresión de marcadores de activación a 0hs. Por ello se evaluó su capacidad de producir Cks frente a un estímulo policlonal. Los datos de los cultivos a 5hs se muestran en la **Tabla 4.2.7**. No se observaron diferencias significativas entre los individuos sanos y los pacientes SPAD, en cuanto a la capacidad de producción de ninguna de las Cks estudiadas.

	Sanos	SPAD
% LT:	(n=15)	(n=7)
CD3+ TNF-α+	28,52 ± 5,70 (n=13)	26,03 ± 4,00 (n=11)
CD3+ IFN-γ+	15,99 ± 3,09 (n=13)	22,53 ± 7,84 (n=10)
CD3+ IL-4+	0,41 ± 0,11 (n=10)	0,64 ± 0,14 (n=11)
CD3+ IL-5+	0,31 ± 0,04 (n=12)	0,47 ± 0,08 (n=11)
CD3+ IL-13+	0,62 ± 0,22 (n=13)	0,57 ± 0,14 (n=11)
CD3+ IL-10+	0,19 ± 0,05 (n=12)	0,40 ± 0,08 (n=11)

Tabla 4.2.7. Cks producidas por LT estimulados con PMA/ionomicina. Porcentaje de LTCD3+ que expresan: TNF-α, IFN- γ, IL-4, IL-5, IL-13 o IL-10; luego de la estimulación con PMA, provenientes de individuos sanos y pacientes SPAD – expresados como media ± error estándar, no significativo. Test de Mann Whitney.

Monocitos

Dado que al estudiar los Mo a 0hs se encontraron alteraciones en la expresión de CD14 y CD16 en las células de los pacientes SPAD, con respecto a las células de los individuos sanos, se decidió evaluar la funcionalidad de los mismos. Estos estudios se

realizaron para los individuos de 14-19 años, rango de edad en donde se observó que los pacientes SPAD presentan una porcentaje mayor de Mo CD14++CD61+, lo que se ha asociado anteriormente a una capacidad alterada de diferenciación a CD y a una falla consecuente en la capacidad de funcionar como célula presentadora de antígeno y "perfilar" de manera correcta a los LT efectores [110].

El CD16 es un marcador de membrana cuya expresión se modifica espontáneamente en cultivos a tiempos largos, por ello se realizó una curva de pérdida de expresión espontánea de esta molécula para las tres subpoblaciones de Mo analizadas, en muestras de individuos sanos. En la **Figura 4.2.4 A**, se muestra un ejemplo de cómo esto puede impactar sobre el porcentaje de las distintas subpoblaciones de Mo en el tiempo, a partir de una muestra de un dador sano. Se puede observar que luego de las 4hs el porcentaje de las tres subpoblaciones varía con respecto a 0hs. Por ello se decidió evaluar la capacidad de producción de TNF-α de las tres subpoblaciones de Mo a 4hs de cultivo, frente al estímulo con Spn, en pacientes SPAD y en individuos sanos de 14 - 19 años de edad.

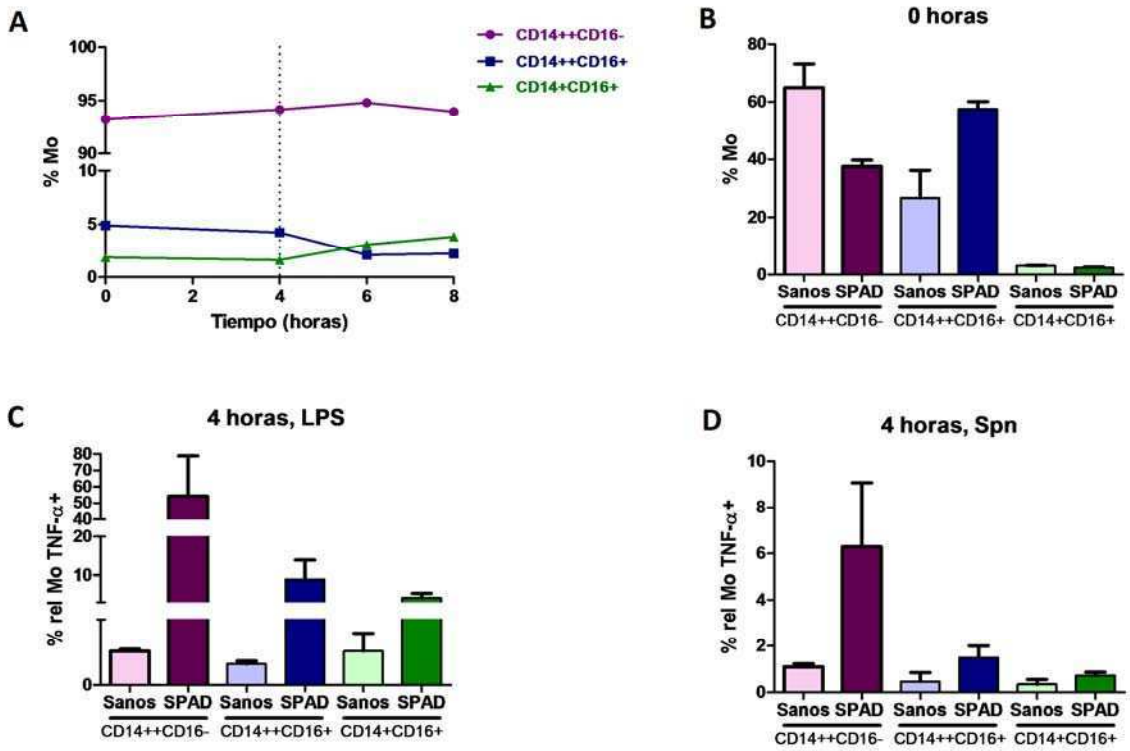

Figura 4.2.4. Cultivos de sangre entera sin estímulo a 0, 4 y 6 horas de una muestra de un donante sano (A). Determinaciones en sangre entera de individuos sanos (n=5) y pacientes SPAD (n=5) de 14-19 años de edad: monocitos CD14++CD16-, CD14++CD16+ y CD14+CD16+ a 0hs sin estímulo (B); a 4hs en presencia de LPS (C); a 4hs en presencia de Spn (D) – No significativo. Test de Mann Whitney.

Se pueden observar los porcentajes de Mo en sangre entera a 0hs en la **Figura 4.2.4 B**, que se corresponden con lo observado también a 0hs en las CMNP de individuos de 14 – 19 años. Al estimular estas células con Spn y LPS fue posible observar un aumento en la producción de TNF-α en las tres subpoblaciones de Mo, que fue más marcado en los pacientes SPAD que en los individuos sanos (**Figura 4.2.4 C** y **D**), aunque las diferencias no fueron significativas. En nuestro caso, los Mo CD14++CD16- fueron los mayores productores de TNF-α en los individuos sanos, pero en los individuos SPAD esta tendencia fue mayor, aunque presentaron un menor porcentaje de esta población, con respecto a los individuos sanos.

Debido a que no fue posible en nuestras condiciones experimentales poder medir a tiempos largos la producción de Cks en las tres subpoblaciones de Mo estudiadas, decidimos al menos evaluar qué ocurría a tiempos más largos con los Mo CD14++. Se evaluó la producción de TNF-α e IL-10 en los Mo CD14++ a 48hs de cultivo frente al estímulo con Spn, los datos se muestran en la **Figura 4.2.5**.

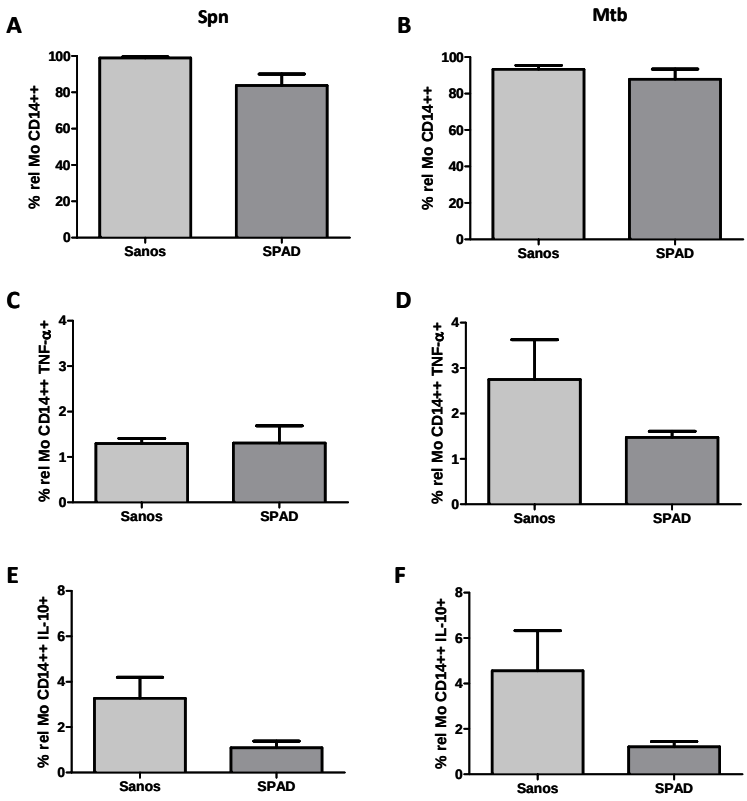

Figura 4.2.5. Porcentaje relativo de Mo CD14++, Mo CD14++TNF-α+ o IL-10+ frente al estímulo con Spn (A, C y E) y Mtb (B, D y F) a 48hs de cultivo entre individuos sanos (n=5) y pacientes SPAD (n=5). No significativo. Test de Mann Whitney.

No se observaron diferencias significativas entre individuos sanos y pacientes SPAD para ninguno de los parámetros medidos, aunque en los pacientes SPAD parece haber una tendencia a un menor porcentaje de Mo CD14++ (**Figura 4.2.5 A** y **B**) y una menor producción de TNF- α e IL-10 frente al estímulo con Mtb (**Figura 4.2.5 D** y **F**). En los Mo CD14++ de los pacientes SPAD no se observan diferencias en cuanto a la producción de TNF- α frente al estímulo con Spn, pero sí parece haber una tendencia a una menor producción de IL-10, con respecto a los individuos sanos.

Células NK

Luego de ser activadas, la actividad citotóxica de las células $CD56^{bright}$ puede ser igual o mayor que la de las células $CD56^{dim}$, pero se las ha implicado más en la producción de Cks como el IFN-γ, que en la capacidad de generar muerte por citotoxicidad. En las etapas tempranas de infección las Cks liberadas por células como los Mo y las células NK pueden colaborar en la modulación de la respuesta adaptativa. Por ello se decidió analizar también la capacidad de producción de IFN-γ de las subpoblaciones de células NK: $CD56^{bright}$CD16- y $CD56^{dim/-}$CD16+ en individuos sanos y pacientes SPAD. Se cultivaron CMNP con Spn, Mtb o sin estímulo, durante 24hs. En estas condiciones experimentales, en los individuos sanos, se esperaría encontrar un aumento en la producción de IFN-γ, principalmente en las células $CD56^{bright}$CD16-, frente a los estímulos bacterianos [114]. Los datos se presentan en la **Figura 4.2.6**. Se puede observar que ambas subpoblaciones NK producen IFN-γ, en especial frente al estímulo con Mtb. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la producción de IFN-γ, entre individuos sanos y pacientes SPAD (**Figura 4.2.6 C**, **D**, **G** y **H**). Las células $CD56^{dim}$CD16+ que se vieron aumentadas a 0hs en los pacientes SPAD, no presentaron diferencias significativas en cuanto a la producción de IFN-γ, con respecto a los individuos sanos. Es posible ver una tendencia a una mayor producción de IFN-γ por parte de las células $CD56^{bright}$CD16- frente al estímulo con Spn en los pacientes SPAD, con respecto a los individuos sanos, que no se observa frente a Mtb (**Figura 4.2.6 C** y **D**).

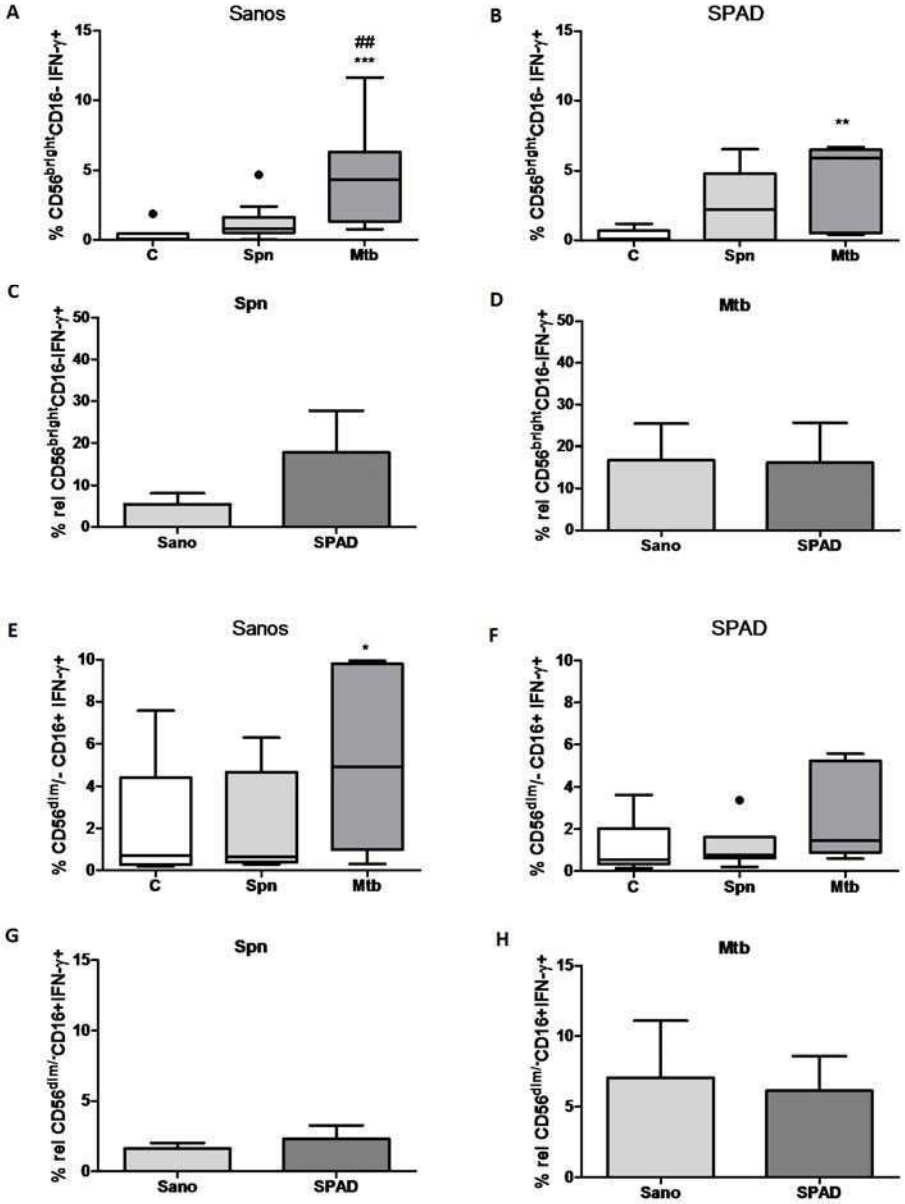

Figura 4.2.6. Cultivos de CMNP a 24 horas. Capacidad de producción de IFN-γ frente a antígenos bacterianos de células NK CD56^{bright}CD16- o CD56^{dim}CD16- en individuos sanos (A, E; n=5) y en pacientes SPAD (B, F; n=5) - y entre ellos para cada estímulo: Spn (C, G) y Mtb (D, H) - *p < 0.05, **p< 0.001 y ***p<0.0001 (**C**ontrol vs. Spn o **C**ontrol vs. Mtb); ### p<0.0001 (Mtb vs. Spn). Test de Mann Whitney.

Linfocitos Th17 y Th1

Se evaluó la producción de IL-17 e IFN-γ en los LT CD4+. Se cultivaron CMNP con Spn, Mtb o sin estímulo, durante 48hs. En los pacientes SPAD no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de LT CD4+IL-17+IFN-γ+ o LT CD4+IL-17+

frente a Spn, con respecto a los individuos sanos (**Figura 4.2.7 A** y **C**). Tampoco se observaron diferencias significativas en los porcentajes de LT CD4+ IFN-γ+ frente a Spn, aunque se observó una tendencia a un menor porcentaje de estas células en los pacientes SPAD (**Figura 4.2.7 D**). Al estudiar qué ocurre con la producción de Cks inflamatorias de los LT CD4+ frente al Mtb, se observó una tendencia a una menor respuesta de las tres subpoblaciones efectoras evaluadas en los pacientes SPAD, con respecto a los individuos sanos. Teniendo en cuenta que todos los individuos han sido vacunados con la vacuna BCG, estos datos, aunque no son significativos, dan cuenta de que la capacidad de respuesta T frente al Mtb de estos pacientes, parece diferir de la capacidad de respuesta de los individuos sanos.

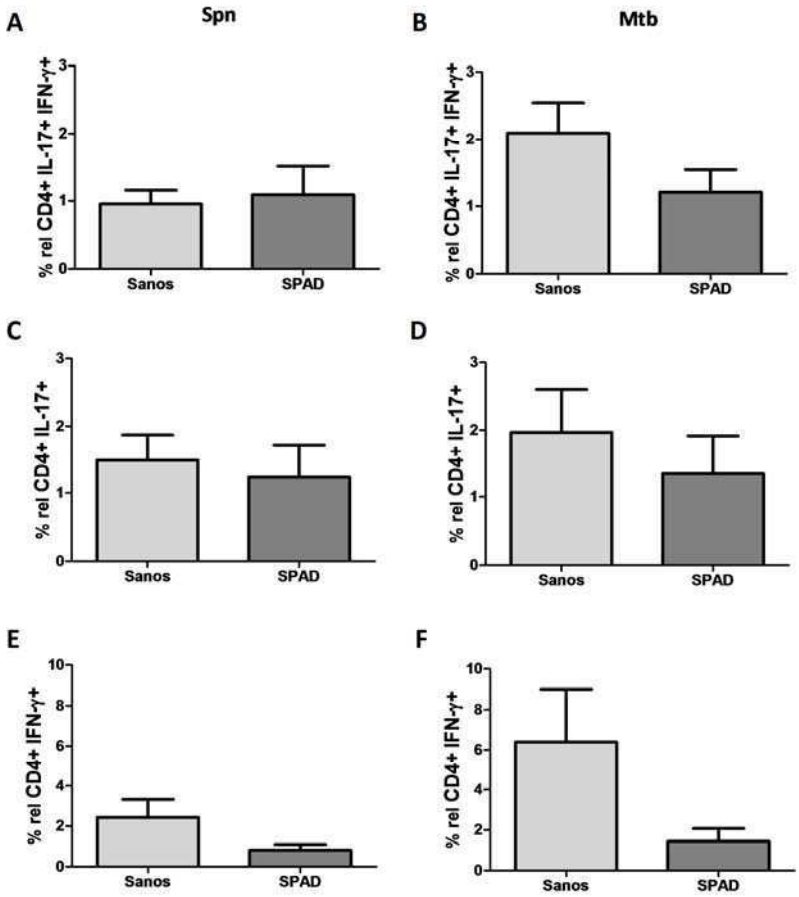

Figura 4.2.7: Porcentaje relativo de LT CD4+IL-17+IFN-γ+, LT CD4+IL-17+ o LT CD4+IFN-γ+ frente al estímulo con Spn (A, C y E) y Mtb (B, D y F)) a 48hs de cultivo entre individuos sanos (n=5) y pacientes SPAD (n=5). No significativo. Test de Mann Whitney.

Linfocitos T CD4+ IL-9+

La IL-9 se ha considerado históricamente como una Ck Th2 dado que se ha demostrado que promueve la inflamación de origen alérgica y ha sido asociada a diversas respuestas Th2 [115]. Recientemente se ha descripto una subpoblación de células Th CD4+, productora de IL-9 (las células Th9), distinta de las células Th1, Th2, o Th17 [116,117]. En ratones éstas células se diferencian a partir de LT *naive* CD4+ en presencia de TGF-β e IL-4 y se caracterizan por producir IL-9 e IL-10 [116,117]. Se ha reportado que las células Th9 son capaces de inducir inflamación tisular en un modelo de colitis [118] y que se ven aumentadas en muestras de efusiones pleurales provenientes de pacientes tuberculosos [119]; sin embargo, no se ha estudiado su contribución frente a la infección por el *S. pneumoniae*.

Por ello se decidió evaluar en individuos sanos y en pacientes SPAD la producción de IL-9 en LT CD4+ y en LT CD8+, en presencia de Spn, Mtb o sin estímulo a 48hs de cultivo. Los datos se relativizaron con respecto al control sin estímulo y se presentan en la **Figura 4.2.8**.

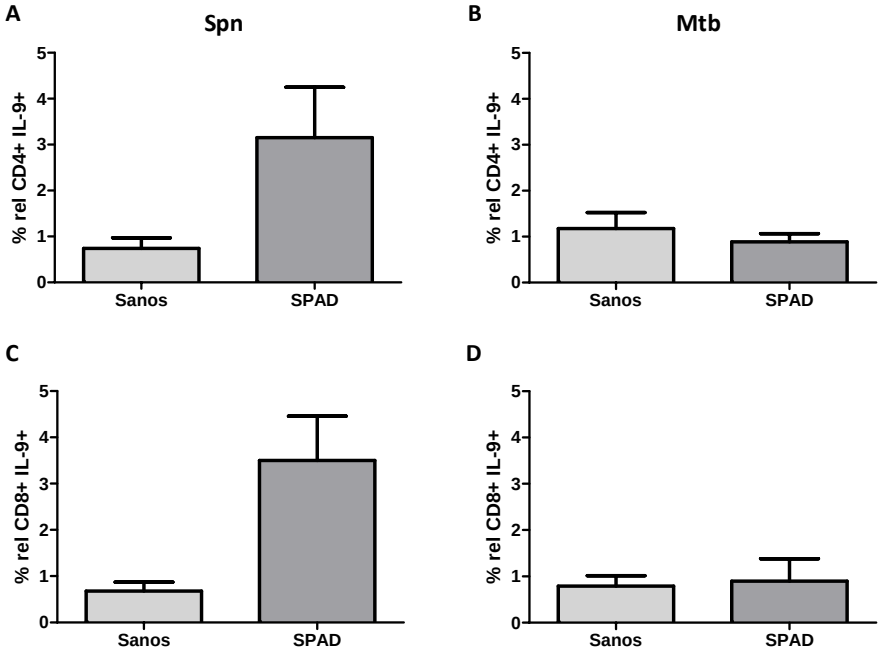

Figura 4.2.8: Porcentaje relativo de LT CD4+IL-9+ y LT CD8+IL-9+ frente al estímulo con Spn (A y C) y Mtb (B y D) a 48hs de cultivo entre individuos sanos (n=5) y pacientes SPAD (n=5). No significativo. Test de Mann Whitney.

La IL-9 está asociada al perfil Th2 y a los síntomas de atopía [120]. Por esta razón, era de esperarse que en los pacientes SPAD pudiese encontrarse un porcentaje mayor de estas células, con respecto a los individuos sanos. Sin embargo, se observó una tendencia a un porcentaje mayor de LT CD4+IL-9+ y CD8+IL-9+ en estos pacientes, solo frente al estímulo con Spn (**Figura 4.2.8. A** y **C**), mientras que frente al estímulo con Mtb el porcentaje de ambas poblaciones productoras de IL-9 en los pacientes SPAD es similar al de los individuos sanos (**Figura 4.2.8. B** y **D**).

4.2.3. Activación de Linfocitos T en Presencia de Antígenos Bacterianos

Como una forma alternativa de evaluar la capacidad de respuesta T, se realizaron cultivos de CMNP en presencia de distintas cepas del neumococo, a saber Spn, Spn14 y Spn3, Mtb (como control positivo) o sin estímulo y luego se midió la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25.

Expresión de CD69

Como se muestra en la **Figura 4.2.9 A**, en los individuos sanos el porcentaje de LT CD4+CD69+ aumentó significativamente con respecto al control sin estímulo solo frente al Mtb, mientras que en los pacientes SPAD el porcentaje de LT CD4+CD69+ no fue significativamente distinto con respecto al control para ninguna de las bacterias utilizadas (**Figura 4.2.9 B**).

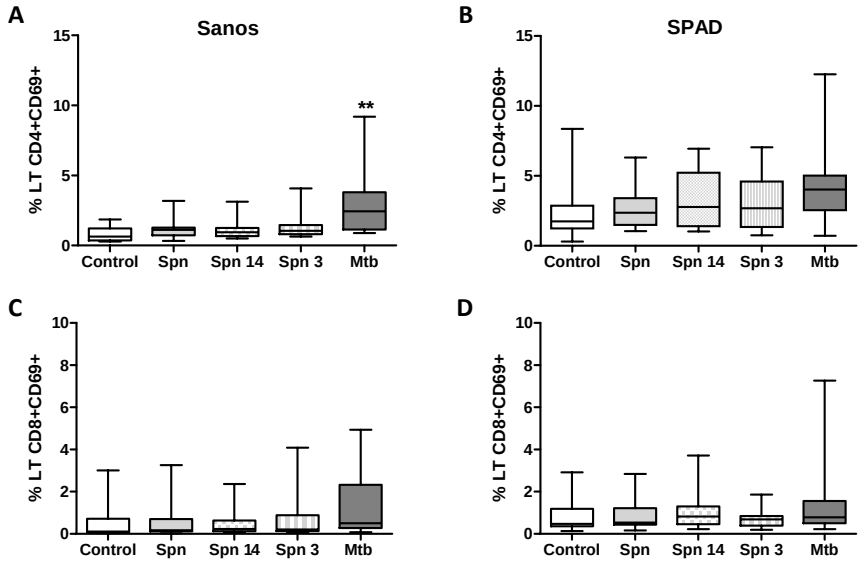

Figura 4.2.9: Porcentaje de LT CD4+CD69+ (A; B) LT CD8+CD69+ (C; D), estimulados con antígenos bacterianos, provenientes de individuos sanos (n=11) y de pacientes SPAD (n=13), a 48hs de cultivo - **p< 0.001 (vs. control). ANOVA de una vía y test *post hoc* de Comparación Múltiple de Tukey.

De esta manera, al comparar el porcentaje relativo de los LT CD4+CD69+ entre sanos y pacientes SPAD - para cada estímulo - se observó que solo frente al Mtb los pacientes SPAD parecen tener una tendencia a una menor respuesta que los individuos sanos (**Figura 4.2.10 A**, **B**, **C** y **D**). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de LT CD8+CD69+ ni en los individuos sanos ni en los pacientes SPAD, con

respecto al control para ninguno de los estímulos antigénicos utilizados (**Figura 4.2.9 C** y **D**). Sin embargo, al comparar el porcentaje relativo de los LT CD8+CD69+ entre sanos y pacientes SPAD - para cada estímulo - se observa que frente al Mtb y en menor medida frente al Spn (**Figura 4.2.11 A** y **D**) los pacientes SPAD parecen tener una tendencia a una menor respuesta que los individuos sanos; mientras que frente al Spn14 parece haber una tendencia a una mayor respuesta de los pacientes SPAD (**Figura 4.2.11 B**).

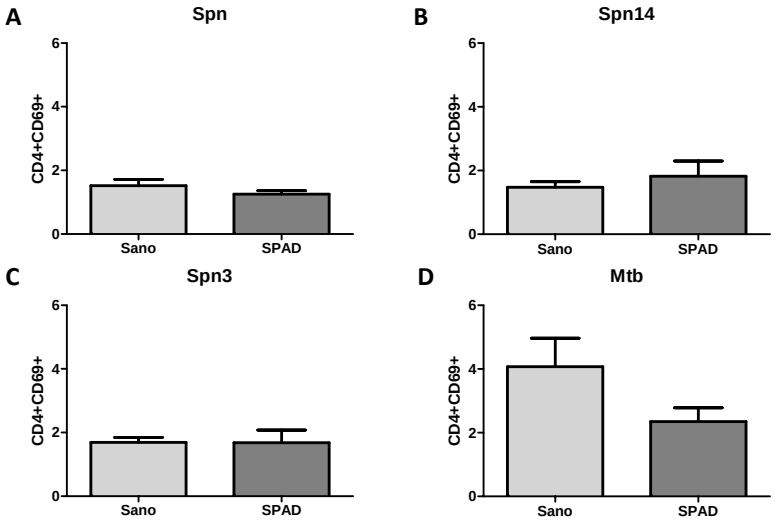

Figura 4.2.10: Porcentaje de LT CD4+CD69+ estimulados con: Spn (A), Spn14 (B), Spn3 (C) y Mtb (D), a 48hs de cultivo. Valores relativos para individuos Sanos (n=11) vs. SPAD (n=13) – No significativo. Test de Mann Whitney.

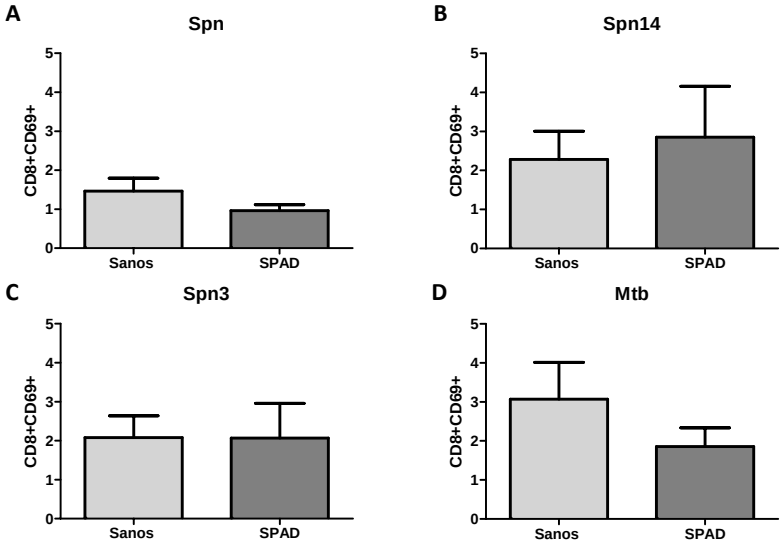

Figura 4.2.11: Porcentaje de LT CD8+CD69+ estimulados con: Spn (A), Spn14 (B), Spn3 (C) y Mtb (D), a 48hs de cultivo. Valores relativos para individuos Sanos (n=11) vs. SPAD (n=13) – No significativo. Test de Mann Whitney.

Expresión de CD25

Tanto en los individuos sanos como en los pacientes SPAD el porcentaje de LT CD4+CD25+ aumentó significativamente frente al Mtb, con respecto al control sin estímulo (**Figura 4.2.12 A** y **B**). Además, en los pacientes SPAD, el porcentaje de LT CD4+CD25+ fue significativamente distinto frente al estímulo con Spn14, con respecto al control (**Figura 4.2.12 B**).

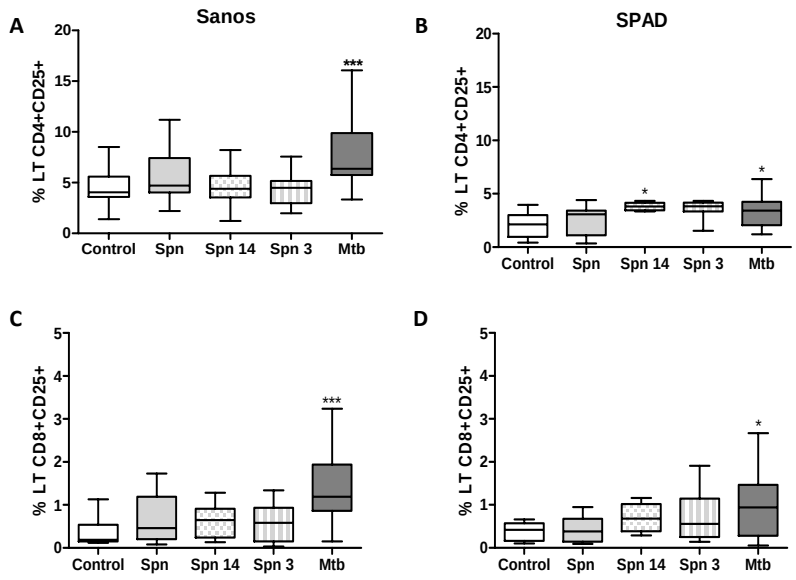

Figura 4.2.12: Porcentaje de LT CD4+CD25+ (A y B) LT CD8+CD25+ (C y D), estimulados con antígenos bacterianos, provenientes de individuos Sanos (n=11) y de pacientes SPAD (n=13), a 48hs de cultivo - *p < 0.05 y ***p<0.0001 (vs. control). ANOVA de una vía y test *post hoc* de Comparación Múltiple de Tukey.

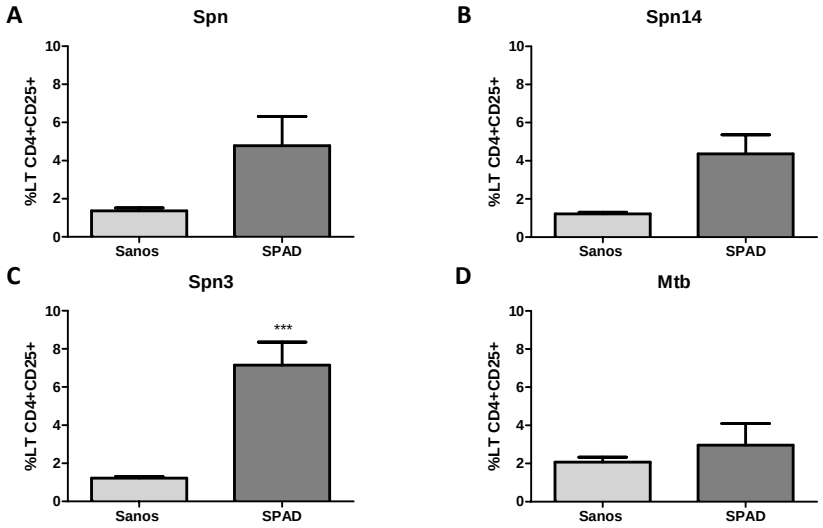

Figura 4.2.13: Porcentaje de LT CD4+CD25+ estimulados con: Spn (A), Spn14 (B), Spn3 (C) y Mtb (D), a 48hs de cultivo. Valores relativos para individuos Sanos (n=11) vs. SPAD (n=13) – ***p<0.0001. Test de Mann Whitney.

Al comparar el porcentaje relativo de los LT CD4+CD25+ entre sanos y pacientes SPAD, frente a todos los estímulos evaluados, se observó que los pacientes SPAD parecen tener una tendencia a una mayor respuesta que los individuos sanos, siendo significativamente mayor para el caso del estímulo con Spn3 (**Figura 4.2.13 A**, **B**, **C** y **D**).

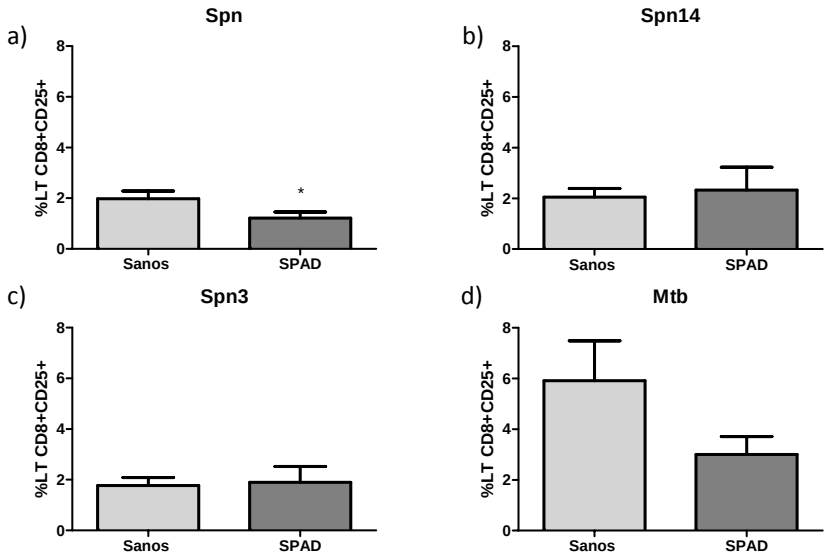

Figura 4.2.14: Porcentaje de LT CD8+CD25+ estimulados con: Spn (A), Spn14 (B), Spn3 (C) y Mtb (D), a 48hs de cultivo. Valores relativos para individuos Sanos (n=11) vs. SPAD (n=13) – *$p < 0.05$. Test de Mann Whitney.

Como se muestra en la **Figura 4.2.12 C** y **D**, el porcentaje de LT CD8+CD25+ en individuos sanos y en pacientes SPAD aumentó significativamente con respecto al control sin estímulo solo frente al Mtb, mientras que no se encontraron diferencias significativas con respecto al control para ninguna de las otras bacterias estudiadas. Sin embargo, al comparar cada estímulo entre individuos sanos y pacientes SPAD (**Figura 4.2.14**), se observó que el porcentaje de LT CD8+CD25+ frente al estímulo con Spn fue significativamente menor para los pacientes SPAD, con respecto a los individuos sanos (**Figura 4.2.14 A**) y que frente al estímulo con Mtb se observó una tendencia a un porcentaje menor de estas células (**Figura 4.2.14 D**).

5. DISCUSIÓN

Históricamente se ha considerado que la respuesta inmune al *S. pneumoniae* está basada en anticuerpos anticapsulares. Sin embargo, varios reportes han demostrado que la respuesta T es de gran importancia [7,18,106]. Se ha descripto que la colaboración T para la correcta inducción de una respuesta humoral antígeno-específica *in vivo*, depende del tipo de antígeno neumocóccico [27]. El grupo de Snapper y colaboradores ha estudiado muchos aspectos de la respuesta inmune al *S. pneumoniae* y ha demostrado que la respuesta frente a la fosforilcolina, componente de la pared celular del neumococo, dependería de la co-estimulación a través de las moléculas B7 (expresada en la membrana de las APCs) y CD28 (expresada en la membrana de los LT) y de la interacción de CD40 con su ligando en los LT [29]. Es en este trabajo en donde se sugiere que sería necesaria la activación de receptores tipo Toll, que median la activación del factor de transcripción inflamatorio NFκB, responsable del aumento de expresión de B7 en las APCs. La activación de los TLRs a través del contacto directo con el patógeno, induciría además la liberación de varias Cks que pueden co-estimular a los LT, activándolos aún en presencia de señales sub-óptimas del TCR (basales, en ausencia de reconocimiento MHC/péptido). De esta manera los LT activados, podrían colaborar con los LB, cuyo contacto con la fosforilcolina puede entrecruzar a sus receptores. Se ha demostrado en un modelo murino que la expresión del TLR-2, en LB y LT CD4+, es crítica para la inducción de una respuesta humoral T -dependiente frente a la bacteria entera [28]. Mureithi y cols. observaron la presencia de LT de memoria frente a este patógeno, en CMNP de humanos [121]. Recientemente Olliver y cols. caracterizaron la respuesta inmune a este patógeno en humanos [7], mientras que varios reportes han demostrado que la respuesta T está involucrada en la respuesta al *S. pneumoniae* en modelos animales [5,122].

5.1. Pacientes Asmáticos

Los pacientes asmáticos sufren ocasionalmente de exacerbaciones de sus síntomas. Estas crisis asmáticas son disparadas por diversos estímulos asociados a un aumento en la inflamación de las vías aéreas, a niveles elevados de factores

inflamatorios y a una tasa elevada de infiltrado celular en el pulmón. Esto constituye una carga severa sobre el sistema de salud, dado que representa hasta un 50% del costo asociado al asma, pero además afecta la calidad de vida de los pacientes [123]. Sin embargo, la mayor parte del tiempo, los pacientes asmáticos se encuentran estables y no presentan síntomas de exacerbación asmática [40]. Las infecciones virales son una de las causas más frecuentes de crisis asmáticas y - aunque no se asocien a un momento de exacerbación - una vez desencadenadas pueden abrirle paso a infecciones bacterianas [124]. El *S. pneumoniae* está frecuentemente involucrado en infecciones asociadas a sibilancias y es uno de los patógenos que más afectan a los individuos con asma [125].

Evidencia reciente sugiere que el asma es una condición multifacética, controlada activamente por células T efectoras y regulatorias. Los LT efectores aumentan la inflamación de las vías aéreas, mientras que las células regulatorias contrarrestan estos efectos en gran parte, a partir de la liberación de factores anti-inflamatorios. Las Cks están involucradas en el desarrollo y la activación de todas las supoblaciones T efectoras y regulatorias. También están involucradas directa o indirectamente en el abordaje de la mayoría de los tratamientos para contrarrestar los síntomas asmáticos [106].

El grupo de Kirby y cols. ha reportado evidencia de que frente a la infección con *S. pneumoniae*, existe una respuesta local mediada por subpoblaciones de LTγδ específicos de pulmón [67]. Las células Tγδ se consideran además de suma importancia en la defensa frente al *M. tuberculosis* [126]. Se ha reportado que en la mucosa nasal de pacientes con rinitis alérgica, una gran proporción de LTγδ expresan IL-4 y no IFN-γ [127]. Además, los LTγδ de los pacientes asmáticos, pero no de los individuos sanos, liberan IL-4 y proliferan de manera alergeno-específica [128]. Por ello se decidió estudiar esta población en los pacientes asmáticos, esperando encontrar alguna diferencia con respecto a los individuos sanos que quizás pudiese ser correlacionada con la mayor frecuencia de infección por *S. pneumoniae*. En los pacientes asmáticos observamos un porcentaje menor de LT γδ, lo que afectaría la respuesta tanto a Spn como a Mtb (**Tabla 4.1.1**). Esto podría ser, por lo tanto, desventajoso frente a ambas bacterias, lo que no explicaría una susceptibilidad diferencial a la infección con estos agentes patógenos. Sin embargo, al evaluar a 48hs de cultivo la expresión de CD69 en estas

células, observamos que los pacientes asmáticos presentan una tendencia a una menor respuesta frente al estímulo con Spn, con respecto a los individuos sanos (**Figura 4.1.2**). Al comparar los pacientes asmáticos en ambas condiciones, se observó que los pacientes en período de estabilidad presentan un porcentaje significativamente menor de LTγδ CD69+ frente al estímulo con Spn, mientras que en exacerbación los porcentajes de esta población son similares a los obtenidos en ambos casos frente al Mtb (**Figura 4.1.3**). Esto deja de manifiesto que los LTγδ de los pacientes asmáticos, además de encontrarse en menor proporción en periferia, responden de manera diferencial frente al Spn, dependiendo de si se encuentran en un período de estabilidad o en un momento de exacerbación. En muestras humanas de lavados bronco-alveolares (BAL), se ha visto una proporción mayor de LTγδ en los pacientes asmáticos que en los individuos sanos. Esta correlación no se vio en las CMNP, lo que muestra la importancia de poder obtener muestras del tejido blanco para estudiar estos fenómenos. Aún así, la funcionalidad de este tipo celular en pulmón no se ha estudiado en pacientes atópicos [129] y es complicado poder hacerlo en individuos pediátricos dado que, en nuestro país al menos, no está indicado obtener este tipo de muestras como método diagnóstico de rutina.

Por otra parte, se ha asignado un rol importante a las células T regulatorias en cuanto al desarrollo de asma atópico. Varios autores han sugerido que una deficiencia en la capacidad efectora de las células regulatorias podría ser la causa desencadenante de alergia y asma atópico. Algunos de ellos han reportado niveles bajos de células Treg en pacientes asmáticos [107]. El grupo de Pumputiene y cols. ha estudiado recientemente las células regulatorias CD4+CD25^{hi} en niños con asma atópico en el período de estabilidad y en la exacerbación [130]. Observaron que no había una correlación significativa entre los porcentajes de LT CD4+CD25^{hi} y la clínica. También reportaron que el porcentaje de células regulatorias en sangre periférica no es menor, con respecto a los controles. Esto correlaciona con nuestros datos, en donde no encontramos diferencias significativas en la proporción de estas células T en ninguna de las dos condiciones de los pacientes asmáticos y en los individuos sanos (**Tabla 4.1.2**).

La capacidad de los linfocitos de responder frente a un antígeno puede ser evaluada mediante la expresión de marcadores de activación y la producción de Cks,

luego de estimular CMNP con dicho antígeno. Recientemente el grupo de Martin y cols. ha reportado que la expresión de CD69 puede modular la diferenciación de los LT hacia el linaje Th17 en asma de origen alérgico y otras enfermedades de origen inflamatorio. El CD69 promueve la activación de la vía de señalización de Jak3-Stat5, que inhibe la diferenciación hacia Th17, lo que deja de manifiesto que existe una relación directa entre la expresión de CD69 y la regulación de las respuestas Th17 [131]. Las células Th17 han sido descriptas como relevantes en la respuesta inmune frente al *S. pneumoniae* [18]. Otros autores han reportado que el CD69 cumple un rol crucial en la patogénesis de la inflamación eosinofílica e hiperrespuesta de las vías aéreas, inducida por alergenos [132].

Al estudiar la expresión de antígenos de activación T, si bien a 0hs no se observaron diferencias para la expresión de CD69 o CD25 entre individuos sanos y pacientes asmáticos (**Tabla 4.1.1**), sí se pudieron observar algunas diferencias en la respuesta frente a los antígenos bacterianos. Se observó que la expresión de CD69 es menor en los pacientes asmáticos en respuesta al Spn, con respecto a los individuos sanos, lo que no se observó en respuesta al Mtb (**Figura 4.1.2**). Esto podría representar un factor contribuyente a la frecuencia distinta de infección por neumococos observada en estos pacientes asmáticos, dado que existe una relación funcional entre la expresión de CD69 y la capacidad de los LT de poder diferenciarse a LT efectores. Como ya se ha mencionado, la inducción temprana de la expresión de CD69 en los LT, facilitaría la inhibición de la "tendencia natural" de generar una respuesta Th17, permitiendo otros caminos de diferenciación T (como Th1 o Th2) [131].

Para el CD25, se observó que en los individuos asmáticos existe una tendencia a un menor porcentaje de expresión, frente al Spn en los LT CD4+ y CD8+, con respecto a los individuos sanos (**Figura 4.1.5**). Algunos autores han reportado que los LT CD8+ están involucrados en la defensa frente al neumococo [133,134]. En nuestros experimentos, los LT CD8+ mostraron un aumento en la expresión de CD25 solo frente al estímulo con Mtb en las células de los pacientes asmáticos y no en las células de los individuos sanos (**Figura 4.1.5**). Esto puede deberse a que en los pacientes asmáticos la expresión de este marcador de activación frente a estímulos bacterianos se ve alterada con respecto a los individuos sanos. Esto podría contribuir a la susceptibilidad frente al

neumococo, aunque la respuesta inmune global dependerá del balance entre las distintas subpoblaciones T.

Por otra parte, la respuesta inmune frente a antígenos bacterianos también involucra la producción de Cks, algo que bien podría encontrarse afectado en los pacientes asmáticos debido a su condición subyacente. En nuestro sistema experimental decidimos evaluar la capacidad de producción de Cks de las CMNP, estimuladas inespecíficamente en cultivo. En los pacientes asmáticos se observó un menor porcentaje de células T productoras de TNF-α e IFN-γ, con respecto a los individuos sanos (**Tabla 4.1.5**). Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por el grupo de Machura y colegas. Ellos reportan que en los LT de pacientes asmáticos existe una disminución en la producción de IFN-γ, evaluada por marcación intracelular y citometría de flujo, con respecto a los individuos sanos. Asimismo, observan que la producción de TNF-α es similar en ambos grupos [135]. Esta citoquina, inicialmente considerada como producto de macrófagos, puede ser expresada por diversos tipos celulares [136]. Por ello es posible que los niveles elevados de TNF-α que han sido reportados por otros grupos, provengan de otros tipos celulares que nosotros no evaluamos, o que se generen de manera local.

Nuestros datos mostraron que en los pacientes asmáticos los niveles de IFN-γ en suero eran menores con respecto a los individuos sanos (**Tabla 4.1.4**). Sin embargo, en los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos de CMNP estimuladas con antígenos bacterianos, se detectó una producción alta de esta citoquina tanto en los individuos sanos como en los pacientes asmáticos (**Tabla 4.1.6**).

Como era de esperarse, en los pacientes asmáticos se observó un porcentaje significativamente alto de células productoras de IL-5, una citoquina característica del perfil Th2, con respecto a los individuos sanos (**Tabla 4.1.4**). No obstante, al estudiar otras Cks Th2 como la IL-4 o la IL-13 no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Nuestras observaciones coinciden con los resultados reportados por el grupo de Kuo y cols., quienes observaron en CMNP activadas, de pacientes asmáticos, niveles significativamente altos de IL-5 y bajos de IFN-γ, con respecto a controles sanos [137].

Como ya se ha mencionado, la respuesta específica frente a los antígenos bacterianos estudiados también se evaluó en función de la concentración de Cks

liberadas hacia los sobrenadantes de cultivo. Como medida de la respuesta Th1 se midieron los niveles de IFN- γ en respuesta a Spn y a Mtb. Resultó llamativo el hecho de que en los sobrenadantes de cultivos provenientes de CMNP de pacientes asmáticos en momento de exacerbación, se encontraran niveles muy elevados de esta citoquina aún en ausencia de estímulo (**Tabla 4.1.6**). Sin embargo, como se ha mencionado, consideramos que puede deberse a que las CMNP de los pacientes asmáticos en crisis ya estuviesen activadas o estimuladas *in vivo*, como consecuencia de la exacerbación de sus síntomas. Tanto en los individuos sanos como en los pacientes asmáticos en ambas condiciones, se observó que la concentración de IFN-γ estimulada por Spn fue mayor a 500 pg/ml, lo que era esperado en los individuos sanos [138]. El grupo de Lama y cols. reportó que los niveles de IFN-γ en suero en dos grupos de pacientes asmáticos: unos en tratamiento con esteroides y otros sin haber recibido tratamiento, fueron menores que los encontrados en sueros de individuos sanos; pero no hacen referencia a qué ocurre en momentos de exacerbación asmática [139].

En los pacientes asmáticos en momentos de exacerbación se encontraron niveles menores de IL-5 en respuesta a los antígenos bacterianos, con respecto a los pacientes en períodos de estabilidad; aunque la respuesta a Mtb fue siempre mayor a la respuesta frente a Spn (**Tabla 4.1.6**). Se ha propuesto que los niveles de IL-5 correlacionan directamente con el desarrollo de la crisis asmática, al punto que podrían utilizarse los niveles de IL-5 exhalados como marcador predictivo de la exacerbación [140]. Es posible que la producción *in vitro* de esta citoquina en las CMNP de pacientes en exacerbación, estimuladas antigénicamente, no se incremente porque hayan agotado *in vivo* su capacidad de producirla; lo que explicaría la tendencia observada en nuestros datos. Esto también podría deberse al hecho de que en presencia de Spn se desencadena una respuesta inmune que de alguna manera contrarresta al perfil Th2 característico del asma, a través de otros mediadores.

El asma se ha asociado a defectos en la regulación de la respuesta inmune y la IL-10 es una citoquina regulatoria involucrada en la fisiopatología de esta enfermedad. Por este motivo evaluamos la producción de esta citoquina en nuestro modelo experimental. La producción de IL-10 aumentó frente a los estímulos con Spn y Mtb, con respecto a los cultivos sin estímulo. Sin embargo, sus niveles fueron similares con

ambos antígenos bacterianos en los pacientes asmáticos en ambas condiciones y en los individuos sanos (**Tabla 4.1.6**), es decir, no observamos diferencias que pudiéramos asociar al defecto regulatorio descripto por otros grupos [129,141–143].

Teniendo en cuenta que la inducción temprana de la expresión de CD69 en los LT facilitaría la inhibición de la respuesta Th17 [131], que parece ser importante frente al neumococo, y que en los pacientes asmáticos en presencia de Spn los porcentajes de LTCD69+, CD4+CD25+ y CD8+CD69+ fueron menores con respecto a los individuos sanos, creemos que esto podría afectar la diferenciación hacia el perfil Th1. Esto podría ocurrir a pesar de la producción observada de IFN-γ, Ck que se considera representante del perfil Th1, puesto que podría derivar de otros tipos celulares. Nuestros datos son coherentes con la idea de que en los pacientes asmáticos, asociados mayormente a un perfil Th2, presentan deficiencias en cuanto a la capacidad de respuesta al *S. pneumoniae*, que dependen de la respuesta celular T.

5.2. Pacientes SPAD

Los pacientes que son incapaces de producir anticuerpos específicos que reconocen antígenos polisacáridos, o pacientes SPAD, se han descripto a lo largo de los años como pacientes que presentan respuestas serológicas pobres a este tipo de antígeno, pero con niveles normales de Igs y de subclases de IgG y respuestas normales a antígenos proteicos [10]. Esta inmunodeficiencia es reportada comúnmente en niños, lo que siempre se asoció a un desarrollo inapropiado de la respuesta natural de anticuerpos anticapsulares, que es dependiente de la edad. Esta inmunodeficiencia se asocia a infecciones recurrentes, muchas de ellas respiratorias, causadas por bacterias capsuladas como el *S. pneumoniae*. En los últimos años se ha reportado que en los individuos sanos se producen cambios vinculados a la edad en las subpoblaciones de CD, que en los pacientes SPAD se ven alterados. Esto se asoció a un posible rol de las CD en la maduración de los LB, células que también se han visto alteradas en su capacidad de maduración y diferenciación en estos pacientes [11]. Pero no se habían estudiado antes aspectos de la inmunidad celular mediada por los LT y de la inmunidad adaptativa, necesaria para generar memoria frente a este patógeno [7,38]. Recientemente, se ha reportado que las células Th1 y Th17 estarían involucradas

en la respuesta al *S. pneumoniae* [7,144]. Olliver y colaboradores demostraron, en células humanas, que los Mo promueven la producción de Cks efectoras en LT de memoria, llevando su perfil a una mezcla entre células Th1/Th17; en respuesta a la bacteria viva o inactivada por calor. En este estudio, los neumococos vivos desencadenaron una respuesta Th1 modulada por Mo productores de IL-12p40, mientras que los neumococos inactivados por calor desencadenaron una respuesta Th17, activando la vía de señalización del TLR-2 [7].

Es importante mencionar que si bien los pacientes SPAD estudiados han sido tratados con gamma-globulina endovenosa (GGev) [145–147], hemos descartado que las alteraciones observadas en ellos, tanto *ex vivo* como *in vitro*, se deban a un efecto asociado a este tratamiento. La toma de las muestras se hizo justo antes de comenzar el tratamiento con GGev, es decir, cuando ya había decaído la infusión previa de la misma. En nuestro modelo experimental no observamos diferencias significativas entre el porcentaje de LT CD3+, CD4+ ni CD8+ entre pacientes SPAD e individuos sanos a todas las edades estudiadas (**Tabla 4.2.1**).

Al estudiar los porcentajes de LT que expresan marcadores de activación a 0hs, observamos que en los individuos sanos el porcentaje de células CD3+CD69+, CD3+CD25+, CD4+CD25+ y CD8+CD25+, disminuye con la edad. Estas diferencias en cuanto a la frecuencia de LT activados (que no son *naive*), asociadas a la edad, no se evidencian en los individuos SPAD (**Tabla 4.2.2**). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los LT de los individuos sanos y de los pacientes SPAD, en cuanto a la capacidad de producción de Cks Th1, Th2 y regulatorias frente a un estímulo inespecífico.

Si bien al evaluar las células regulatorias CD4+CD25+Foxp3+, se observó que los pacientes SPAD presentaban un menor porcentaje de las mismas, con respecto a los individuos sanos de 14-19 años (**Tabla 4.2.3**); al evaluar el porcentaje de células regulatorias utilizando marcadores alternativos de esta población, no se observaron diferencias relacionadas con la edad (**Tabla 4.2.4**). Estos datos confirman que no estamos frente a los efectos de la GGev, dado que se ha reportado que este tratamiento induce la expansión de los LTreg y aumenta su capacidad supresora [148–150]. También se observó que, en general, los pacientes SPAD parecen tener un

porcentaje menor de LTγδ (aunque no significativo), con respecto a los individuos sanos, que es independiente de la edad (**Tabla 4.2.4**).

Cuando se evaluaron a 0hs las células CD4+CD161+CCR6+ (Th17) [109] tampoco se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de las mismas asociadas a la edad, ni entre sanos y pacientes (**Tabla 4.2.4**). Asimismo, se decidió evaluar la proporción de LT *naive* y de LT de memoria capaces de ser activados en relación a la edad. Observamos que en los individuos sanos existe una tendencia a que el porcentaje de LT *naive* disminuya (LT CD45RA+) y a que el porcentaje de LT de memoria (LT CD45RO+) aumente con la edad de manera significativa (**Figura 4.2.1**). Estos cambios asociados a la edad no se observaron en los pacientes SPAD.

Dado que ya se habían reportado alteraciones en las CD asociadas a la edad en estos pacientes y que la generación de clones de memoria requiere de la correcta activación y proliferación de la respuesta T, decidimos evaluar qué ocurría con los Mo provenientes de las CMNP en los individuos sanos y en los pacientes SPAD. En los individuos sanos se observó que los Mo clásicos (CD14++CD16-) aumentan en porcentaje, mientras que los Mo intermedios (CD14++CD16+) disminuyen, en relación a la edad (**Tabla 4.2.6**). Estos cambios no se observaron en los individuos SPAD que, en el rango de 14-19 años, presentan un porcentaje significativamente mayor de Mo intermedios, con respecto a los individuos sanos de la misma edad (**Figura 4.2.2**). Los Mo intermedios son los que expresan un mayor número de moléculas de superficie involucradas en la presentación antigénica a LT, en particular CD40 y CD54 [91], y son también los mejores inductores de proliferación T [92], aunque no se descarta que los Mo clásicos también conserven estas capacidades. Al evaluar la producción de TNF-α en respuesta a Spn a tiempos cortos, se observó una tendencia a un mayor porcentaje de Mo clásicos TNF-α+ y de Mo intermedios TNF-α+ en los pacientes SPAD, con respecto a los individuos sanos, aún cuando los niveles de Mo clásicos en los pacientes son menores (**Figura 4.2.4**). Es interesante destacar que en la literatura se describe a los Mo CD16+ como mayores productores de TNF-α que los Mo CD16- [94], pero según nuestro conocimiento, no se habían reportado hasta hoy datos correspondientes a individuos de 14 a 19 años de edad respecto de estas células. Es posible que parte del desarrollo normal dependiente de la edad de estas subpoblaciones celulares, esté

asociado también a una variación en cuanto al perfil de Cks que liberan y eso explique los datos obtenidos tanto en los individuos sanos como en los pacientes SPAD.

Al evaluar qué ocurría con la población de Mo clásicos a 48 horas de cultivo, se observó un porcentaje menor de Mo CD14++ TNF-α+ e IL-10+, en respuesta a Mtb, con respecto a los individuos sanos (**Figura 4.2.5**). Cuando se evaluó la respuesta a Spn, se observó una disminución solo en el porcentaje de Mo CD14++ IL-10+ con respecto a los individuos sanos. Estas alteraciones en cuanto a la expresión de CD16 y a la producción de Cks inflamatorias y anti-inflamatorias, podrían afectar la capacidad de estos Mo de diferenciarse a CD capaces de presentar antígenos correctamente [110]. Es importante destacar además que estos datos constituyen los primeros sobre alteraciones en los Mo de los pacientes SPAD; si bien otros autores habían reportado con anterioridad alteraciones en otras células del mismo linaje [11].

Se ha descripto que para controlar de manera eficiente la colonización por *S. pneumoniae*, protección mediada por células Th17, es necesario que se active la vía de señalización del TLR2 [39]. También se ha reportado que la interacción del neumococo vivo con distintos receptores intracelulares, expresados en los Mo, podría inducir de manera sinérgica la respuesta Th1 [7]. Por otra parte se ha demostrado que el *cross-talk* entre los receptores de reconocimiento de patrones como NOD1 y los TLRs, potencia la respuesta inmune y contribuye al desarrollo de la inmunidad adaptativa [151]. Por ello se decidió estudiar la capacidad de los LT CD4+ de producir IL-17, IFN-γ e IL-9.

Contrariamente a lo esperado, en los pacientes SPAD no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de LT CD4+IL-17+IFN-γ+ o LT CD4+IL-17+ en respuesta a Spn, con respecto a los individuos sanos (**Figura 4.2.7**). Tampoco se observaron diferencias significativas en los porcentajes de LT CD4+ IFN-γ+ frente a este antígeno, aunque se observó una tendencia a un menor porcentaje de estas células en los pacientes SPAD.

Por otra parte, se ha descripto que es posible la re-activación de células de memoria Th1 y Th17, mediada por la presentación antigénica de APCs previamente activadas vía TLR [115,152,153]. Los resultados de Olliver y colaboradores sugieren que la respuesta Th frente al neumococo, dependiente de Cks, deriva principalmente de LTh de memoria CD45RO+, población que en estos pacientes hemos demostrado se

encuentra en un menor porcentaje, con respecto a los individuos sanos. Ellos además sugieren que habría una relación negativa entre la respuesta de Cks Th1 y Th17, lo que corroboró otros reportes que sugerían que las condiciones Th1 regulan negativamente la producción de IL-17 [153–155]. Cabe destacar que en nuestros experimentos se observó una tendencia a una menor respuesta frente al Mtb de las tres subpoblaciones T efectoras (CD4+ IL-17+, CD4+ IL-17+IFN-γ+ y CD4+ IFN-γ+) en los pacientes SPAD al comparar con los individuos sanos (**Figura 4.2.7**). Esto puede ser evidencia de que estos pacientes no responden de la misma manera que los individuos sanos frente a antígenos proteicos, aún cuando todos han sido vacunados con la BCG.

En humanos, se ha descripto que las células T CD4+ de memoria pueden ser inducidas hacia el perfil Th9 [156]. En experimentos *in vitro*, el grupo de Wong y cols. ha observado que en presencia de TGF-β e IL-4 los LT CD4+ pueden diferenciarse a células Th9; y que la presencia de otras Cks como IL-1β, IL-6, IL-10, IFN-α, IFN-β o IL-21 pueden incrementar la diferenciación hacia ese perfil [157], mientras que el IFN-γ puede suprimir la diferenciación a Th9 dependiente de TGF-β [119]. Dado que los individuos sanos presentaron un mayor porcentaje de LT CD4+IFN-γ+ frente a ambos estímulos, con respecto a los pacientes SPAD, era esperable que no se observaran porcentajes altos de LT CD4+IL-9+ en ellos. Esto fue lo que ocurrió al estimular con Spn, pero frente al estímulo con Mtb los pacientes SPAD parecen responder de manera similar a los individuos sanos, aunque los porcentajes de LT CD4+IFN-γ+ frente a este mismo estímulo parecen mostrar que los pacientes SPAD presentan una tendencia a una menor respuesta que los individuos sanos (**Figura 4.2.8**).

Por otra parte observamos alteraciones a 0hs en los porcentajes de LT activados (**Tabla 4.2.2**). En particular, nuestros resultados mostraron que la disminución de los porcentajes de LT CD4+/CD8+ CD69+ y CD25+, asociada a la edad, observada en los individuos sanos no se observó en los pacientes SPAD. Consideramos que de existir alguna deficiencia funcional en cuanto a la capacidad de respuesta Th, ésta podría manifestarse al evaluar la expresión de marcadores de activación frente a antígenos bacterianos en cultivos a 48 horas. Pudimos obtener, además de la cepa Spn de colección, acceso a aislamientos de las variantes Spn3 y Spn14. En cuanto a la expresión de CD69, se observó que solo frente al estímulo con Mtb los pacientes SPAD

parecen tener una tendencia a una menor respuesta que los individuos sanos (**Figura 4.2.10 y Figura 4.2.11**). Al evaluar la expresión de CD25, nos llamó la atención el hecho de que al comparar los pacientes SPAD con los individuos sanos, los SPAD presentan un porcentaje de LT CD4+CD25+ elevado en respuesta a todos los estímulos bacterianos estudiados, que fue significativamente mayor para el caso del estímulo con Spn3 (**Figura 4.2.13**). A su vez, se observó que el porcentaje de LT CD8+CD25+ frente al estímulo con Spn fue significativamente menor para los pacientes SPAD, con respecto a los individuos sanos (**Figura 4.2.14**) y que frente al estímulo con Mtb se observó una tendencia a un porcentaje menor de estas células (**Figura 4.2.14 D**). Dado que no observamos en los pacientes SPAD un aumento en la respuesta Th17/Th1 efectora, que es la respuesta esperada frente al estímulo con el neumococo, creemos que los LT CD25+ podrían ser LT que se estarían diferenciando a LT productores de IL-10 (Foxp3+). Históricamente se ha considerado que los LT se diferencian de manera irreversible, una vez que se han "comprometido" hacia un perfil Th determinado. Pero *in vivo* las células T deben ser capaces de montar distintas respuestas frente a una gran variedad de amenazas o injurias que puede sufrir el organismo. *In vitro*, se ha reportado que las células Treg son capaces de convertirse en otros tipos de células Th, en particular, se ha estudiado extensamente la conversión de células Treg a células Th17 y viceversa. Se ha descripto que la IL-6 es capaz de inhibir la actividad supresora de los LTreg y, a su vez, la generación de nuevas células regulatorias [158]. Si bien el TGF-β es el responsable de promover la generación de células que expresan Foxp3 a partir de LT *naive*, la IL-6 puede inhibir sus efectos y promover la generación de células Th17 [159,160]. En condiciones en donde hay una alta expresión de IL-6 las células Treg (que expresan altos niveles de TGF- β) podrían convertirse entonces en células Th17 [161]. Aún así, es importante tener en cuenta que en situaciones en donde los estímulos inflamatorios (como la producción de IL-6, TNF-α e IL-1) se ven alterados, el TGF-β puede estimular a los LT *naive* CD4+, e inducir su diferenciación a LT Foxp3+ (iTreg). Dado que hemos reportado que en los pacientes SPAD los LT naive parecen estar aumentados con respecto a los individuos sanos, es probable que a 48hs de cultivo estas células se estén diferenciando hacia este tipo celular que presenta altos niveles de CD25 en su membrana, aunque aún no pudimos evaluar esta hipótesis.

Por otra parte se observó un mayor porcentaje de células $CD56^{dim}$CD16+ en los pacientes SPAD, con respecto a los individuos sanos, y una tendencia a un aumento en el porcentaje de la población CD56-CD16+ en los pacientes SPAD (**Figura 4.2.3**). No hemos encontrado datos al respecto en otras infecciones, pero se sabe que durante las etapas tempranas de la infección por HIV, el número de células NK circulantes puede aumentar, mientras que con el progreso de la enfermedad disminuyen [162–164], particularmente el subset $CD56^{dim}$CD16+, mientras que el subset CD56-CD16+ aumenta en individuos con altos niveles de viremia. Durante las etapas tempranas de la infección por HIV, en el momento de infección aguda previo a la seroconversión, existe una expansión significativa del subset NK $CD56^{dim}$ con una disminución rápida luego de comenzar la terapia con antivirales. La replicación viral sostenida lleva a la depleción del subset NK $CD56^{bright}$ y, en paralelo, a un aumento de la subpoblación CD56- CD16+, acompañado de una actividad funcional reducida de las células NK [165]. El grupo de Mantegani y colaboradores reportó recientemente que el porcentaje de células NK CD3-CD56+ circulantes, disminuye con la progresión de la infección por HIV, dependiendo del subtipo $CD56^{dim}$ y en especial del $CD56^{bright}$, mientras que el porcentaje del subset CD56- CD16+ aumenta [111].

Se estudió en nuestro modelo experimental la funcionalidad de estas subpoblaciones NK, evaluando su capacidad de producir IFN-γ al estimular con Spn y con Mtb durante 24hs. Las células $CD56^{dim/-}$CD16+ que se vieron aumentadas a 0hs en los pacientes SPAD, no presentaron diferencias significativas en cuanto a la capacidad de producción de IFN-γ, con respecto a los individuos sanos (**Figura 4.2.6**). Se observó una tendencia a una mayor producción de IFN-γ por parte de las células $CD56^{bright}$CD16- frente al estímulo con Spn en los pacientes SPAD, con respecto a los individuos sanos, que no se observa frente a Mtb. Si se pudiera aumentar el número de muestras quizás sería posible encontrar diferencias al separar a los individuos por edades.

En conclusión hemos encontrado varias diferencias en subpoblaciones de Mo y LT en los pacientes SPAD que no habían sido descriptas hasta el momento. Consideramos que si bien no todas estas alteraciones se manifiestan clínicamente,

demuestran que la inmunodeficiencia en estos pacientes es mucho más compleja de lo que se creía hasta ahora.

5.3. Conclusión General y Perspectivas

Si bien nuestros resultados deberán ser complementados con estudios más amplios - y no ha sido posible estudiar los mismos parámetros en los pacientes con asma y en los pacientes con SPAD - los datos obtenidos parecen avalar la hipótesis creciente de que la respuesta inmune frente a bacterias extracelulares como el *S. pneumoniae* requiere tanto de la inmunidad T-independiente como de una correcta respuesta T-dependiente capaz de dar memoria.

La inmunidad adaptativa es mediada por LT y LB e involucra tanto una regulación positiva como negativa de la respuesta inmune. Las células T efectoras, son centrales en comandar qué tipo de respuesta es requerida frente a los distintos tipos de patógenos y su diferenciación se caracteriza por adquirir la capacidad de producir Cks [120]. Existen evidencias de que en humanos los LB, a través de la producción de anticuerpos, son capaces de modular la respuesta adaptativa, regulando la maduración y la funcionalidad de las CD. En pacientes con lupus eritematoso sistémico, las CD mostraron ser insensibles a la regulación vía IL-12, lo que ha llevado a postular que una regulación ineficiente de las células B podría influenciar un balance inapropiado entre una respuesta inflamatoria y la inducción de tolerancia [166].
Recientemente se ha demostrado que las CD de bazo dependen de la modulación mediada por Igs para poder realizar correctamente sus funciones como APC, en particular, se observó que esta regulación afecta la presentación cruzada de antígenos [167]. Por esta razón, si bien consideramos que las células del sistema inmune de los pacientes SPAD podrían presentar alteraciones en varios tipos celulares en las etapas iniciales de la diferenciación hacia los progenitores mieloides y linfoides, no podemos descartar que la deficiencia marcada de anticuerpos tenga un efecto directo sobre la modulación de la respuesta adaptativa.

Estudios recientes han demostrado que la activación de receptores de reconocimiento de patrones, entre otros tipos de receptores, confiere a las CD la

capacidad de modular la diferenciación T hacia el perfil Th17 [168]. Mientras que el reconocimiento de estímulos inflamatorios y de la inmunidad innata comienza a nivel de los receptores presentes en las APCs, son los componentes de la cascada de activación río abajo de cada receptor y la forma en la que interactúan entre ellos, los que determinan cuál será la respuesta inmunológica específica resultante. Entre las cascadas de activación centrales que se disparan frente a estímulos inflamatorios en las CD, se encuentra la vía de las MAP quinasas (MAPK). Esta vía, que comprende moléculas como ERK, JNK y p38 (con sus isoformas **α**, **β**, **γ** y **δ**), representa un mecanismo evolutivamente conservado y fundamental en la respuesta a diversas señales extracelulares [169]. La activación excesiva de esta vía se ha asociado a muchas enfermedades auto-inmunes e inflamatorias y la molécula p38α es un blanco farmacológico ampliamente estudiado para el desarrollo de drogas anti-inflamatorias [170]. En las CD, p38α se expresa en mayores niveles que las demás isoformas y, frente a estímulos inductores de la respuesta Th17 (que estimulan el receptor de CD40), se incrementa su activación, en relación a estímulos que desencadenan una polarización de la respuesta hacia el perfil Th1. Esto podría indicar que p38α podría funcionar como mediador en la diferenciación de los LT hacia el perfil Th17, dependiente de la modulación de las CD [171]. Estos estudios han sido de gran importancia para comprender mejor la articulación entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa en modelos de enfermedades inflamatorias, sin embargo, no se conoce aún cómo es que en condiciones normales, las CD contribuyen a la generación de células Th17 en respuesta a la flora comensal, tanto en pulmón como en el tracto digestivo [172].

Dada la necesidad emergente de encontrar nuevos métodos diagnósticos que permitan identificar de manera alternativa a los individuos SPAD, creemos que nuestro reporte de alteraciones en poblaciones leucocitarias puede ser de gran utilidad. Consideramos que las perspectivas futuras en el estudio de la respuesta al *S. pneumoniae* deben considerar la evaluación de las vías de señalización necesarias para activar a las APCs, que son las encargadas de modular la correcta activación y diferenciación T en condiciones normales. Esto podría tal vez contribuir a identificar la base molecular de esta inmunodeficiencia primaria, aún desconocida. A su vez, creemos que sería necesario incorporar experimentos que permitan evaluar la

plasticidad de los LT efectores y cómo esta cualidad está asociada a la correcta maduración de estas células y a los perfiles que adquieren según los estímulos frente a los que se encuentren.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ruvinsky, R., Gentile, A., Regueira, M. & Corso, A. Infecciones invasivas por Streptococcus pneumoniae: estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia. *Children* **100**, (2002).

2. Zhang, Q. *et al.* Low CD4 T cell immunity to pneumolysin is associated with nasopharyngeal carriage of pneumococci in children. *The Journal of Infectious Diseases* **195**, 1194–202 (2007).

3. Goldblatt, D. *et al.* Antibody responses to nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae in adults: a longitudinal household study. *The Journal of Infectious Diseases* **192**, 387–93 (2005).

4. Dagan, R. *et al.* Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *The Journal of Infectious Diseases* **174**, 1271–8 (1996).

5. Lipsitch, M. *et al.* Are anticapsular antibodies the primary mechanism of protection against invasive pneumococcal disease? *PLoS Medicine* **2**, e15 (2005).

6. Kadioglu, A. & Andrew, P. W. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends in Immunology* **25**, 143–149 (2004).

7. Olliver, M., Hiew, J., Mellroth, P., Henriques-Normark, B. & Bergman, P. Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to Streptococcus pneumoniae. *Infection and Immunity* **79**, 4210–7 (2011).

8. Hales, B. J. *et al.* IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **118**, 361–7 (2006).

9. Holt, P. G. & Sly, P. D. Viral infections and atopy in asthma pathogenesis: new rationales for asthma prevention and treatment. *Nature Medicine* **18**, 726–735 (2012).

10. Boyle, R. J., Le, C., Balloch, A. & Tang, M. L.-K. The clinical syndrome of specific antibody deficiency in children. *Clinical and Experimental Immunology* **146**, 486–92 (2006).

11. Jyonouchi, H., Cui, C., Geng, L., Yin, Z. & Fitzgerald-Bocarsly, P. Age-dependent changes in peripheral blood dendritic cell subsets in normal children and children with specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD). *European Journal of Pediatrics* **169**, 1233–9 (2010).

12. Gaiano, A. *et al. Introducción de la vacuna conjugada contra neumococo al Calendario Nacional de Inmunizaciones de la República Argentina. Lineamientos*

Técnicos. Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles. 1–29 (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2011).

13. Paterson, G. K. & Orihuela, C. J. Pneumococci: immunology of the innate host response. *Respirology* **15**, 1057–63 (2010).

14. Simoes, E., Cherian, T., Chow, J., Shahid-Salles, S. A. & Laxminarayan, R. Acute Respiratory Infections in Children. *Disease Control Priorities in Developing Countries* (2006).

15. Ruvinsky, R. O. *et al.* Surveillance of invasive in Streptococcus pneumoniae in Argentina 19942007: Changes in serotype distribution, serotype coverage of pneumococcal conjugate vaccines and antibiotic resistance. *Journal of Pediatric Infectious Diseases* **5**, 263–269 (2010).

16. Rossi, A. *et al.* Distribution of capsular types and penicillin-resistance of strains of Streptococcus pneumoniae causing systemic infections in Argentinian children under 5 years of age. Streptococcus pneumoniae Working Group. *Microbial Drug Resistance* **3**, 135–140 (1997).

17. Black, S. *et al.* Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **19**, 187–95 (2000).

18. Malley, R. Antibody and cell-mediated immunity to Streptococcus pneumoniae: implications for vaccine development. *Journal of Molecular Medicine* **88**, 135–142 (2010).

19. Briles, D. E. *et al.* Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with Streptococcus pneumoniae. *The Journal of Infectious Diseases* **185**, 91–97 (2002).

20. Vorob'ev, D. S., Semenova, I. B. & Kurbatova, E. A. Proteins of Streptococcus pneumoniae: perspectives for development of pneumococcal vaccine. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii* 98–104 (2010).

21. Brown, J. S. *et al.* The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to Streptococcus pneumoniae infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16969–74 (2002).

22. Yuste, J., Botto, M., Bottoms, S. E. & Brown, J. S. Serum amyloid P aids complement-mediated immunity to Streptococcus pneumoniae. *PLoS Pathogens* **3**, 1208–19 (2007).

23. Mold, C. & Du Clos, T. W. C-reactive protein increases cytokine responses to Streptococcus pneumoniae through interactions with Fc gamma receptors. *Journal of Immunology* **176**, 7598–604 (2006).

24. Ferreyra, P. N., Nagao, A. T., Costa-carvalho, B. & Carneiro-sampaio, M. M. S. Síndrome de deficiencia de anticuerpos antipolisacáridos con niveles séricos normales de inmunoglobulinas. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* **32**, 109–116

25. Rijkers, G. T., Sanders, E. A., Breukels, M. A. & Zegers, B. J. Infant B cell responses to polysaccharide determinants. *Vaccine* **16**, 1396–400

26. Chen, Q. *et al.* A Novel ICOS-Independent, but CD28- and SAP-Dependent, Pathway of T Cell-Dependent, Polysaccharide-Specific Humoral Immunity in Response to Intact Streptococcus pneumoniae versus Pneumococcal Conjugate Vaccine. *The Journal of Immunology* **181**, 8258–8266. (2008).

27. Wu, Z.-Q. *et al.* The mechanism underlying T cell help for induction of an antigen-specific in vivo humoral immune response to intact Streptococcus pneumoniae is dependent on the type of antigen. *Journal of Immunology* **168**, 5551–7 (2002).

28. Vasilevsky, S. *et al.* B and CD4+ T-cell expression of TLR2 is critical for optimal induction of a T-cell-dependent humoral immune response to intact Streptococcus pneumoniae. *Eur J Immunol.* **38**, 3316–3326 (2008).

29. Snapper, C. M. *et al.* Distinct types of T-cell help for the induction of a humoral immune response to Streptococcus pneumoniae. *Trends in Immunology* **22**, 308–11 (2001).

30. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. (Elsevier: 2011).

31. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (Garland Science: New York, 2001).

32. Kinjo, Y. *et al.* Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nature Immunology* **12**, 966–74 (2011).

33. Hamid, Q. & Tulic, M. Immunobiology of asthma. *Annual Review of Physiology* **71**, 489–507 (2009).

34. Ligi, I. Hematología, inmunología e infecciones nosocomiales del recién nacido prematuro. *EMC - Pediatría* **47**, 1–9 (2012).

35. Vanaudenaerde, B. M. *et al.* Innate and adaptive interleukin-17-producing lymphocytes in chronic inflammatory lung disorders. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **183**, 977–86 (2011).

36. La Sala, A., Pontecorvo, L., Agresta, A., Rosano, G. & Stabile, E. Regulation of collateral blood vessel development by the innate and adaptive immune system. *Trends in Molecular Medicine* **18**, 494–501 (2012).

37. Malley, R. *et al.* CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4848–53 (2005).

38. Lu, Y.-J. *et al.* Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathogens* **4**, e1000159 (2008).

39. Zhang, Z., Clarke, T. B. & Weiser, J. N. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *J Clin Invest.* **119**, 1899–909 (2009).

40. Holgate, S. T. Pathogenesis of asthma. *Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **38**, 872–97 (2008).

41. Bowen, H., Kelly, A., Lee, T. & Lavender, P. Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells. *Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **38**, 1422–31 (2008).

42. Hoshino, A. *et al.* STAT6-mediated signaling in Th2-dependent allergic asthma: critical role for the development of eosinophilia, airway hyper-responsiveness and mucus hypersecretion, distinct from its role in Th2 differentiation. *International Immunology* **16**, 1497–505 (2004).

43. Meyer, E. H., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annual Review of Medicine* **59**, 281–92 (2008).

44. Lambrecht, B. N. & Hammad, H. The airway epithelium in asthma. *Nature Medicine* **18**, 684–692 (2012).

45. Holgate, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature Medicine* **18**, 673–683 (2012).

46. Xiao, C. *et al.* Defective epithelial barrier function in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **128**, 549–56.e1–12 (2011).

47. Jacquet, A. Interactions of airway epithelium with protease allergens in the allergic response. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **41**, 305–11 (2011).

48. Hackett, T.-L. *et al.* Intrinsic phenotypic differences of asthmatic epithelium and its inflammatory responses to respiratory syncytial virus and air pollution. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **45**, 1090–100 (2011).

49. Sajjan, U., Wang, Q., Zhao, Y., Gruenert, D. C. & Hershenson, M. B. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **178**, 1271–81 (2008).

50. Talbot, T. R. *et al.* Asthma as a risk factor for invasive pneumococcal disease. *The New England Journal of Medicine* **352**, 2082–90 (2005).

51. Corne, J. M. *et al.* Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet* **359**, 831–4 (2002).

52. Contoli, M. *et al.* Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nature Medicine* **12**, 1023–6 (2006).

53. Akdis, C. A. & Akdis, M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **123**, 735–46; quiz 747–8 (2009).

54. Shalev, I., Schmelzle, M., Robson, S. C. & Levy, G. Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Seminars in Immunology* **23**, 282–92 (2011).

55. Stock, P., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. Inhibition of the allergic response by regulatory T cells. *Current Opinion in Allergy and Cinical Immunology* **6**, 12–6 (2006).

56. Fujita, H., Soyka, M. B., Akdis, M. & Akdis, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clinical and Translational Allergy* **2**, 2 (2012).

57. Akkoc, T., Akdis, M. & Akdis, C. A. Update in the mechanisms of allergen-specific immunotheraphy. *Allergy, Asthma & Immunology Research* **3**, 11–20 (2011).

58. Heilig, J. S. & Tonegawa, S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* **322**, 836–40 (1986).

59. Haas, W., Pereira, P. & Tonegawa, S. Gamma/delta cells. *Annual Review of Immunology* **11**, 637–85 (1993).

60. Wands, J. M. *et al.* Distribution and leukocyte contacts of gammadelta T cells in the lung. *Journal of Leukocyte Biology* **78**, 1086–96 (2005).

61. Lahn, M. *et al.* MHC class I-dependent Vgamma4+ pulmonary T cells regulate alpha beta T cell-independent airway responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 8850–5 (2002).

62. Hahn, Y.-S. *et al.* V gamma 4+ gamma delta T cells regulate airway hyperreactivity to methacholine in ovalbumin-sensitized and challenged mice. *Journal of Immunology* **171**, 3170–8 (2003).

63. Kim, H. Y., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature Immunology* **11**, 577–84 (2010).

64. Hahn, Y.-S. *et al.* Different potentials of gamma delta T cell subsets in regulating airway responsiveness: V gamma 1+ cells, but not V gamma 4+ cells, promote airway hyperreactivity, Th2 cytokines, and airway inflammation. *Journal of Immunology* **172**, 2894–902 (2004).

65. Kirby, A. C., Raynes, J. G. & Kaye, P. M. The role played by tumor necrosis factor during localized and systemic infection with Streptococcus pneumoniae. *The Journal of Infectious Diseases* **191**, 1538–47 (2005).

66. Kirby, A. C., Raynes, J. G. & Kaye, P. M. CD11b regulates recruitment of alveolar macrophages but not pulmonary dendritic cells after pneumococcal challenge. *The Journal of infectious diseases* **193**, 205–13 (2006).

67. Kirby, A. C., Newton, D. J., Carding, S. R. & Kaye, P. M. Evidence for the involvement of lung-specific gammadelta T cell subsets in local responses to Streptococcus pneumoniae infection. *European Journal of Immunology* **37**, 3404–13 (2007).

68. Murdoch, J. R. & Lloyd, C. M. Resolution of allergic airway inflammation and airway hyperreactivity is mediated by IL-17-producing {gamma}{delta}T cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **182**, 464–76 (2010).

69. Born, W. *et al.* Immunoregulatory functions of gamma delta T cells. *Advances in Immunology* **71**, 77–144 (1999).

70. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of γδ T cells to immunology. *Nature reviews. Immunology* **13**, 88–100 (2013).

71. Sallmann, E. *et al.* High-affinity IgE receptors on dendritic cells exacerbate Th2-dependent inflammation. *Journal of Immunology* **187**, 164–71 (2011).

72. Jacoby, P. *et al.* Modelling the co-occurrence of Streptococcus pneumoniae with other bacterial and viral pathogens in the upper respiratory tract. *Vaccine* **25**, 2458–64 (2007).

73. Warner, D. F. & Mizrahi, V. The survival kit of Mycobacterium tuberculosis. *Nature Medicine* **13**, 282–284 (2007).

74. Lamichhane, G. & Bishai, W. Defining the “survivasome” of Mycobacterium tuberculosis. *Nature Medicine* **13**, 280–282 (2007).

75. Tuerlinckx, D. *et al.* Optimal assessment of the ability of children with recurrent respiratory tract infections to produce anti-polysaccharide antibodies. *Clinical and Experimental Immunology* **149**, 295–302 (2007).

76. Al-Herz, W. & McGeady, S. J. Antibody response in common variable immunodeficiency. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* **90**, 244–7 (2003).

77. Sorensen, R. U. *et al.* Influence of age on the response to Streptococcus pneumoniae vaccine in patients with recurrent infections and normal immunoglobulin concentrations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **102**, 215–21 (1998).

78. Alachkar, H., Taubenheim, N., Haeney, M. R., Durandy, A. & Arkwright, P. D. Memory switched B cell percentage and not serum immunoglobulin concentration is associated with clinical complications in children and adults with specific antibody deficiency and common variable immunodeficiency. *Clinical Immunology* **120**, 310–8 (2006).

79. Maratea, M., Gaillard, M., Carelli, D. & Bezrodnick, L. Falla de respuesta a antígenos polisacáridos (FRPS): estudio fenotípico del compartimento de linfocitos B (LB). *LVI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología* (2009).

80. Andoniou, C. E., Andrews, D. M. & Degli-Esposti, M. A. Natural killer cells in viral infection: more than just killers. *Immunological Reviews* **214**, 239–50 (2006).

81. Yokoyama, W. M., Kim, S. & French, A. R. The dynamic life of natural killer cells. *Annual Review of Immunology* **22**, 405–29 (2004).

82. Elhaik-Goldman, S. *et al.* The natural cytotoxicity receptor 1 contribution to early clearance of Streptococcus pneumoniae and to natural killer-macrophage cross talk. *PloS One* **6**, e23472 (2011).

83. Lanier, L. L. NK cell recognition. *Annual Review of Immunology* **23**, 225–74 (2005).

84. Bauer, S. *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**, 727–9 (1999).

85. Moretta, A. *et al.* Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. *Annual Review of Immunology* **19**, 197–223 (2001).

86. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* **22**, 633–40 (2001).

87. Ferlazzo, G. & Münz, C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *Journal of Immunology* **172**, 1333–9 (2004).

88. Dalbeth, N. *et al.* CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *Journal of Immunology* **173**, 6418–26 (2004).

89. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74–80 (2010).

90. Cros, J. *et al.* Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* **33**, 375–86 (2010).

91. Wong, K. L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **118**, e16–31 (2011).

92. Zawada, A. M. *et al.* SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* **118**, e50–61 (2011).

93. Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* **87**, 373–7 (1996).

94. Belge, K.-U. *et al.* The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *Journal of Imunology* **168**, 3536–42 (2002).

95. Skrzeczyńska-Moncznik, J. *et al.* Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scandinavian Journal of Immunology* **67**, 152–9 (2008).

96. Smedman, C. *et al.* FluoroSpot analysis of TLR-activated monocytes reveals several distinct cytokine secreting subpopulations. *Scandinavian Journal of Immunology* (2011).doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02641.x

97. Martín, P. *et al.* CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 4877–89 (2010).

98. Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum* **97**, 77–89 (1968).

99. Hintzen RQ, de Jong R, Lens SM, Brouwer M, Baars P, van L. R. Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J Immunol* 1;151(5):2426–35.at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689607>

100. Liu, W. *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine* **203**, 1701–11 (2006).

101. Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, W. T. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods* **346**, 55–63 (2010).

102. Kerzel, S. *et al.* T(H)17 Cell Frequency in Peripheral Blood from Children with Allergic Asthma Correlates with the Level of Asthma Control. *The Journal of Pediatrics* (2012).doi:10.1016/j.jpeds.2012.07.051

103. Maggi, L. *et al.* CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *European Journal of Immunology* **40**, 2174–81 (2010).

104. Poli, A. *et al.* CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* **126**, 458–65 (2009).

105. Chen, Z. W. Immune regulation of gammadelta T cell responses in mycobacterial infections. *Clin Immunol* **116**, 202–207 (2005).

106. Finiasz, M., Otero, C., Bezrodnik, L. & Fink, S. The role of cytokines in atopic asthma. *Current Medicinal Chemistry* **18**, 1476–87 (2011).

107. Lee, J.-H. *et al.* The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clinical and Experimental Immunology* **148**, 53–63 (2007).

108. Antas, P. R. Z. *et al.* Kinetics of T cell-activation molecules in response to Mycobacterium tuberculosis antigens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 1097–9 (2002).

109. Annunziato, F. & Romagnani, S. Do studies in humans better depict Th17 cells? *Blood* **114**, 2213–9 (2009).

110. Balboa, L. *et al.* Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAP kinase. *European Journal of Immunology* (2012).doi:10.1002/eji.201242557

111. Mantegani, P. *et al.* Perturbation of the natural killer cell compartment during primary human immunodeficiency virus 1 infection primarily involving the CD56 bright subset. *Immunology* **129**, 220–33 (2010).

112. Eissens, D. N. *et al.* Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. *PloS one* **7**, e30930 (2012).

113. Hong, H. S. *et al.* HIV infection is associated with a preferential decline in less-differentiated CD56dim CD16+ NK cells. *Journal of Virology* **84**, 1183–8 (2010).

114. De Maria, A., Bozzano, F., Cantoni, C. & Moretta, L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid

producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 728–32 (2011).

115. Van Beelen, A. J. *et al.* Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* **27**, 660–9 (2007).

116. Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor-beta "reprograms" the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* **9**, 1341–6 (2008).

117. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, et al. IL-4 inhibits TGF-β-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-β, generates IL-9+IL-10+Foxp3− effector T cells. *Nat Immunol* **9**, 1347–1355 (2008).

118. Li, H. & Rostami, A. IL-9: basic biology, signaling pathways in CD4+ T cells and implications for autoimmunity. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* **5**, 198–209 (2010).

119. Ye, Z.-J. *et al.* Differentiation and recruitment of Th9 cells stimulated by pleural mesothelial cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. *PloS one* **7**, e31710 (2012).

120. Wan, Y. Y. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* **130**, 166–71 (2010).

121. Mureithi, M. W. *et al.* T cell memory response to pneumococcal protein antigens in an area of high pneumococcal carriage and disease. *The Journal of Infectious Diseases* **200**, 783–93 (2009).

122. Trzcinski, K., Thompson, C., Malley, R. & Lipsitch, M. Antibodies to Conserved Pneumococcal Antigens Correlate with , but Are Not Required for , Protection against Pneumococcal Colonization Induced by Prior Exposure in a Mouse Model Antibodies to Conserved Pneumococcal Antigens Correlate with , but Are Not Re. *Infect. Immun* **73**, 7043–6 (2005).

123. Proud, D. & Leigh, R. Epithelial cells and airway diseases. *Immunological Reviews* **242**, 186–204 (2011).

124. Kloepfer, K. & Gern, J. Virus/allergen interactions and exacerbations of asthma. *Immunology And Allergy Clinics Of North America* **30**, 553–63 (2010).

125. Korppi, M. Management of Bacterial Infections in Children with Asthma. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7(7):869–77 (2009).

126. Meraviglia, S., El Daker, S., Dieli, F., Martini, F. & Martino, A. γδ T cells cross-link innate and adaptive immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Clinical & Developmental Immunology* **2011**, 587315 (2011).

127. Pawankar, R. U., Okuda, M., Suzuki, K., Okumura, K. & Ra, C. Phenotypic and molecular characteristics of nasal mucosal gamma delta T cells in allergic and infectious rhinitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **153**, 1655–65 (1996).

128. Spinozzi, F. *et al.* Increased allergen-specific, steroid-sensitive gamma delta T cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Annals of Internal Medicine* **124**, 223–7 (1996).

129. Lloyd, C. M. & Hessel, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature Reviews. Immunology* **10**, 838–48 (2010).

130. Pumputiene, I., Emuzyte, R., Siaurys, A., Tamosiunas, V. & Valiulis, A. CD4+CD25high Treg cells in peripheral blood during remission and exacerbation of allergic asthma in children. *Acta Paediatrica* **100**, 1006–1010 (2011).

131. Martín, P. & Sánchez-Madrid, F. CD69: an unexpected regulator of TH17 cell-driven inflammatory responses. *Science Signaling* **4**, pe14 (2011).

132. Miki-Hosokawa, T. *et al.* CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. *Journal of Immunology* **183**, 8203–15 (2009).

133. Kobrynski, L. J., Sousa, A. O., Nahmias, A. J. & Lee, F. K. Cutting edge: antibody production to pneumococcal polysaccharides requires CD1 molecules and CD8+ T cells. *Journal of Immunology* **174**, 1787–90 (2005).

134. Weber, S. E., Tian, H. & Pirofski, L. CD8+ cells enhance resistance to pulmonary serotype 3 Streptococcus pneumoniae infection in mice. *Journal of Immunology* **186**, 432–42 (2011).

135. Machura, E., Mazur, B., Rusek-Zychma, M. & Barć-Czarnecka, M. Cytokine production by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in atopic childhood asthma. *Clinical & Developmental Immunology* **2010**, 606139 (2010).

136. Cho, J. Y. Recent advances in mechanisms and treatments of airway remodeling in asthma: a message from the bench side to the clinic. *The Korean Journal of Internal Medicine* **26**, 367–83 (2011).

137. Kuo, M. L., Huang, J. L., Yeh, K. W., Li, P. S. & Hsieh, K. H. Evaluation of Th1/Th2 ratio and cytokine production profile during acute exacerbation and convalescence in asthmatic children. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* **86**, 272–6 (2001).

138. Arvå, E. & Andersson, B. Induction of phagocyte-stimulating and Th1-promoting cytokines by in vitro stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with Streptococcus pneumoniae. *Scandinavian Journal of Immunology* **49**, 417–23 (1999).

139. Lama, M., Chatterjee, M., Nayak, C. R. & Chaudhuri, T. K. Increased interleukin-4 and decreased interferon-γ levels in serum of children with asthma. *Cytokine* **55**, 335–8 (2011).

140. Robroeks, C. M. H. H. T. *et al.* Prediction of asthma exacerbations in children: results of a one-year prospective study. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **42**, 792–8 (2012).

141. Joetham, A. *et al.* Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *Journal of Immunology* **178**, 1433–42 (2007).

142. Lloyd, C. M. & Hawrylowicz, C. M. Regulatory T cells in asthma. *Immunity* **31**, 438–49 (2009).

143. Joetham, A. *et al.* Loss of T regulatory cell suppression following signaling through glucocorticoid-induced tumor necrosis receptor (GITR) is dependent on c-Jun N-terminal kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 17100–8 (2012).

144. Schmid, P. *et al.* Th17/Th1 biased immunity to the pneumococcal proteins PcsB, StkP and PsaA in adults of different age. *Vaccine* **29**, 3982–9 (2011).

145. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annual Review of Immunology* **26**, 513–33 (2008).

146. Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M. D. & Kaveri, S. V Monoclonal antibody and intravenous immunoglobulin therapy for rheumatic diseases: rationale and mechanisms of action. *Nature Clinical Practice. Rheumatology* **3**, 262–72 (2007).

147. Tha-In, T., Bayry, J., Metselaar, H. J., Kaveri, S. V & Kwekkeboom, J. Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. *Trends in Immunology* **29**, 608–15 (2008).

148. Ephrem, A. *et al.* Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* **111**, 715–22 (2008).

149. Maddur, M. S. *et al.* Immunomodulation by intravenous immunoglobulin: role of regulatory T cells. *Journal of Clinical Immunology* **30 Suppl 1**, S4–8 (2010).

150. Tha-In, T., Metselaar, H. J., Bushell, A. R., Kwekkeboom, J. & Wood, K. J. Intravenous immunoglobulins promote skin allograft acceptance by triggering functional activation of CD4+Foxp3+ T cells. *Transplantation* **89**, 1446–55 (2010).

151. Fritz, J. H. *et al.* Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* **26**, 445–59 (2007).

152. Duraisingham, S. S., Hornig, J., Gotch, F. & Patterson, S. TLR-stimulated CD34 stem cell-derived human skin-like and monocyte-derived dendritic cells fail to induce Th17 polarization of naive T cells but do stimulate Th1 and Th17 memory responses. *Journal of Immunology* **183**, 2242–51 (2009).

153. Evans, H. G., Suddason, T., Jackson, I., Taams, L. S. & Lord, G. M. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 17034–9 (2007).

154. Hoeve, M. A. *et al.* Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. *European Journal of Immunology* **36**, 661–70 (2006).

155. Nakae, S., Iwakura, Y., Suto, H. & Galli, S. J. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *Journal of Leukocyte Biology* **81**, 1258–68 (2007).

156. Putheti, P., Awasthi, A., Popoola, J., Gao, W. & Strom, T. B. Human CD4 memory T cells can become CD4+IL-9+ T cells. *PloS one* **5**, e8706 (2010).

157. Wong, M. T. *et al.* Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21. *Immunology and Cell Biology* **88**, 624–31 (2010).

158. Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**, 1033–6 (2003).

159. Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231–4 (2006).

160. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–8 (2006).

161. Yang, X. O. *et al.* Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* **29**, 44–56 (2008).

162. Fortis, C. & Poli, G. Dendritic cells and natural killer cells in the pathogenesis of HIV infection. *Immunologic Research* **33**, 1–21 (2005).

163. Douglas, S. D. *et al.* Natural killer cell enumeration and function in HIV-infected and high-risk uninfected adolescents. *AIDS Research and Human Retroviruses* **17**, 543–52 (2001).

164. Hu, P. F. *et al.* Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16+CD56+ cells and expansion of a population of CD16dimCD56- cells with low lytic activity. *Journal of Acquired*

Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology: Official Publication of the International Retrovirology Association **10**, 331–40 (1995).

165. Alter, G. *et al.* Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* **106**, 3366–9 (2005).

166. Maddur, M. S., Kaveri, S. V & Bayry, J. Regulation of human dendritic cells by B cells depends on the signals they receive. *Blood* **119**, 3863–4 (2012).

167. Zietara, N. *et al.* Immunoglobulins drive terminal maturation of splenic dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1–6 (2013).doi:10.1073/pnas.1210654110

168. Huang, G., Wang, Y. & Chi, H. Regulation of TH17 cell differentiation by innate immune signals. *Cell Mol Immunol* **9**, 287–295 (2012).

169. Hang, G., Zhichang Shi, L. & Chi, H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine.* **48**, 161–169 (2009).

170. Cohen, P. Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 317–24 (2009).

171. Huang, G. *et al.* Signaling via the kinase p38α programs dendritic cells to drive TH17 differentiation and autoimmune inflammation. *Nature Immunology* **13**, 152–61 (2012).

172. Ivanov, I. I. *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485–98 (2009).