

### 32. Salud Humana

## **Impacto de poblaciones celulares efectoras y entorno de activación en la respuesta protectora contra pertussis.**

Elizagaray, Maia L.; Hozbor, Daniela F.; Moreno, Griselda N.; Rumbo, Martín.

elizagaraym@gmail.com

Instituto de estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)

Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

### **Resumen**

Pertussis es una patología respiratoria causada por la bacteria *B. pertussis* que es considerada la enfermedad inmunoprevenible menos controlada. El grupo de investigación al que pertenezco ha desarrollado una nueva formulación vacunal basada en vesículas de membrana externa (OMVs) derivadas de *B. pertussis*, que ha resultado protectora y segura en el modelo murino de infección intranasal. *Objetivo:* Obtener y poner a punto herramientas necesarias para identificar y caracterizar el rol de la población celular CD4 en el contexto de la inmunización contra pertussis utilizando el modelo murino de protección, a corto y largo plazo. *Metodología:* Trabajamos de forma comparativa con las vacunas comerciales en uso. Los ensayos se realizaron en una situación de protección a corto y largo plazo empleando el modelo de desafío intranasal en ratones. Evaluamos la capacidad protectora de la inmunidad celular de esplenocitos provenientes de animales inmunizados y luego depletados con MoAb anti mouse CD4 (ascitis de hibridoma GK1.5). *Resultados:* El tratamiento i.p. con el MoAb anti CD4 en los ratones dadores y receptores de esplenocitos puso de manifiesto el rol de las células CD4 en la protección celular inducida por las OMVs cuando la transferencia fue de  $4,2 \times 10^7$  esplenocitos. En el corto plazo, la transferencia de esplenocitos provenientes de animales inmunizados con OMVBp redujo la colonización bacteriana de los pulmones:  $4,99 \pm 0,15$  vs.  $5,99 \pm 0,15$  logCFU/pulmones ( $p < 0,005$ ). La depleción de células CD4 produjo un incremento significativo en el recuento:  $5,99 \pm 0,061$  logCFU/pulmones ( $p < 0,05$ ). Este efecto no pudo observarse en el largo plazo aunque la inmunización activa a ese tiempo es efectiva. El análisis de los resultados sugiere que la respuesta de memoria residente en tejido (pulmón) podría tener un rol clave en la protección a largo plazo.

**Palabras clave:** Vesículas de membrana externa, vacunas, pertussis, anticuerpos monoclonales.

## Introducción

La bacteria *Bordetella pertussis* causa la enfermedad denominada tos convulsa, pertussis o coqueluche que constituye una severa infección respiratoria en infantes y niños, como así también en población adolescente y adulta. El uso masivo de vacunas desde mediados del siglo XX ha permitido por años controlar esta enfermedad sin embargo en las últimas décadas la enfermedad ha resurgido en varios países, aún en aquellos con alta cobertura vacunal (1). La primera vacuna desarrollada y aún en uso en muchos países consiste en una suspensión bacteriana del agente causal muerto y detoxificado (vacuna celular, abreviada wP del inglés). Esta formulación comenzó a utilizarse en los años 50 con mucho éxito en la disminución de la morbimortalidad asociada a la enfermedad. Lamentablemente con el correr de los años y con la extensión en su uso comenzaron a aparecer reportes de reacciones adversas algunas de las cuales resultaron ser graves lo que condujo al desarrollo de nuevas vacunas menos reactogénicas (2,3). Se desarrollaron entonces las vacunas acelulares o de componentes constituidas por inmunógenos protectores purificados (vacunas acelulares, aP del inglés). Estas vacunas volvieron a traer confianza en la población y varios países reemplazaron

en sus calendarios a las wP por aP. La Organización Mundial de la Salud (OMS) sin embargo reportó que no existen evidencias para dejar de usar las vacunas wP en la población pediátrica hasta los 7 años. Así las vacunas celulares y acelulares pueden ser utilizadas para cumplimentar las recomendaciones de la OMS para la población pediátrica. Para los refuerzos en población adolescente adulta solo se ha recomendado el uso de vacunas acelulares ya que en esta población la probabilidad de ocurrencia de reacciones adversas severas asociadas a la vacunación con wP es alta (4,5).

La vacunación contra pertussis es obligatoria en todo el mundo pero el esquema de vacunación (multidosis) y el tipo de vacuna que se emplea (celular o acelular) depende de cada país. Argentina emplea vacuna celular para el esquema primario de 3 dosis (2, 4 y 6 meses) y los dos primeros refuerzos a los 18 meses y al ingreso escolar, y recientemente se han sumado otros refuerzos con vacuna acelular en adolescentes (11 años) y adultos (personal de salud que trabaja con niños y embarazadas).

Como hemos descripto más arriba pese al uso masivo de estas vacunas en las últimas décadas las tasas de incidencia de la enfermedad se han incrementado llegando a producirse en el mundo y por año alrededor de 16 millones de casos

con aproximadamente 200.000 muertes según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (6). La mayoría de estos casos se reportan en los países en desarrollo, aunque en los últimos años también se han registrado brotes de gran envergadura en los países desarrollados, incluso en aquellos con altas tasas de vacunación (7,8). Esta situación epidemiológica surgida en los últimos años y por demás preocupante ha obligado a la comunidad científica, junto a otros profesionales que se desempeñan en el área de la salud, a focalizar sus actividades en pos de comprender esta nueva situación, identificar sus posibles causas y revisar e implementar nuevas estrategias para el control de la enfermedad. Respecto de las causas que podrían explicar la resurgencia de la enfermedad ya se han propuesto varias, la mayoría de ellas asociadas a las vacunas actualmente en uso: relativa baja efectividad de las mismas obligando a aplicaciones de varias dosis (inclusive en adultos) y metas de coberturas altas (mayores al 90%); corta duración de la inmunidad conferida por las vacunas (9) y adaptación de la población bacteriana circulante a huéspedes inmunizados (10,11). En el caso de las vacunas acelulares, que han desplazado completamente a las wP de los esquemas

primarios de vacunación en países desarrollados, el fenómeno de pérdida de la inmunidad y la presión de selección ejercida por ellas sobre la población bacteriana circulante parecen ser más acuciantes ya que en los últimos años se ha demostrado que la pérdida de la inmunidad ocurre más temprano (2 -3 años) que en poblaciones en las que se emplean esquemas con vacunas celulares (12)(13). El cambio de la vacuna celular wP por las vacunas acelulares aP en las dosis primarias ha complicado la situación de la enfermedad, probablemente debido a que la respuesta inmune inducida por las vacunas aP es menos robusta que la inducida por las vacunas wP. Las vacunas aP inducen una respuesta Th2 y también Th17 que es menos eficaz que la fuerte respuesta Th1 inducida por la infección natural o por la inmunización con wP (4,14)(15). Lamentablemente, a esos países que se han volcado hacia el uso de aP les resulta prácticamente imposible volver a usar las wP debido a que las mismas han perdido aceptabilidad por parte de la población (16,17).

Bajo esta situación epidemiológica preocupante existe consenso sobre la necesidad de desarrollar una nueva vacuna que supere las debilidades de las actuales vacunas mientras se realiza un uso mejorado de las actuales vacunas para dar una respuesta que lleve a

mejoras en la calidad sanitaria actual. El grupo liderado por la Dra. Hozbor en colaboración con otros grupos de investigación de nuestra facultad ha desarrollado una nueva vacuna acelular en el marco de los Proyectos PAE VacSal (ANPCyT), PICT 2012-2719 y PICT 2014-3617. Nuestra formulación comparte las propiedades benéficas de las vacunas acelulares actuales en cuanto a la bioseguridad y de las vacunas celulares en cuanto a su respuesta inmune y capacidad protectora (Patente internacional Application Number: PCT/IB2014/060143). Esta nueva formulación acelular se ha obtenido a partir de componentes de membrana de *B. pertussis* (vesículas de membrana externa, OMVs por su abreviatura en inglés) y ha resultado ser no sólo inmunogénica sino también protectora y biosegura en el modelo de desafío intranasal en ratones aceptado (18–20). Dado el avance de este desarrollo y el contexto del conocimiento actual sobre la respuesta inmune circulante y a nivel de pulmón en esta presentación proponemos profundizar de manera comparativa con las vacunas actualmente en uso, el conocimiento del tipo de respuesta inmune desencadenada por la vacunación por OMVs formuladas como vacuna triple acelular.

### **Objetivos**

Obtener y poner a punto herramientas necesarias para identificar y caracterizar el rol de la población celular CD4 en el contexto de la inmunización contra pertussis utilizando el modelo murino de protección a corto y largo plazo.

### **Materiales y Métodos**

Obtención de las OMVs: Las OMVBp necesarias para la realización de este proyecto serán obtenidas mediante una metodología ya puesta a punto en el laboratorio de la Dra Hozbor (Hozbor D, 1999 (21); Roberts R, 2008 (18); Asensio C, 2011 (19); Bottero D, 2013 (22)).

Plan de inmunización: Se utilizará un protocolo de inmunización aprobado por el CICUAL de nuestra Facultad. El mismo incluye el uso de ratones de la cepa BALB/c (de 6-8 semanas de edad). Se usarán grupos de cinco animales por condición de inmunización realizado por vía sistémica (i.p) con la nueva plataforma vacunal formulada con los componentes tetánico y diftérico análogos a los de la vacuna acelular comercial: TdapOMVBp (3ug de proteínas totales de OMV). Como condición control con la que se contrastarán de manera comparativa los resultados, se efectuará la inmunización con la vacuna comercial TdaP (Boostrix) utilizando 1/10 (dosis protectora en el modelo murino). Asimismo se realizará un

control de inmunización con la vacuna celular wP y por último se incorporará el grupo control naive quien no recibirá inmunización de ningún tipo.

El esquema de vacunación utilizado será de dos dosis separadas por un período de quince días. Se obtendrá suero mediante sangrado submandibular luego de la 1<sup>o</sup> inmunización y a diferentes tiempos posteriores a la 2<sup>o</sup> inmunización.

Producción de anticuerpos monoclonales para la depleción de poblaciones específicas: Nuestro laboratorio cuenta con hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales específicos generados mediante técnicas de fusión celular descriptas previamente (Hiriart et al. 2013(23)). De esta manera se prevé administrar a grupos de 4 ratones Balb/c o nude en función de la característica del hibridoma, 500  $\mu$ l de Pristane. Posteriormente, a la semana, se procede a la inyección intraperitoneal de  $2 \times 10^6$  células de hibridoma específico productor en 500  $\mu$ l de PBS en cada animal y al cabo de 2 semanas se colecta el líquido ascítico generado. Toda la ascitis obtenida correspondiente a los diferentes clones se procesa separadamente, esta producción ya puede ser utilizada como anticuerpo depletante.

Análisis *in vivo* del impacto de la depleción transiente de la población T CD4 sobre la

protección conferida por la vacunación con las vacunas comerciales wP y aP y nuestra formulación OMVBp: Recuento de la carga bacteriana pulmonar en placas de BGA-sangre en los diferentes contextos de inmunización y desafiados intranasalmente con la cepa de referencia Tohama *B. pertussis*, realizando la depleción mediante la inyección i.p de IgG monoclonal anti CD4 a tiempos posteriores a la inmunización y previo al desafío intranasal. Para ello se utilizarán ratones de la cepa BALB/c que recibirán el esquema de vacunación detallado más arriba, asimismo se realizarán grupos de animales controles de inmunización quienes recibirán la vacunación acelular comercial TdaP, y la vacuna comercial wP. Una vez terminado el protocolo de inmunización de dos dosis, se seleccionarán un subgrupo de animales de cada condición de inmunización, quienes serán inyectados i.p. con anticuerpos específicos (monoclonales producidos y obtenidos en nuestro laboratorio, específicamente: anti CD4 (hibridoma productor GK1.1), direccionando la activación por complemento y con ello la depleción de la población celular que posea el antígeno de superficie indicado El esquema de inyección/depleción será de una inyección 24h previa a la transferencia de esplenocitos y 24 y 48h post desafío en

los ratones receptores. De esta manera una vez finalizado el esquema de depleción todos los animales serán desafiados intranasalmente con *B. pertussis* para posteriormente determinar la protección con la cuantificación en pulmón de UFC 7 días post desafío.

Confirmación de la depleción: Con el fin de determinar el alcance de la depleción, se realizará previamente al ensayo de protección, una evaluación de la disminución de la población celular específica en sangre periférica y bazo mediante citometría de flujo.

### Resultados y Discusión

En un contexto de inmunización activa con las vacunas wP y OMVBp y habiendo depletado el 99% de la población linfocitaria CD4 (confirmado por citometría de flujo), no se observaron diferencias en la protección por recuento de UFC/pulmones 7 días post desafío intranasal. Como en la inmunización activa la presencia de anticuerpos protectores así como también poblaciones celulares residentes de tejidos que no son sensibles a la depleción sistémica podrían estar interfiriendo en la medida de protección, es que decidimos repetir el ensayo en un contexto de inmunización pasiva por transferencia de esplenocitos totales provenientes de ratones inmunizados con las vacunas wP y

OMVBp. Habiendo depletado el 99% de la población CD4 (confirmado por citometría de flujo), tampoco se observaron diferencias en la protección por recuento de UFC/pulmones 7 días post desafío intranasal.

Estos resultados muestran la redundancia tanto en cantidad de células inmunes como también de otras poblaciones celulares en la respuesta celular protectora contra pertussis en nuestro modelo murino de infección. La ausencia de anticuerpos anti proteínas totales de *B. pertussis* en sobrenadante de esplenocitos a transferir, así como también en suero de ratones transferidos previo desafío fue demostrado por ELISA.

Procedimos a la cuantificación de esplenocitos provenientes de ratones inmunes necesarios para conferir protección en nuestro modelo y encontramos que incluso transfiriendo la cantidad de esplenocitos equivalente a 1/16 del bazo total, se obtenía los mismos niveles de protección que transfiriendo la cantidad de esplenocitos de 1 bazo entero. Decidimos repetir el ensayo anterior de depleción de la población CD4 en un contexto de inmunización pasiva pero transfiriendo el equivalente a 1/4 (como condición control de protección) y 1/50 (como condición control de no protección) de esplenocitos de 1 bazo entero. Los ensayos se realizaron en una

situación de protección a corto y otra a largo plazo empleando el modelo de desafío intranasal en ratones. En el corto plazo, la transferencia de esplenocitos provenientes de animales inmunizados con OMVBp redujo la colonización bacteriana de los pulmones:  $4,99 \pm 0,15$  vs.  $5,99 \pm 0,15$  logCFU/pulmones ( $p < 0,005$ ). La depleción de células CD4 produjo un incremento significativo en el recuento:  $5,99 \pm 0,061$  logCFU/pulmones ( $p < 0,05$ ). Este efecto no pudo observarse en el largo plazo aunque la inmunización activa a ese tiempo es efectiva. El análisis de los resultados en ambas situaciones de protección sugiere que la respuesta de memoria residente en tejido (pulmón) podría tener un rol clave en la protección a largo plazo.

### Conclusiones

La respuesta inmune celular anti pertussis en nuestro modelo murino de infección intranasal resulta redundante y sólo podemos evidenciar la relevancia de la población CD4 con un número discriminado de esplenocitos transferidos en la inmunización pasiva.

Observamos además que la protección conferida por la transferencia de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con la vacuna OMVBp se pierde en el largo plazo, y no así la conferida por esplenocitos provenientes

de ratones inmunizados con la vacuna wP comercial.

### Bibliografía

1. Saadatian-Elahi M, Plotkin S, Mills KHG, Halperin SA, McIntyre PB, Picot V, et al. Pertussis: Biology, epidemiology and prevention. Vaccine [Internet]. 2016 Nov 21 [cited 2017 Apr 5];34(48):5819–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X16309483>
2. Rumbo M, Hozbor D. Development of improved pertussis vaccine. Hum Vaccin Immunother [Internet]. 2014;10(8):2450–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25424954>
3. Guiso N. Bordetella pertussis and pertussis vaccines. Clin Infect Dis [Internet]. 2009 Nov 15 [cited 2012 Jul 18];49(10):1565–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19839747>
4. Bancroft T, Dillon MBC, da Silva Antunes R, Paul S, Peters B, Crotty S, et al. Th1 versus Th2 T cell polarization by whole-cell and acellular childhood pertussis vaccines persists upon re-immunization in adolescence and adulthood. Cell Immunol. 2016;
5. Sheridan SL, Frith K, Snelling TL, Grimwood K, McIntyre PB, Lambert SB. Waning vaccine immunity in teenagers

- primed with whole cell and acellular pertussis vaccine: recent epidemiology. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2014 Sep 5 [cited 2017 Apr 10];13(9):1081–106. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14760584.2014.944167>
6. Pertussis vaccines: WHO position paper. *Relev Epidemiol Hebd* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2017 Apr 10];85(40):385–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20939150>
  7. He Q, Mertsola J. Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol* [Internet]. 2008 Jun [cited 2017 Apr 10];3(3):329–39. Available from: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/17460913.3.3.329>
  8. Clark TA. Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. *J Infect Dis* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2017 Apr 10];209(7):978–81. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiu001>
  9. McGirr A, Fisman DN. Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: a meta-analysis. *Pediatrics* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2017 Apr 10];135(2):331–43. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2014-1729>
  10. de Gouw D, Diavatopoulos D a, Bootsma HJ, Hermans PWM, Mooi FR. Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2011 May [cited 2012 Jul 20];35(3):441–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204863>
  11. Mooi FR, van Loo IH, King AJ. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause for its reemergence? *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2001 [cited 2017 Apr 10];7(3 Suppl):526–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11485646>
  12. Tartof SY, Lewis M, Kenyon C, White K, Osborn A, Liko J, et al. Waning immunity to pertussis following 5 doses of DTaP. *Pediatrics* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2017 Apr 10];131(4):e1047-52. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2012-1928>
  13. Klein NP, Bartlett J, Rowhani-Rahbar A, Fireman B, Baxter R. Waning protection after fifth dose of acellular pertussis vaccine in children. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Sep 13 [cited 2017 Apr 10];367(11):1012–9. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1200850>



14. Ross PJ, Sutton CE, Higgins S, Allen AC, Walsh K, Misiak A, et al. Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to Bordetella pertussis: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. Harvill ET, editor. PLoS Pathog [Internet]. 2013 Apr 4 [cited 2017 Apr 5];9(4):e1003264. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003264>
15. Warfel JM, Merkel TJ. Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. Mucosal Immunol [Internet]. 2013 Jul 28 [cited 2017 Apr 10];6(4):787–96. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mi.2012.117>
16. Plotkin SA. The Pertussis Problem. Clin Infect Dis [Internet]. 2014 Mar 15 [cited 2017 Apr 10];58(6):830–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363332>
17. Burdin N, Handy LK, Plotkin SA. What Is Wrong with Pertussis Vaccine Immunity? Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2017 Mar 13 [cited 2017 Apr 4];a029454. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28289064>
18. Roberts R, Moreno G, Bottero D, Gaillard ME, Fingerhann M, Graieb A, et al. Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. Vaccine. 2008;26(36):4639–46.
19. Asensio CJA, Gaillard ME, Moreno G, Bottero D, Zurita E, Rumbo M, et al. Outer membrane vesicles obtained from Bordetella pertussis Tohama expressing the lipid a deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. Vaccine [Internet]. 2011;29(8):1649–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.068>
20. Bottero D, Gaillard ME, Zurita E, Moreno G, Martinez DS, Bartel E, et al. Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine. Vaccine [Internet]. 2016;34(28):3303–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.079>
21. Hozbor D, Rodriguez ME, Fernández J, Lagares A, Guiso N, Yantorno O. Release of outer membrane vesicles from Bordetella pertussis. Curr Microbiol [Internet]. 1999 May [cited 2017 Apr

- 10];38(5):273–8. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10355115>
22. Bottero D, Gaillard ME, Errea A, Moreno G, Zurita E, Pianciola L, et al. Outer membrane vesicles derived from *Bordetella parapertussis* as an acellular vaccine against *Bordetella parapertussis* and *Bordetella pertussis* infection. *Vaccine* [Internet]. 2013;31(45):5262–8. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.059>
23. Hiriart Y, Serradell M, Martínez A, Sampaolesi S, Maciel DG, Chabalgoity JA, et al. Generation and selection of anti-flagellin monoclonal antibodies useful for serotyping *Salmonella enterica*. *Springerplus* [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 10];2(1):640. Available from:  
<http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-2-640>
24. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J Immunol* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2017 Apr 6];174(5):2453–5. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728446>

### Financiamiento

Se agradece a la ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) por el financiamiento.