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

Estudio de la capacidad adyuvante de la proteína Omp19 de Brucella spp. sobre la respuesta inmune adaptativa

Coria, Mirta Lorena

2014

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:
Coria, Mirta Lorena. (2014). Estudio de la capacidad adyuvante de la proteína Omp19 de Brucella spp. sobre la respuesta inmune adaptativa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Coria, Mirta Lorena. "Estudio de la capacidad adyuvante de la proteína Omp19 de Brucella spp. sobre la respuesta inmune adaptativa". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014.

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

Estudio de la capacidad adyuvante de la proteína Omp19 de *Brucella spp.* sobre la respuesta inmune adaptativa

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Mirta Lorena Coria

Director de Tesis: Dra Juliana Cassataro

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Artz

Laboratorio de Inmunogenética. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM- CONICET).

Buenos Aires, 2014

Estudio de la capacidad adyuvante de la proteína Omp19 de *Brucella spp*. sobre la respuesta inmune adaptativa

Resumen

En nuestro laboratorio nos encontramos investigando la utilidad de la porción proteica de la lipoproteína de membrana externa de 19 kiloDalton de *Brucella abortus* (U-Omp19) como adyuvante vacunal. Resultados previos proponían a U-Omp19 como un inhibidor de serin proteasas de estómago e intestino. En esta tesis hemos comprobado que U-Omp19 posee actividad de inhibidor de cisteín proteasas lisosomales y que la co-administración de U-Omp19 inhibe parcialmente la degradación del antígeno (Ag) dentro de las células presentadoras de Ag incrementando su vida media y promoviendo su presentación cruzada a las células T $CD8^+$. U-Omp19 también es capaz de activar células dendríticas (DCs) induciendo un aumento en la expresión de moléculas co-estimulatorias y secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Por último, estudiamos la respuesta inmune inducida en ratones luego de la co-administración de OVA y U-Omp19 por vía subcutánea. Observamos que U-Omp19 como adyuvante de OVA induce una eficiente respuesta inmune celular de tipo T $CD8^+$ y citotóxica con producción de IFN-γ. Los resultados obtenidos indican que la actividad adyuvante de U-Omp19 está dada, por un lado, por su capacidad de activar DCs y por otro lado, por promover la estabilidad y la presentación de Ags a través de su acción como inhibidor de proteasas, éste último representa un novedoso mecanismo aún no descripto para un adyuvante vacunal.

Palabras clave: adyuvante, vacuna, inhibidor de proteasas, presentación antigénica.

Study of the adjuvant capacity of U-Omp19 from *Brucella spp*. on the adaptive immune responses

Abstract

In our laboratory we are investigating the usefulness of the protein moeity of the outer membrane lipoprotein of 19 kiloDalton from *Brucella abortus* (U-Omp19) as a vaccine adjuvant. Previous results proposed U-Omp19 as a serine protease inhibitor. In this thesis we found that U-Omp19 possesses inhibitory activity of lysosomal cysteine proteases, and that the co-administration of U-Omp19 partially inhibits the antigen (Ag) degradation in Ag presenting cells increasing its half life and promoting its cross presentation to $CD8^+$ T cells. U-Omp19 is also capable of activating dendritic cells (DCs) inducing the upregulation of co-stimulatory molecules and secretion of pro-inflammatory cytokines. Finally, we studied the immune response induced in mice after subcutaneously co-administration of U-Omp19 and OVA. We observed that U-Omp19 as adjuvant of OVA induces an effective T $CD8^+$ and cytotoxic cellular immune response with IFN-γ production. These results indicate that the adjuvant activity of U-Omp19 is given, in one hand, by its ability to activate DCs and in the other hand, by promoting Ag stability and presentation through its action as a protease inhibitor, the latter represents a novel mechanism not yet described for a vaccine adjuvant.

Key words: adjuvant, vaccine, proteases inhibitor, antigen presentation.

AGRADECIMIENTOS

La culminación de este gran camino no hubiera sido posible sin toda esta gente a la que quiero agradecer:

En primer lugar, a la Dra. Juliana Cassataro, por guiarme todos estos años y confiar en mí. Por brindarme generosamente su sabiduría, sus consejos no solo profesionales sino sobre la vida. Infinitas Gracias!

Al Dr. Guillermo Giambartolomei por la oportunidad de entrar en el grupo en donde me he formado y aprendido tanto.

A Andrés por tanta buena onda y por estar codo a codo ayudándome todos estos años. Por tantas charlas y momentos compartidos. Gracias amigo, se te va extrañar.

A Kari, por tantas enseñanzas, por acompañarme en mis primeros pasos en el lab y saber que siempre puedo contar con vos.

A las chicas! Mari, Gaby y Lau, gracias por su ayuda y por bancarme en todo este tiempo. Por tantas horas de risas y experimentos compartidos y por lo que se viene.

A todas las chicas del laboratorio Satz, a las que están y las que ya no, que me han apoyado y he compartido tanto.

Al Dr. Leonardo Fainboim y toda la gente del laboratorio de Inmunogénetica del Hospital de Clínicas que me han brindado su ayuda durante estos años.

A toda la gente que ha colaborado conmigo en muchos experimentos de esta tesis, en especial a Mercedes Tkach, Roxana Schillaci y Florencia Sabbione.

A la gente del IIB, que nos han recibido cálidamente y con los que he compartido esta última etapa de escritura.

A mi familia, que siempre está ahí apoyándome en mis proyectos, confiando en mi y compartiendo mis logros.

Y a Mau por hacer durante estos cinco años que los días sean un poco más felices.

ABREVIATURAS **9**

INTRODUCCION **10**

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y VACUNAS *10*

RESPUESTA INMUNE Y VACUNAS *12*

Rol de las células dendríticas en la inmunidad adaptativa contra las infecciones 12

Presentación de antígenos por CPAs 15

La vía endógena o biosintética de presentación antigénica 16

La vía exógena o endocítica de presentación antigénica 16

Intersección de las vías de presentación antigénica: presentación cruzada de antígenos 17

- La vía citosólica 18
- La vía vacuolar 18

TIPOS DE VACUNAS *21*

Vacunas a subunidad 23

DISEÑO RACIONAL DE VACUNAS *25*

¿Cuál es la formulación óptima? 25

I.Antígenos 26

II. Sistemas de administración 26

III. Adyuvantes 27

¿Cómo actúan los adyuvantes? 30

Clasificación 33

Vehículos 34

- Sales de aluminio 34
- Emulsiones 35
- Polímeros 36
- Liposomas 38
- Partículas tipo virus 38
- Virosomas 40
- Saponinas 40
- Iscoms 41

Inmunoestimulatorios 41

- Ligandos de TLR 41
- Proteínas de membrana bacteriana como adyuvantes 44

ANTECEDENTES PREVIOS DE NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACION *45*

PROTEASAS LISOSOMALES Y PRESENTACION ANTIGENICA *49*

OBJETIVO GENERAL **53**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS *53*

MATERIALES Y METODOS **55**

Declaraciones éticas *55*

Animales *55*

Antígenos y adyuvantes *55*

I.ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DE U-OMP19 SOBRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR *57*

Inmunizaciones *57*

Obtención de suspensiones de bazo *57*

Obtención de suspensiones celulares de ganglios linfáticos drenantes *57*

Recuento de células viables *58*

Determinación de IFN-γ intracelular en linfocitos T CD8$^+$ *58*

Ensayo de proliferación in vivo mediante transferencia adoptiva de células transgénicas *59*

Ensayo de presentación cruzada de OVA por DCs *59*

II.ESTUDIO DEL ROL DE U-OMP19 COMO INHIBIDOR DE CISTEIN PROTEASAS *60*

Antígenos utilizados para estudiar la actividad de inhibidor de proteasas *60*

Determinación de actividad de inhibidor de proteasas in vitro *60*

Estudio de la estabilidad estructural de U-Omp19 mediante espectros de dicroismo circular . *61*

Determinación del mecanismo inhibidor y la constante de inhibición (Ki) *61*

Cultivo de macrófagos y células dendríticas derivadas de medula ósea *62*

Obtención de microsomas derivados de CPAs *63*

Ensayo de actividad proteolitica con microsomas derivados de CPAs *63*

Determinación de la capacidad lítica de APCs in vitro *63*

Ensayo de la actividad de catepsina L en APCs *64*

Western blot para la detección de catepsina L y C en extractos de APCs *64*

Ensayo de determinacion del pH intracelular *65*

Ensayo de internalización in vitro *65*

Microscopia confocal *66*

Determinación de la expresión de complejos OVA péptido-MHCI por parte de DCs *66*

Ensayo de degradación e internalización in vivo *66*

III.ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES INMUNOESTIMULATORIAS DE U-OMP19 ..... *67*

Ensayo de reclutamiento de celular *67*

Ensayo de activación de DCs *68*

Análisis de la expresión de las moléculas co-estimulatorias por las DCs *68*

Análisis del nivel de citoquinas pro-inflamatorias secretadas por la DC *68*

Ensayo de presentación cruzada de las quimeras GFP-OT por DCs *68*

IV.ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DE U-OMP19 EN FORMULACIONES VACUNALES IN VIVO. *69*

Desafío tumoral con células de melanoma murino MO5 ..... *69*

Ensayo de protección frente al desafío con parásitos de Trypanosoma cruzi *70*

Análisis estadístico *70*

RESULTADOS **72**

EXPRESION Y PURFICACION DE U-OMP19 ..... *72*

I.ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DE U-OMP19 SOBRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR *74*

U-Omp19 como adyuvante de OVA induce una respuesta inmune celular T $CD8^+$ antígeno específica *in vivo* 74

U-Omp19 induce la proliferación *in vivo* de células T $CD8^+$ 75

U-Omp19 induce la presentación cruzada de Ags exógenos 77

II. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE U-OMP19 COMO INHIBIDOR DE PROTEASAS LISOSOMALES *81*

U-Omp19 es un inhibidor de cistein proteasas lisosomales 81

U-Omp19 mantiene su estructura secundaria a distintos valores de pH 85

U-Omp19 es un inhibidor competitivo de catepsina L 86

U-Omp19 reduce parcialmente la capacidad proteolítica de microsomas derivados de CPAs 90

U-Omp19 limita la actividad lítica de APCs *in vitro* 92

U-Omp19 inhibe la actividad intracelular de catepsina L *in vitro* 94

U-Omp19 no afecta la expresión de catepsinas por la CPA 95

U-Omp19 no afecta el pH de los compartimentos endosomales de la CPA 98
La co-administración de U-Omp19 induce un aumento en la cantidad de Ag intracelular en la CPA 100
U-Omp19 retiene el Ag en compartimentos endosomales LAMP-2 positivos luego de su internalización por CPAs 105
U-Omp19 aumenta la expresión de complejos OVA péptido-MHCI en la superficie de las DCs 109
La co-administración de U-Omp19 por vía s.c. inhibe la degradación del Ag *in vivo* y aumenta la cantidad de Ag en las CPAs de los ganglios linfáticos drenantes 111

III. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INMUNOESTIMULATORIA DE U-OMP19 115
La co-administración de U-Omp19 aumenta el tráfico de células inmunes a los ganglios linfáticos drenantes 115
U-Omp19 promueve la activación de células dendríticas 118
U-Omp19 actúa sobre la DC induciendo la activación de células T $CD4^+$ y T $CD8^+$ 121
Modelo de acción de U-Omp19 sobre DCs 124

III. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DE U-OMP19 EN FORMULACIONES VACUNALES 125
La administración s.c. de U-Omp19 como adyuvante en una formulación vacunal aumenta la supervivencia de los animales luego del desafío con células tumorales. 125
La administración s.c de U-Omp19 como adyuvante de una formulación vacunal induce protección frente al desafío con *Trypanosoma cruzi* 126

CONCLUSIONES GENERALES Y DISCUSION 129

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo
ADN: Acido desoxirribonucleico
Ag: Antígeno
ANOVA: Análisis de la varianza
ARN: acido desoxiribonucleico
CFA: Adyuvante de Freund Completo
CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CPA: Célula presentadora de antígeno
CTL: linfocito T citotóxico
DC: Célula dendritica
DTH: Respuesta de hipersensibilidad retardada
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ELISA:"Enzyme-linked immunosorbent assay"
GMCSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HBV: virus de la hepatitis B
HPV: virus del papiloma humano
HRP: peroxidasa de rabanito
IFN-γ : Interferón gamma
Ig: inmunoglobulina
IL-: Interleuquina
IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
KDa: Kilo Dalton
LPS: lipopolisacárido
MCSF: factor estimulante de colonias de monocitos
MHC: molecula del complejo mayor de histocompatibilidad
Ni-NTA: niquel- ácido nitrilotriacético
NLRP: receptor tipo NOD
Omp: Proteína de membrana externa
OVA: ovoalbúmina
PAMP: Patron molecular asociado a pátogenos
PBS: Buffer fosfato salino
PK: proteinasa K
RE: reticulo endoplasmatico
RRP: receptor de reconocimiento de patrones
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SEM: error estándar de la media
SF: Solución fisiológica
TAP: proteina transportadora de antígeno
TCR: receptor del linfocito T
Th: T helper
TLR: receptor de tipo "Toll"

INTRODUCCION

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y VACUNAS

Actualmente, la vacunación continúa siendo la herramienta más efectiva en la prevención de las enfermedades infecciosas, el objetivo primordial de ésta es la generación de una respuesta inmune eficiente contra el antígeno (Ag) administrado capaz de conferir protección a largo plazo frente a la infección. Es importante resaltar que la mayoría de las vacunas actuales solo previenen la enfermedad pero no protegen frente a la infección. El concepto de protección de una vacuna es un concepto básicamente estadístico y debe ser entendido en términos poblaciones, en cuanto la inmunización reduce la propagación de un agente infeccioso al reducir la cantidad y/o duración de la replicación del patógeno impidiendo que se establezcan los síntomas y efectos patológicos en el individuo vacunado [1].

La historia de la vacunación experimental propiamente dicha comenzó hacia fines del siglo XVIII cuando Edward Jenner en 1796 demostró la efectividad de la inoculación en los humanos del virus de la viruela vacuna para prevenir la viruela humana. Unos años después, alrededor del año 1800 se instauraron los conceptos de atenuación, virulencia y pasajes. En 1885 Louis Pasteur desarrolló la primera vacuna para humanos contra la rabia y poco tiempo después comenzaron a desarrollarse las vacunas a microorganismos muertos o inactivados [2].

Por más de un siglo el desarrollo de las vacunas siguió los principios de Pasteur: “aislar, inactivar e inyectar” los microorganismos causantes de la enfermedad. De esta manera se han producido vacunas virales y bacterianas consistentes en patógenos completos muertos, patógenos atenuados vivos o componentes purificados de dichos patógenos. La mayoría de las

vacunas desarrolladas fueron atenuadas por pasajes sucesivos en cultivos o inactivadas por medio de tratamientos físicos o químicos [2, 3].

A pesar de que la erradicación mundial del patógeno es el objetivo ideal de la vacunación hasta el presente solo la viruela ha sido erradicada [4], la eliminación local o el control de la diseminación de los patógenos son los resultados más frecuentes de los programas de vacunación. Junto con ellos, la vacunación ha permitido la reducción de la mortalidad, la morbilidad y las discapacidades provocadas por las enfermedades infecciosas [5].

Las contribuciones claves de la vacunación en la salud mundial hasta el momento incluyen: la erradicación de la viruela a nivel global, la casi completa eliminación de la poliomielitis y la reducción de más del 95⁄ en la incidencia de enfermedades como la difteria, el tétanos, la tos convulsa, paperas, sarampión y rubeola. Más recientemente, las vacunas contra hepatitis A, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo b y neumococos han contribuido a reducir las muertes causadas por estos agentes infecciosos [6]. A pesar de estos avances, aún son necesarias vacunas efectivas para la prevención de varias enfermedades importantes como la producida por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), la leishmaniasis, la malaria y la tuberculosis [7, 8].

RESPUESTA INMUNE Y VACUNAS

Un factor clave en el diseño racional de nuevas vacunas es el conocimiento del tipo de respuesta inmune protectora requerida para controlar y eliminar la infección por un determinado patógeno. Esto depende principalmente de las características del microorganismo, es decir, de la manera en que infecta al hospedador, su localización durante la infección, si produce o no toxinas, etc. [9]. El desarrollo de vacunas eficaces se ha visto limitado por la falta de conocimiento y caracterización acerca del repertorio de mecanismos capaces de conferir protección contra un determinado microorganismo. Es por esto importante dilucidar el mecanismo de acción y el tipo de respuesta inmune inducida por las vacunas, así como también tener en cuenta las estrategias de escape y evasión del patógeno. A pesar de ello, no existen estrategias y herramientas universalmente aceptadas para el diseño de vacunas y su descubrimiento continúa siendo un proceso básicamente empírico [10].

Rol de las células dendríticas en la inmunidad adaptativa contra las infecciones

El tipo de respuesta obtenida luego de una inmunización depende, en última instancia, del procesamiento que sufra el Ag y de la activación diferencial que se produzca sobre las células del sistema inmune. Es ampliamente conocido el papel fundamental que desempeñan las células dendríticas (DCs) en la detección de patógenos o vacunas y en la integración de esta información para regular la cantidad, calidad y duración de la respuesta inmune adaptativa [11, 12]. Las DCs inmaduras residen en la periferia donde sirven de centinelas para Ags foráneos (por ejemplo las vacunas) y patógenos microbianos. Los Ags son constantemente capturados

por las DCs vía pinocitosis y/o fagocitosis. Los agentes microbianos y/o muchas vacunas poseen motivos conservados denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y/o señales de daño (DAMPs) los cuales son detectados por los receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) en la DC. La activación de los RRPs resulta fundamental para la activación de la DC y el inicio de la respuesta inmune (Señal 0) **(Ilustración 1)**.

Las DCs residentes localizadas en los tejidos no linfoides procesan y presentan los Ags endocitados en las moléculas de histocompatibilidad de tipo I (MHCI) o tipo II (MHCII). Posteriormente a la estimulación de los RRPs, se pone en marcha una cadena de señalización intracelular en la DC que termina en la liberación de mediadores solubles, como citoquinas y quimiocinas inflamatorias como parte de la respuesta innata inmediata (Señal 1) **(Ilustración 1)**. Así también, este encuentro de la DC residente con el PAMP o el Ag vacunal da inicio a un proceso de maduración que induce su migración hacia los ganglios linfáticos [13]. Dado que las células T y B se encuentran en los órganos linfoides secundarios, es necesario que el Ag alcance estos órganos para ser presentado a las células T. Durante la activación y migración de la DC esta aumenta la expresión en membrana de moléculas co-estimulatorias (CD80, CD86 y CD40) y de moléculas MHCII que le permiten interaccionar con las células T $CD4^+$ y T $CD8^+$ vírgenes induciendo su activación (Señal 2) **(Ilustración 1)**. La estimulación de la célula presentadora de Ag profesional (CPA) es fundamental para una apropiada inducción de respuestas celulares que involucran a las células T y B. La ausencia de la señal 2 de estimulación en la CPA puedo llevar a la tolerancia inmunológica o la anergia [14] **(Ilustración 1)**.

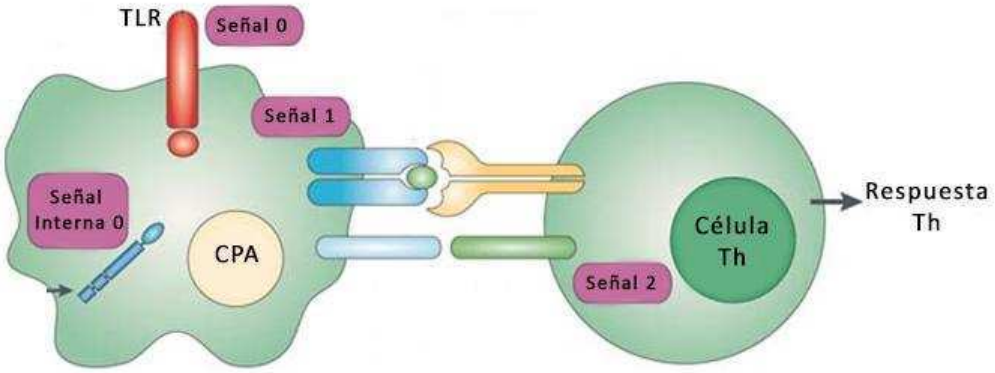

Ilustración 1. Señales importantes para la activación de las células T por las DCs. La iniciación de la respuesta de tipo T helper requiere de 3 señales. La señal 0 implica el reconocimiento del patógeno por los RRP de las DCs. En segundo lugar, el procesamiento y presentación de los Ags provenientes del patógeno a las células T (Señal 1) acompañado por la expresión de moléculas co-estimulatorias y secreción de citoquinas (Señal 2). Adaptado de Guy,B *et al*. 2007.

Es importante destacar que las DCs son las únicas CPAs capaces de activar a las células T vírgenes e iniciar su activación. Luego de su activación las células T tienen el potencial para diferenciarse en diferentes tipos de células efectoras, el destino que tomen dependerá del tipo de Ag o patógeno fagocitado y de la activación diferencial de la DC.

Inicialmente, la dicotomía T helper (Th)1/Th2 definía dos perfiles de células Th basadas en la secreción de IFN-γ (Th1) e IL-4 (Th2) [15, 16]. Las células Th1, a partir de la secreción de IFN-γ, inducen la activación de los macrófagos. La respuesta de tipo Th1 también favorece respuestas inmunes celulares del tipo T $CD8^+$ y CTLs y la generación de anticuerpos (Acs) de tipo IgG2a e IgG3. La respuesta de tipo Th2 se caracteriza por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-6 y la inducción de anticuerpos IgG de isotipo IgG1, IgE e IgA en ratones. Este tipo de células T promueven la producción, reclutamiento y activación de eosinófilos, la producción de anticuerpos IgE y la activación de mastocitos.

Sin embargo, datos experimentales mostraron que este modelo, basado en 2 tipos de células Th era insuficiente para explicar los múltiples aspectos de la iniciación, regulación y coordinación de las respuestas inmunes. En los últimos 10 años, se han caracterizado nuevos perfiles de células Th que han sido designados como: Th17, Th9 y Th22 de acuerdo a la secreción de citoquinas (Th-17: IL-17, IL-21 e IL-22, Th9: IL-9 y Th22: IL-22, TNF-α e IL-13). Las células Th17 inducen el reclutamiento y activación de neutrófilos [11]. Las células Th22 se encuentran en la piel y parecen participar en la inmunidad antibacteriana y antifúngica mientras que las células Th9 podrían participar de la inmunidad frente a los parásitos helmintos y también en el desarrollo del asma [17]. Por otro lado, células Thf (Th foliculares) se especializan en promover la diferenciación de LB en plasmocitos productores de anticuerpos.

Adicionalmente, se ha descubierto un tipo de células llamadas células T supresoras: las células T regulatorias (Tregs). Estas células regulan el balance entre la tolerancia y las respuestas inmunes mediante la acción de citoquinas como TGF-β y/o IL-10 y moléculas de membrana como CTLA4 y GITR. Dentro de este tipo de células T se han descripto varias poblaciones incluyendo $CD4^+$ $CD25^+Foxp3^+$ TRegs, Tr1 y Th3 [18].

Presentación de antígenos por CPAs

El reconocimiento de los complejos MHC-péptido por el receptor de la célula T (TCR) es un evento crucial en la activación de las células T. Diferentes mecanismos son utilizados por las moléculas MHCI o MHCII para la unión y presentación de péptidos antigénicos a las células T $CD8^+$ y $CD4^+$ respectivamente.

La vía endógena o biosintética de presentación antigénica

La vía de presentación endógena o biosintética es la vía usual para la presentación de péptidos derivados de las proteínas presentes en el citosol, ya sean proteínas propias o provenientes de patógenos que replican en el citosol. Estos péptidos son presentados por las moléculas MHCI a los LT $CD8^+$. La degradación de proteínas en el citosol es llevada a cabo por el proteasoma, los péptidos que se generan son luego translocados al retículo endoplasmático (RE) mediante la acción de proteínas transportadoras (TAP). Una vez en el RE los péptidos se ensamblan con moléculas MHCI y estos complejos viajan hacia la superficie celular a través del aparato de Golgi.

La presentación mediante moléculas MHCI es activa en todos los tipos celulares, constituyendo un mecanismo para monitorear la expresión de proteínas intracelulares. De esta forma, las células T $CD8^+$ vigilan el proteoma celular y poseen la habilidad de destruir aquellas células que expresen proteínas virales o tumorales.

La vía exógena o endocítica de presentación antigénica

La vía de presentación exógena o endocítica es la vía usual de presentación de péptidos derivados de proteínas presentes en el compartimento endosómico. Los péptidos presentados por las moléculas MHCII derivan de patógenos o macromoléculas extracelulares que son internalizadas en los compartimentos endosómicos mediante fagocitosis, macropinocitosis, endocitosis mediada por receptor y otros mecanismos [19] .Estos péptidos son presentados por las moléculas MHCII a los LT $CD4^+$. La degradación de proteínas en los endosomas es mediada

por diversas enzimas, entre las que se destacan las catepsinas. La molécula MHCI se sintetiza en el citosol y luego se transloca al RE, desde donde es transportada al compartimento endosómico, lugar donde se lleva a cabo la unión entre los péptidos y la molécula MHCII [20]. La vía de presentación mediante moléculas MHCII es solo constitutivamente activa en las CPAs, (DCs, LB, macrófagos) y también en las células epiteliales tímicas.

Intersección de las vías de presentación antigénica: presentación cruzada de antígenos

La presentación cruzada de Ags implica: i) la presentación de Ags presentes en el citosol a través de moléculas MHCII y ii) la presentación de Ags presentes en los endosomas a través de moléculas MHCI. Estos mecanismos explican la inducción de respuestas T $CD4^+$ contra Ags citosólicos y de respuestas T $CD8^+$ contra Ags extracelulares [21, 22].

El ingreso de Ags citosólicos en los compartimentos endosómicos puede darse por fagocitosis de células apoptóticas por la CPA profesional o por autofagia, de esta forma Ags presentes en el citosol pueden entrar en la vía de presentación exógena.

Por otro lado, la presentación de Ags extracelulares mediante moléculas MHCI implica que el material internalizado por la DC y que se encuentra dentro de los endosomas accede, de alguna forma, a la maquinaria de procesamiento y presentación de la vía MHCI que se encuentra normalmente en el RE. Se han descripto dos mecanismos principales mediante los cuales ocurriría la presentación cruzada de Ag exógenos: la vía “citosólica” y la vía “vacuolar” [23] **(Figura 2)**.

- **La vía citosólica**

La vía citosólica de presentación cruzada de Ags exógenos propone que las proteínas antigénicas presentes en los compartimentos endosómicos escapan al citosol, donde son degradadas por el proteasoma. Los péptidos generados de esta degradación, son luego recortados por aminopeptidasas presenten en el citosol o el RE [24, 25] obteniendo el tamaño final adecuado para su unión a las moléculas MHCI. Finalmente los péptidos generados son transportados al RE mediante los transportadores asociados al procesamiento de Ag (TAP1 y TAP2) para su unión a las moléculas MHCI [26] **(Ilustración 2)**. Algunos trabajos han propuesto que la carga de los péptidos también podría ocurrir en los compartimentos endocíticos, ya que se ha descripto que existe reclutamiento del complejo TAP y MHCI en endosomas y fagosomas [27, 28]. Según la evidencia actual esta vía sería predominante para presentar Ags exógenos vía moléculas MHCI [23, 29].

- **La vía vacuolar**

En la vía vacuolar de presentación cruzada de Ags la carga del Ag exógeno en las MHCI ocurre en los compartimentos endocíticos sin pasar en ningún momento por el citosol. Esto sugiere que el procesamiento de los Ags hasta alcanzar el tamaño adecuado para su unión en las moléculas MHCI es llevado a cabo por las proteasas lisosomales. La presentación cruzada mediante la vía vacuolar es resistente a la acción de los inhibidores de proteasoma e independiente de TAP [30] **(Ilustración 2)**.

La presentación cruzada de Ags extracelulares cumple un papel muy relevante para iniciar respuestas de tipo T $CD8^+$ citotóxicas contra Ags endocitados que no son capaces de

acceder a los moléculas MHCI en las DCs, este es el caso de virus que no infectan directamente a las DCs o tumores de origen no hematopoyético [31, 32].

A pesar que se ha descripto que varios tipos celulares son capaces de realizar presentación cruzada de Ags en ciertas condiciones, las DCs son las principales células que lo efectúan *in vivo* [33]. Entre todas las poblaciones de DCs, las $CD8\alpha^+$ en el ratón y su equivalente $BDCA3^+$ en humanos, las DCs derivadas de monocitos y las $CD103^+$ migratorias son las únicas capaces de realizar presentación cruzada de Ags *in vitro* e *in vivo* [34-37].

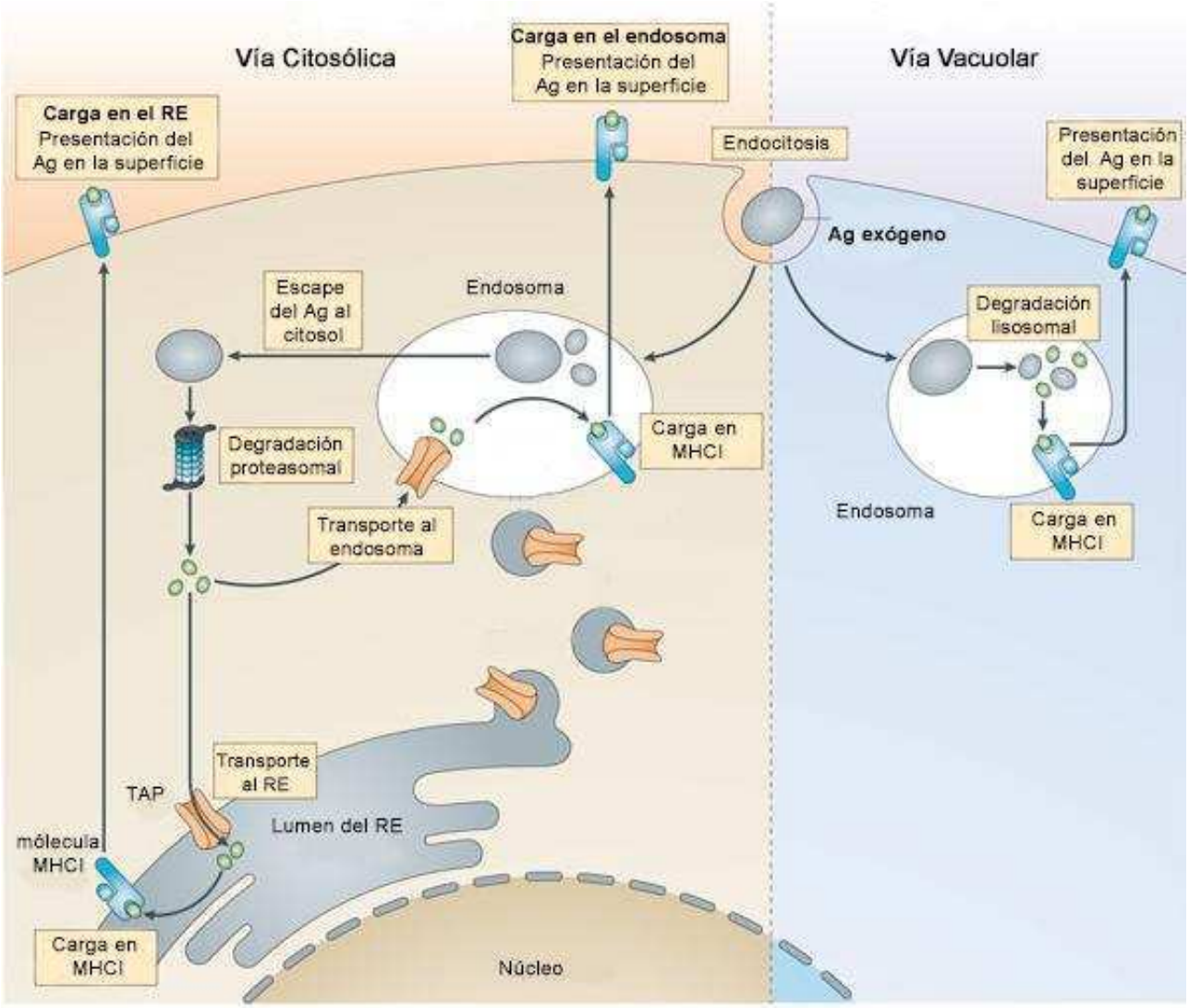

Ilustración 2. Las vías más importantes de presentación cruzada de Ags en las DCs. Luego de la endocitosis, los Ags que van a ser presentados vía moléculas MHCI pueden seguir distintas vías. **Vía Citosólica**: los Ags internalizados en los compartimentos endosómicos escapan al citosol donde son procesados por el proteasoma. Los péptidos resultantes pueden ser cargados en las moléculas MHCI en el RE (carga en el RE) o transportados nuevamente al endosoma donde se carga en las moléculas MHCI (carga en el endosoma). **Vía Vacuolar:** alternativamente, los Ags exógenos pueden ser degradados en el endosoma donde son directamente cargados en las moléculas MHCI. Adaptado de Olivier P. Joffre *et al*. 2012.

TIPOS DE VACUNAS

La mayoría de las vacunas que han sido exitosas se han desarrollado a partir de **microorganismos inactivados (muertos) o vivos atenuados**, ya que estos son capaces de inducir duraderas respuestas inmunes. Las vacunas consistentes en cepas vivas atenuadas de un patógeno al ser inoculadas en un individuo suelen seguir el curso de la infección natural del patógeno del que provienen. De esta manera, la permanencia del microorganismo en el individuo vacunado permite que la exposición al mismo sea más duradera, estimulando continuamente el sistema inmune pero no produciendo la enfermedad. En el caso de inyecciones de microorganismos muertos o preparaciones antigénicas inactivadas se requieren múltiples inoculaciones y el empleo de adyuvantes para lograr un efecto similar. Tanto las vacunas a cepas atenuadas como aquellas que se basan en microorganismos inactivados presentan todos o casi todos los antígenos presentes en el patógeno. Estas vacunas son capaces de inducir fuertes respuestas adaptativas humorales y celulares [38].

La vacuna contra la tuberculosis Bacillus Calmette-Guérin (BCG) así como la vacuna contra el virus de la poliomielitis (Sabin) y las vacunas contra el sarampión, la rubéola o parotiditis se componen de microorganismos vivos atenuados. Estas vacunas se administran en muchos países del mundo, incluida la Argentina. La vacuna contra *Bordetella pertussis* causante de la tos convulsa, la vacuna antigripal y la vacuna contra la hepatitis A son otros ejemplos de vacunas incluidas en el calendario de vacunación de nuestro país que se componen de microorganismos inactivados **(Tabla 1)**.

Sin embargo, la utilización de cepas atenuadas presenta desventajas relacionadas con su baja seguridad, por ejemplo en individuos inmunocomprometidos la posibilidad de reversión

espontánea a cepas virulentas y la liberación del microorganismo al ambiente [2]. Se han reportado casos de parálisis asociados con reversiones de la vacuna Sabin oral contra el virus de la poliomelitis (OPV es una cepa atenuada) (aproximadamente 1 caso en 2,5 millones de vacunados) [39]. Sin embargo, se continúa utilizando en países con alta incidencia de la enfermedad debido a que induce una efectiva respuesta inmune protectora en mucosa gastrointestinal.

Tipo de Vacuna	Vacunas presentes en el calendario nacional de vacunación (Argentina)
Viva atenuada	***Bacteriana***
	BCG (tuberculosis)
	Viral
	Sabin (OPV, poliomielitis) Sarampión, Rubeola y parotiditis (Triple Viral) Fiebre amarilla Fiebre hemorrágica
Inactivada	***Bacteriana***
	Bordetella pertussis (tos convulsa)
	Viral
	Antigripal Hepatitis A Salk (poliomielitis)
Toxoides	Difteria (DT) Tétanos (DT)
Polisacárida conjugada	*Haemophilus influenzae B* Antineumocócica
Recombinantes	Hepatitis B (HBV) Virus del papiloma Humano (HPV)

Tabla 1. Tipos de vacunas presentes en el calendario Nacional de vacunación de la República Argentina. Adaptado del manual de Recomendaciones Nacionales de Vacunación Argentina. 2012. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación.

Vacunas a subunidad

Los problemas de seguridad asociados con las vacunas basadas en microorganismos inactivados o vivos atenuados ha incentivado el desarrollo de nuevas vacunas más eficaces y seguras. Estas nuevas vacunas están basadas en componentes parcialmente purificados de los patógenos (vacunas a subunidad), entre las cuales encontramos vacunas compuestas por: toxinas detoxificadas, polisacáridos, proteínas purificadas/recombinantes y vacunas a ADN o ARN [40, 41]. En el desarrollo de vacunas a subunidad lo más importante y complejo es la elección del mejor Ag que sea capaz de montar una adecuada y eficiente respuesta inmune protectora contra el patógeno.

La vacunas compuestas por toxoides se desarrollaron a partir del conocimiento de que muchas bacterias como *Clostridium tetani* y *Corynebacterium diphtheria* producen toxinas involucradas en la patogénesis en el huésped. Es sabido que la neutralización de estas toxinas mediante anticuerpos previene la enfermedad. Las vacunas contra este tipo de bacterias se basan en versiones detoxificadas de estas toxinas (**toxoides**). Las vacunas contra la difteria y el tétanos son ejemplos de toxoides utilizados como vacunas, los cuales generalmente se administran en forma combinada [42] **(Tabla 1)**.

De la misma forma, anticuerpos dirigidos contra los polisacáridos de las cápsulas de algunas bacterias (por ej., *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae y Streptococcus pneumoniae*) son capaces de producir inmunidad antibacteriana. Las vacunas contra estos organismos se desarrollan a partir de polisacáridos extraídos de cultivos bacterianos. Estas vacunas son efectivas en adultos pero muy poco inmunogénicas en niños menores a 2 años de edad a causa del estado inmaduro del sistema inmune y el tipo de respuesta independiente de

células T que inducen estos polisacáridos. Esta deficiencia se ha resuelto mediante el uso de proteínas transportadoras (carriers TT por ej.) las cuales al inducir respuestas de tipo Th permiten generar memoria inmunológica contra el polisacárido. Por ejemplo, el desarrollo de una **vacuna conjugada** contra *Haemophilus influenzae* B ha sido producida siguiendo este concepto [43] **(Tabla 1)**.

Las **vacunas recombinantes** son aquellas que utilizan la tecnología del DNA recombinante en alguna etapa de su producción. De esta forma, la ingeniería genética hace posible la expresión de genes de diferentes patógenos en organismos de fácil crecimiento. Los sistemas de expresión más utilizados son las bacterias (*E. coli*), levaduras o baculovirus y en los últimos años se han obtenido algunos Ags recombinantes en plantas [43]. Las proteínas obtenidas, se purifican y pueden ser administradas por diferentes vías. Tienen la ventaja de tener una composición bien definida, se puede estandarizar su proceso de producción y principalmente se elimina todo riesgo de reversión o efectos secundarios al ser incapaces de multiplicarse en el individuo inmunizado [56, 58].

Actualmente, es limitado el número de vacunas recombinantes aprobadas para su uso en humanos. La vacuna recombinante contra el virus de la heptitis B (HBV) está disponible desde 1981 y consta de Ags de la superficie de los virus producidos en levaduras y adsorbidos en sales de aluminio. Recientemente, se ha incluido al calendario nacional de vacunación la vacuna contra el virus del papiloma humano (HPV), la cual combina la expresión de proteínas del virus en partículas tipo virus (VLPs) **(Tabla 1)**.

Aunque las vacunas a subunidad poseen muchas cualidades ventajosas, su habilidad para estimular potentes respuestas inmunes es menor comparada con las formulaciones

tradicionales compuestas por patógenos enteros [44], esto se debe al limitado número de componentes capaces de estimular el sistema inmune que contienen, así como a su incapacidad de replicar *in vivo* [45]. Dada la baja inmunogenicidad de los Ags puros se hace necesario que incorporen compuestos inmunoestimulantes (adyuvantes) los cuales pueden influenciar el tipo y la potencia de la respuesta inmune inducida (Th1, Th2 y/o CTLs) así como también permiten disminuir las dosis administradas para producir una respuesta protectora duradera y con ello reducir el costo de las vacunas [38, 46].

DISEÑO RACIONAL DE VACUNAS

¿Cuál es la formulación óptima?

Los tres factores mas importantes a tener en cuenta en el diseño de vacunas son: i) los Ags capaces de participar en una respuesta protectora frente a la enfermedad, ii) los sistemas y las vías de administración óptimos para inducir la respuesta deseada y iii) los potenciadores inmunes (adyuvantes) adecuados para generar una respuesta eficaz **(Ilustración 3**).

Ilustración 3. Principales factores involucrados en el diseño racional de vacunas.

I.Antígenos

La selección del Ag y la optimización en esta selección representa la piedra angular del diseño de vacunas. Durante mucho tiempo y hasta el día de hoy se seleccionan Ags en base a sus niveles de expresión, su capacidad de actuar como factores de virulencia y/o si se encuentran conservados en el microorganismo. Finalmente y más allá de las especulaciones los Ags deben testearse empíricamente.

Con el advenimiento de la genómica, se ha desarrollado un nuevo proceso para la identificación de Ags: la vacunología reversa, término acuñado por el Dr. Rappuoli para describir la búsqueda de Ags de interés vacunal a partir del genoma microbiano [47, 48]. Esta tecnología se desarrolló a partir de la necesidad de identificar Ags vacunales para el meningococo serogrupo B, los cuales fueron incorporados en una nueva vacuna que está en fase clínica [49]. Específicamente, el potencial codificante del genoma del patógeno es explotado mediante una selección in silico, high throughput screening y tecnología de perfiles (por ejemplo genómica y proteómica) para definir Ags candidatos. Incluso, esta técnica permite el desarrollo de péptidos sintéticos, los cuales pueden ser producidos a bajo costo e incorporados a las vacunas a subunidad [50, 51]. Este nuevo enfoque permite identificar rápidamente antígenos de proteínas de un organismo de una manera imparcial.

II. Sistemas de administración

La vía de administración, las dosis y la estrategia de “delivery” del Ag se engloban dentro del sistema de administración. Especialmente, se necesitan sistemas de entrega en el caso de

Ags que no son eficientemente transportados a los sitios inductivos y presentados luego de su administración. Por ejemplo, una rápida degradación del Ag puede resultar en una respuesta débil o ausente contra el mismo. Para superar esta deficiencia se han estudiado distintas estrategias que mejoran la llegada del Ag a la CPA, por ejemplo, el uso de vectores virales recombinantes que pueden infectar directamente a las CPAs [52]. El transporte del Ag hacia la DC también puede darse acoplando Ags con anticuerpos específicos contra moléculas de la membrana, lo cual induce la captura y activación de células B y T [53]. Se ha visto que la fusión de Ags de HIV a fragmentos de anticuerpos específicos contra la molécula DEC205 en la DC induce potentes respuestas inmunes en primates [54].

Idealmente una vacuna debe ser segura, potente, estable a distintas temperaturas y generar inmunidad protectora y duradera en los individuos inmunizados [55]. Así también, la producción, purificación y caracterización debe ser eficiente, requiriendo un mínimo número de etapas, ser barata y permitir su uso en distintos grupos etáreos y con diferentes trasfondos genéticos (diferentes haplotipos). El desarrollo de nuevas vacunas que cumplan estos requisitos se ha visto impedida por la falta de adyuvantes y sistemas de administración seguros y eficientes, así como también por un limitado conocimiento de las respuestas inmunes necesarias contra ciertos patógenos que sean capaces de generar inmunidad protectora.

III. Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias que, incorporadas al Ag o administradas simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune contra el mismo. Los

adyuvantes inmunológicos fueron descriptos originalmente en la década de 1920 por el biólogo G. Ramon [56], quien demostró que la respuesta a las toxinas del tétanos y la difteria se veía incrementada con la inyección de estas vacunas en combinación con otros compuestos como el agar, la tapioca o las saponinas. Desde ese entonces y hasta la actualidad numerosas sustancias han sido estudiadas como adyuvantes; el de mayor éxito sin duda ha sido el aluminio, en sales de hidróxido o de fosfato, aprobado para uso en humanos desde 1920 **(Tabla 2)**.

Nombre (año de licencia)	Clase	Componentes	Vacunas (enfermedades)
Adyuvantes aprobados para su uso en vacunas humanas			
Alum* (1924)	Sales minerales	Fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio	Varias
MF59 (Novartis;1997)	Emulsión aceite en agua	Escualeno + polisorbato 80 +trioleato de sorbitan	Fluad (gripe estacional), Focetria (gripe pandémica), Aflunov (gripe pre-pandémica)
ASO3 (GlaxoSmithKline ;2009)	Emulsión aceite en agua	Escualeno + Tween 80+ α–tocoferol	Pandremix (gripe pandémica), Prepandrix (gripe pre-pandémica)
Virosomas(BernaBiotech;2000)	Liposomas	Lípidos+ hemaglutinina	Inflexal (gripe estacional) Epaxal (hepatitis A)
ASO4* (GlaxoSmithKline;2005)	Agonista TLR4 absorbido en Alum	Hidróxido de aluminio+ MPL	Fendrix (hepatitis B), Cervarix (papiloma virus humano)
Adyuvantes testeados en humanos pero no aprobados para su uso al día de hoy			
CpG 7909, CpG 1018	Agonista TLR9	Oligonucleótidos CpG solos o combinados con alum/emulsiones	
Imidazoquinolinas	Agonista TLR7 y TLR8	Moléculas pequeñas	-
PolyI:C	Agonista TLR3	Análogos de RNA doble cadena	
Pam3Cys	Agonista TLR2	Lipopétido	-
Flagelina	Agonista TLR5	Proteína bacteriana conjugada a Ag	
Iscomatrix	Combinación	Saponina + colesterol + dipalmitoilfosfatidilcolina	
ASO1	Combinación	Liposoma + MPL + saponina (QS21)	
ASO2	Combinación	Emulsión agua en aceite + MPL + saponina (QS21)	
AFO3	Emulsión aceite en agua	Escualeno + montano 80 + Eumulgina B1PH	
CAF01	Combinación	Liposoma + DDA + TDB	-
IC31	Combinación	Oligonucleótido + péptidos cationicos	

AFO3, formulación adyuvante 03; CAF01, formulación adyuvante catiónica 01; DDA, dimetildioctadecilamonio; MPL, monofosforil lípido A; Pam3Cys, tripalmitoil-s-gliceril cisteína; Poly:IC, ácido poli-inosínico/policitidílico; TDB, dibehenato de trehalosa; TLR, receptor de tipo Toll.
*Adyuvantes aprobados en los Estados Unidos

Tabla 1. Adyuvantes aprobados o ensayados en formulaciones vacunales para su uso en humanos. Adaptado de Rappuoli R. *et al*. 2011 y Reed SG *et al*. 2013.

Luego de más de 90 años de la introducción del aluminio al día de hoy se han incorporado nuevos adyuvantes en vacunas humanas (principalmente con licencia europea): i) MF59 (una emulsión de aceite en agua) utilizado en la vacuna contra la influenza Fluad®; ii) virosomas (proteoliposoma compuesto por fosfolípidos, hemaglutinina del virus de la influenza y un antígeno blanco determinado) usado en la vacuna contra la hepatitis A Epaxal®; iii) basados en monofosforil lipido A (MPL): un agonista de TLR4 que en combinación con aluminio (AS04) es un componente de la vacuna contra la Hepatis B Fendrix® y de la vacuna del HPV Cervarix® (aprobado en Estados Unidos y en nuestro país); iv) AS03 una emulsión de aceite en agua que ha sido aprobada para la vacuna contra la gripe pandémica (Prepandrix); v) la subunidad B de la TC (TC-B) utilizada en la vacuna oral contra *Vibrio cholera* (Dukoral®) [57, 58]

y vi) liposomas utilizados en la vacuna contra virus de hepatitis A y contra influenza [59] **(Tabla 2)**.

Los adyuvantes pueden utilizarse para mejorar la respuesta inmune hacia un Ag en varios sentidos: pueden mejorar la magnitud de la respuesta inmune contra un Ag débil; pueden usarse para aumentar la velocidad y duración de la respuesta inmune, pueden modular la avidez de los anticuerpos, isotipos o distribución de subclases; pueden estimular y modular la respuesta inmune celular; pueden promover la inducción de respuesta inmune local (ej.: mucosas); disminuir la cantidad de Ag necesaria y reducir el costo de una vacuna; o pueden ayudar a impedir la competencia de Ags que existe en las vacunas combinadas [60]. Los adyuvantes deben seleccionarse para su uso en base a la ruta de administración y el tipo de respuesta inmune necesaria para esa vacuna en particular (Acs, celular y/o de mucosas).

¿Cómo actúan los adyuvantes?

El mecanismo de acción de los adyuvantes varía mucho, dependiendo del tipo de adyuvante utilizado. La mayoría de ellos implican la interacción directa o indirecta del adyuvante con las CPAs, principalmente las DCs ya que estas cumplen un rol fundamental en la generación de la respuesta inmune *in vivo* al ser las únicas células capaces de activar linfocitos T vírgenes [61].

Los mecanismos adyuvantes descriptos hasta el momento incluyen: i) aumentar la vida media biológica o inmunológica del Ag vacunal (por ejemplo, el efecto “depot”), ii) favorecer la infiltración celular, inflamación y tráfico celular hacia el sitio de inyección, particularmente mejorar la entrada del Ag a las células presentadoras de antígenos (CPAs), iii) promover el estado de activación de estas CPAs para una eficiente presentación antigénica o iv) inducir la producción de citoquinas inmunomoduladoras que dirigen la respuesta hacia un perfil Th particular [60].

El mecanismo más conocido es el efecto "depot", propio de las sales de aluminio o de los adyuvantes oleosos como el Adyuvante de Freund Incompleto (IFA), que consiste en retener el Ag en el lugar de inoculación durante el mayor tiempo posible, evitando así su desaparición en la circulación sanguínea, permitiendo que se produzca una reacción inflamatoria local que facilite la llegada a esa área de CPAs que transporten el Ag hacia el ganglio linfático donde se generará la respuesta inmune [62]. Muchos adyuvantes actúan como vehículos promoviendo una liberación gradual del Ag en el sitio de inyección e incrementando la captura del Ag y su exposición por la DC, este es el caso de los adyuvantes particulados como las sales de aluminio, los liposomas, las emulsiones y las micropartículas [63]. Además, este tipo de adyuvantes

tienen la capacidad de unir Ags y formar agregados multimoleculares que facilitan su captura por la CPA mediante fagocitosis [64]. Algunos de estos compuestos poseen también propiedades inmunoestimulatorias que estimulan la maduración de la CPA y contribuyen a la activación de las células T mediante su interacción con las CPA. Agonistas de TLR -el lipopolisácarido (LPS) o el ADN bacteriano (CpGs)- han demostrado tener capacidad adyuvante debido a que son capaces de estimular/madurar a las DCs [65]. Estos compuestos inmunoestimulatorios pueden combinarse para obtener el tipo de respuesta deseada **(Ilustración 4).**

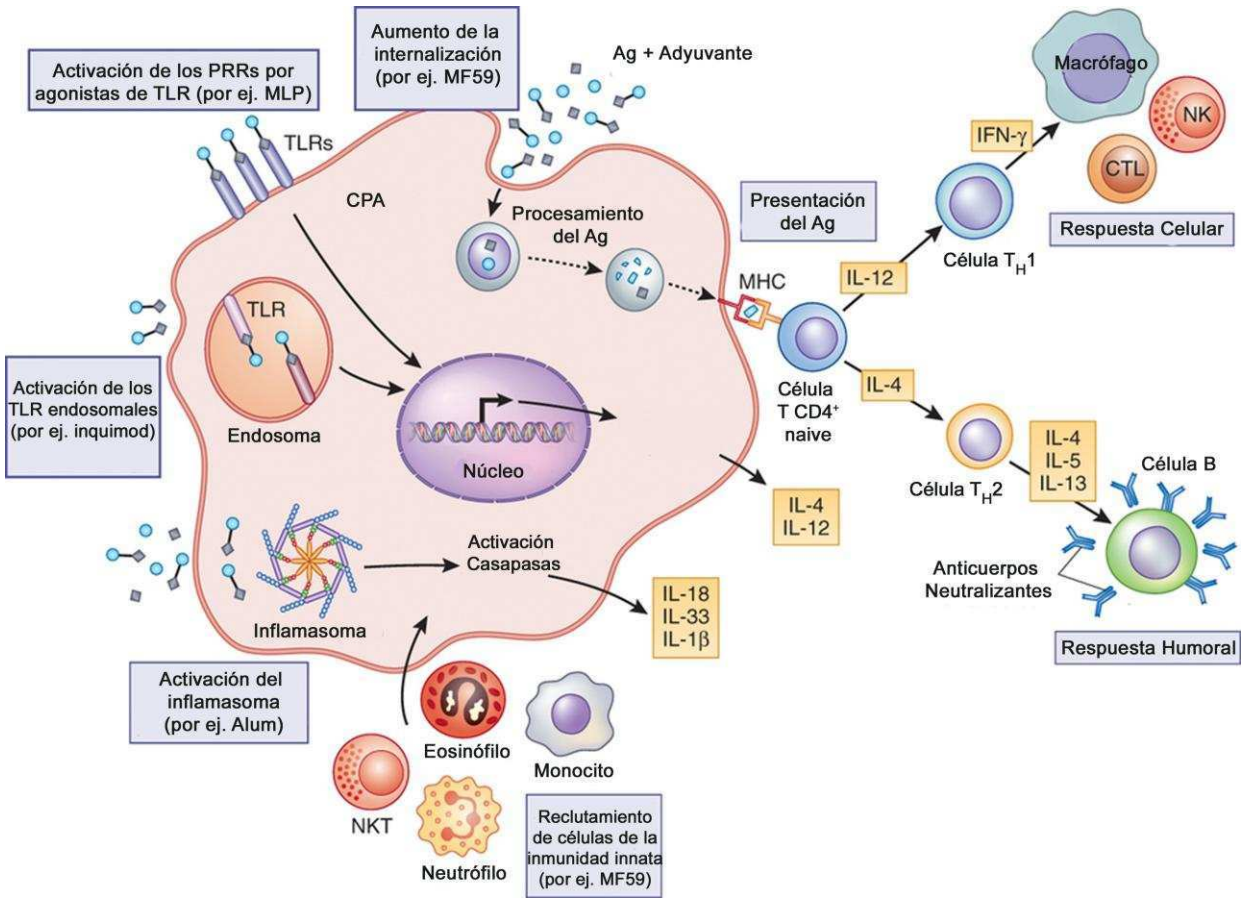

Ilustración 4. Mecanismos de acción de los adyuvantes. Se han postulado varios mecanismos mediante los cuales los adyuvantes pueden ejercer su acción. Muchos adyuvantes actúan como ligandos de RRPs activando la respuesta inmune innata. La señalización mediante RRPs activa factores de transcripción que inducen la expresión de citoquinas y quimiocinas que reclutan células de la inmunidad innata en el sitio de inyección e inducen la activación de DCs dirigiendo el curso de la respuesta inmune adaptativa. La activación del inflamasoma forma parte del mecanismo de acción de las sales de aluminio, lo cual lleva a la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1β e IL-18) y al reclutamiento de monocitos/macrófagos. Ciertos adyuvantes influencian la internalización, procesamiento y presentación del Ags por las moléculas MHC. Es posible que algunos adyuvantes actúen mediante múltiples mecanismos. Adaptado de Reed SG *et al*. 2013.

Clasificación

Los adyuvantes admiten varias clasificaciones de acuerdo a su fuente, mecanismo de acción o propiedades fisicoquímicas, sin embargo la más utilizada los agrupa en: inmunoestimulantes, vehículos o aquellos que comparten ambas propiedades. Los inmunoestimulantes actúan directamente sobre el sistema inmune para incrementar la respuesta hacia el Ag. Ejemplos de estos incluyen: ligandos de TLR, citoquinas, saponinas y exotoxinas bacterianas. Mientras que los vehículos presentan de manera óptima el Ag al sistema inmune y sirven de matriz para los Ags [66], entre ellos encontramos las sales minerales, emulsiones, liposomas, virosomas y microesferas poliméricas biodegradables [67] **(Ilustración 5)**.

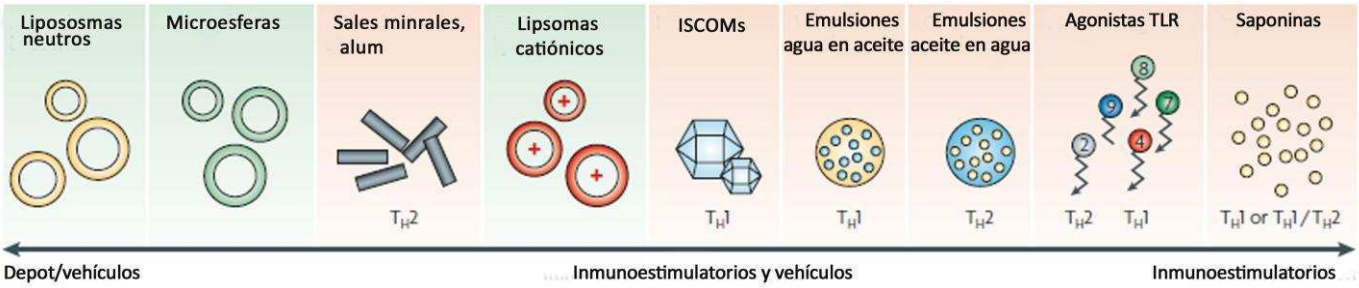

Ilustración 5. Propiedades de los adyuvantes. Los compuestos adyuvantes pueden clasificarse de acuerdo a su modo de acción: depot, vehículos y/o inmunoestimulatorios; y el tipo de respuesta inmune que inducen (Th1 y/o Th2). Adaptado de Guy,B *et al*. 2007.

Vehículos

- **Sales de aluminio**

Las sales de aluminio han sido por casi un siglo el principal adyuvante utilizado en vacunas humanas. Tradicionalmente se creía que la función primaria del aluminio era la formación de un depósito de Ag que permitía su liberación lenta en el sitio de inoculación (efecto "depot") y esto aseguraba una continua captura por las CPAs. Sin embargo, actualmente se ha propuesto que este mecanismo no sería indispensable para su función adyuvante sino que ésta radicaría principalmente en la capacidad del aluminio de estimular la respuesta inmune innata [68-71]. Se ha reportado que el aluminio induce inflamación en el sitio de inyección reclutando y activando DCs, monocitos y macrófagos. Además, aumenta la captación de los Ags por las DCs y la maduración de las mismas [72]. Se ha descripto que el aluminio es capaz de inducir la secreción IL-1β e IL-18 por DCs y monocitos [73]. También se ha propuesto que induce la liberación de ácido úrico, el cual actúa como una señal endógena de peligro que induce el reclutamiento de DCs inflamatorias y la activación de las mismas [72]. La activación del inflamasoma NLRP3 sería crucial para la inducción de respuestas humorales luego del empleo de estos adyuvantes [74], pero hoy en día este mecanismo se ha visto cuestionado ya que se han publicado varios trabajos mostrando resultados que lo refutan [75-78]. Si bien las sales de aluminio son el adyuvante vacunal mas utilizado y seguro hasta el momento, con un record mundial de individuos vacunados difícil de alcanzar presenta un problema significativo en relación al tipo de respuesta inmune que induce, restringida principalmente a una respuesta inmune humoral y celular de tipo Th2 con alta producción de

anticuerpos pero no estimula respuestas celulares de tipo Th1 o citotóxicas necesarias para la erradicación de patógenos intracelulares o tumores [79].

- **Emulsiones**

Existen dos tipos de emulsiones utilizadas en formulaciones vacunales: i) emulsiones agua en aceite y ii) emulsiones aceite en agua **(Ilustración 6)**. Las emulsiones agua en aceite actúan generalmente como vehículos reteniendo el Ag en el sitio de inyección prolongando su vida media y en consecuencia su presentación al sistema inmune (efecto "depot").

El adyuvante de Freund completo (CFA) es una de las **emulsiones agua en aceite** más conocidas, el cual además contiene micobacterias muertas por calor. Ha demostrado ser un adyuvante muy potente, incluso mayor a las sales de aluminio, por tal motivo ha sido ensayado como adyuvante en vacunas a subunidad proteicas [80]. Sin embargo su uso en ratón ha sido asociado con una gran variedad de efectos adversos como pérdida de peso, leucocitosis y peritonitis granulomatosa [81] lo que ha estimulado el desarrollo de versiones modificadas de este adyuvante como el adyuvante de Freund incompleto (IFA, sin

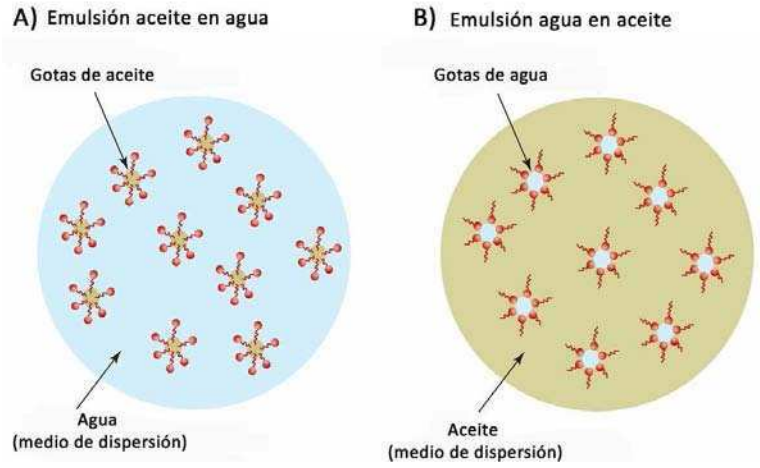

Ilustración 6. Representación esquemática de las emulsiones aceite en agua (a) y agua en aceite (b).

micobacterias), Montanide ISA 51 (contiene mono-oleato de manide), Montanide ISA 720 (contiene escualeno), etc. A pesar de que estos adyuvantes han demostrado incrementar la inmunogenicidad del Ag no cumplen con los requisitos de seguridad en ensayos clínicos observándose, en muchos casos, múltiples efectos secundarios adversos [82, 83].

Las **emulsiones de tipo aceite en agua** se consideran más seguras que las agua en aceite. El MF59 es un representante típico de este tipo de emulsiones compuestas por escualeno, que a diferencia de las emulsiones agua en aceite no posee un efecto "depot" en el sitio de inyección sino que actúa mediante la inducción de quimiocinas a nivel local que permiten el reclutamiento de monocitos que capturan el Ag **(Ilustración 7)**. Además, estimula la diferenciación de los monocitos en DC facilitando su migración a los ganglios linfáticos donde se inicia la respuesta inmune adaptativa [84]. Otra emulsión aceite en agua ensayada como adyuvante es el AS03, el cual consta de α-tocoferol, escualeno y polisorbato 80 [85]. Tanto el AS03 como el MF59 se utilizan en vacunas a subunidad proteica contra el virus de la influenza **(Tabla 2)** [86, 87].

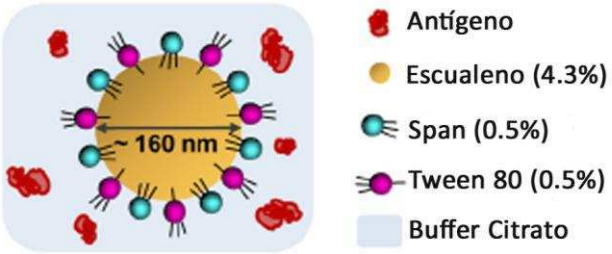

Ilustración 7. Representación esquemática de los componentes del MF59.

- **Polímeros**

Compuestos de nanopartículas y micropartículas poliméricas han sido estudiados como potenciales adyuvantes vacunales [88]. Los polímeros más conocidos y ampliamente utilizados

son: ácido poliláctico (PLA), chitosan, ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA), polipéptidos, poliestireno, polietilen glicol y sus copolímeros. Usualmente, el Ag es absorbido o atrapado en la superficie de las partículas lo que permite su lenta liberación. El PLGA es uno de los polímeros más ampliamente estudiado como vehículo para Ags vacunales.

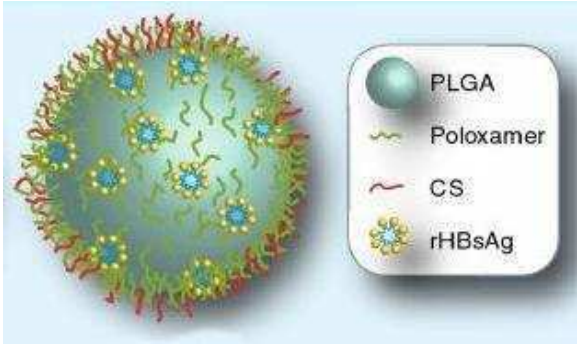

Ilustración 8. Representación de un nanopartícula polimérica. Polímero de PLGA-poloxamer-chitosan conteniendo Ags de superficie recombinantes del virus de la hepatitis B (rHBsAg). Adaptado de Paolicelli *et al*. 2010**.**

Los poliésteres de PLGA permiten una continua liberación de los Ags encapsulados, lo cual promueve una constante estimulación de la CPA. Además, se ha propuesto que el PLGA es capaz de estimular la secreción de IL-1β lo cual conlleva a la activación de caspasa-1 y consecuentemente a la activación del inflamasoma [64]. Las microesferas de PLGA han sido evaluadas en una vacuna oral peptídica contra el HIV, sin embargo los estudios de fase clínica no han sido totalmente satisfactorios [89].

Una de las últimas innovaciones en polímeros es el desarrollo de dendrímeros y polímeros dendríticos. Los dendrímeros están compuestos de unidades repetitivas de polímeros que se enraízan en un núcleo central. Los Ags pueden conjugarse al final de los polímeros ramificados permitiendo la presentación de múltiples epitopes [90]. Se ha desarrollado un polímero dendrítico de t-butil acrilato (PtBA) que ha sido evaluado en la vacuna contra *Streptococcus* grupo A [91]. La disponibilidad de una variedad de estructuras poliméricas seguras y flexibles en cuanto su modificación química lo propone como un sistema atractivo especialmente como vehículo de vacunas peptídicas.

- **Liposomas**

Los liposomas, bicapas lipídicas compuestas de fosfolípidos naturales o sintéticos que rodean un centro acuoso, han sido ampliamente estudiados como vehículos de Ags en formulaciones vacunales. El determinante antigénico puede estar encapsulado en el centro acuoso, integrado a la bicapa lipídica o unido a la superficie externa de los liposomas **(Ilustración 9b)**. De esta forma, el Ag queda eficientemente protegido de la degradación enzimática y puede ser capturado por las CPAs dada la naturaleza particulada de los liposomas [92]. Se ha observado que los complejos liposoma-Ag inducen una respuesta inmune celular mayor a la observada con las sales de aluminio cuando son administrados por vía subcutánea [93]. Del mismo modo, se han observado fuertes repuestas citotóxicas inducidas con formulaciones liposomales conteniendo péptidos del virus de la hepatitis C (HCV) y del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) [94, 95]. Los liposomas catiónicos permiten una fuerte atracción química con la CPA como consecuencia de la abundancia de grupos aniónicos en su membrana. Además de la carga, la composición y el tamaño de los liposomas contribuyen a su acción adyuvante [96]. Los últimos avances en formulaciones liposomales incluyen la incorporación de agonistas de TLR y ligandos manosilados para incrementar o dirigir un determinado tipo de respuesta (CTL, Th1, o Th2) [97, 98]. Los sistemas basados en liposomas mostraron ser muy efectivos como vehículos y su versatilidad y posibilidad de conjugación con diferentes tipos de Ags resulta muy ventajoso en el desarrollo de vacunas.

- **Partículas tipo virus**

Las partículas tipo virus (VLP) están compuestas de proteínas virales recombinantes que se autoensamblan mimetizando la conformación de virus nativos, sin embargo son seguras ya

que carecen del material genético viral **(Ilustración 9a).** Las VLPs tienen el tamaño ideal para ser eficientemente capturadas por las CPAs, incluso son capaces de acceder al citosol y ser procesadas mediante la vía de presentación endógena lo que les permite inducir fuertes respuestas CTLs. La disposición altamente repetitiva y ordenada de los Ags en las VLPs permite la inducción de potentes respuestas inmunes humorales. Los Ags pueden ser incorporados en las VLPs por recombinación genética o acoplamiento químico. Las vacunas comerciales aprobadas para su uso compuestas de VLP incluyen Gardasil® y Cervarix® las cuales proveen protección contra el HPV y Engerix® y Recombivax HB® que protegen contra el HVB [99-101].

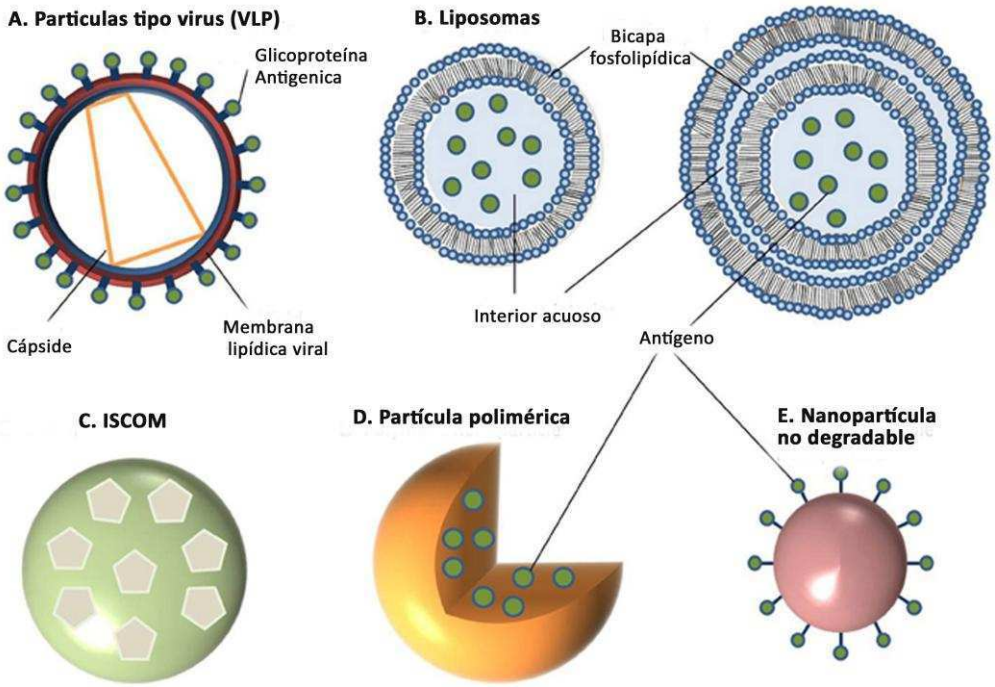

Ilustración 9. Representación esquemática de la estructura de nanopartículas utilizadas como vehículos para Ags vacunales. (A) Partículas tipo virus, (B) Liposomas, (C) ISCOMs, (D) Polímeros y (E) Nanoparticulas no degradables. Adaptado de Gregory AE *et al*. 2013.

- **Virosomas**

Los virosomas se componen de envolturas virales reconstituídas en ausencia de genoma viral. A diferencia de las VLPs, los virosomas consisten en proteínas de la envoltura del virus embebidas en membranas lipídicas liposomales. La integración de los Ags en estas construcciones se puede realizar: i) por fusión directa a la membrana, ii) absorción a la superficie virosomal, iii) por conjugación química a los lípidos o iv) por encapsulación dentro de la vesícula. La mayoría de los virosomas que están siendo estudiados actualmente están basados en la reconstitución de la envoltura del virus influenza (IRIV). Estos virosomas contienen las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) intercaladas en la superficie de la bicapa lipídica. Estas proteínas posibilitan su fusión a las membranas celulares de la CPA y su posterior captura y procesamiento por la vía endógena de presentación lo que permite la inducción de respuestas de tipo T $CD8^+$ y CTL [102]. Su potencial uso como adyuvantes ha sido ensayado en vacunas peptídicas contra varias enfermedades que requieren este tipo de respuestas para su prevención, entre ellas la malaria, hepatitis y melanoma [103].

- **Saponinas**

Las saponinas han sido extensamente utilizadas como adyuvantes en vacunas veterinarias. La más utilizada es Quil A y sus derivados, extraídos de la corteza del árbol Quillaja saponaria [104]. La Quil A se compone de una mezcla de saponinas con sus porciones carbohidratos unidas a un ácido triterpenoide mediante uniones glicosídicas. Fracciones purificadas de QuilA son utilizadas como adyuvantes ya que por su naturaleza oligosacarídica

permite una eficiente captura del complejo mediante endocitosis mediada por receptores de lectina tipo C presentes en la superficie de las CPAs. Sin embargo, uno de sus oligosacáridos se encuentra acilado por dos unidades repetitivas de ácidos lipofílicos alifáticos, lo que contribuye por un lado a su habilidad para inducir respuestas inmunes de tipo CTL y por otro provoca cierta inestabilidad y toxicidad al compuesto [105]. A pesar de que las saponinas deaciladas mostraron ser menos tóxicas y capaces de estimular respuestas de tipo Th2 no inducen respuestas de tipo Th1 y CTL [106].

- **Iscoms**

Los complejos inmunoestimulatorios, más conocidos como ISCOMs, son estructuras lipídicas compuestas de colesterol, fosfolípidos y saponina que contienen los Ags en su interior. **(Ilustración 9c).** Los Iscoms no actúan a través de un RRP determinado, sin embargo son capaces de incrementar la captura del Ag y prolongar su retención por las DCs en los ganglios linfáticos activando la DC y promoviendo fuertes respuestas inmunes [107]. Esta tecnología ha permitido el desarrollo de ISCOMATRIX®, el cual puede ser combinado con una variedad de Ags y se ha reportado que induce respuestas de tipo T $CD8^+$ [108, 109].

Inmunoestimulatorios

- **Ligandos de TLR**

Dentro de los RRP, los receptores de tipo Toll (TLR) son los más estudiados y de mayor interés como potenciales adyuvantes. Los TLR son proteínas transmembrana de tipo I con un

dominio extracelular con motivos repetitivos ricos en leucina intercalados que son los que median el reconocimiento de los PAMPs [110]. La activación de los TLR juega un rol importante en el inicio de respuestas inmune adaptativas [111]. Se ha demostrado que adyuvantes compuestos por ligandos TLR son capaces de inducir fuertes respuestas celulares T y esto condujo a una exhaustiva investigación para su uso como potenciales adyuvantes [14].

Uno de los PAMPs más estudiados es el LPS, el cual se encuentra en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. El LPS está compuesto por un polisacárido hidrofílico y un fosfolípido lipofílico (Lípido A) [112]. El lípido A es el componente inmunoreactivo del LPS, es reconocido por TLR4 induciendo la activación de DCs e iniciando una respuesta inmune adaptativa de tipo Th1 [113]. Sin embargo el uso del lípido A como adyuvante está asociado a una alta toxicidad y efectos adversos pudiendo inclusive causar shock séptico.

El **monofosforil lípido A (MPL®)** es un derivado del LPS de *Salmonella minnesota* y un potente estimulador de respuestas humorales y celulares [3]. En el MPL® se ha modificado la estructura del Lípido A mediante la remoción de grupos fosfatos específicos de los azúcares y variando sus cadenas aciladas lo que reduce considerablemente su toxicidad. El adyuvante AS04, una combinación de un agonista de TLR4 (MPL®) absorbido en sales de aluminio es el primer compuesto que contiene un agonista de TLR que ha sido aprobado para su uso en vacunas humanas (Fendrix® para el HBV y Cervarix® para el HPV) [114, 115]. Estudios recientes sobre el mecanismo de acción del AS04 revelan que permite una activación transiente del factor de transcripción NF-kB y producción de citoquinas promoviendo la estimulación de la CPA [116]. Una nueva generación de compuestos agonistas de TLR4 están actualmente siendo

testeados como adyuvantes entre ellos los aminoalquil glucosamino fosfatos (AGPs), uno de los cuales (RC-529) ha sido aprobado para su en una vacuna contra el HBV (Dynavax) [117].

La flagelina es el componente estructural mayoritario de los flagelos bacterianos. Su actividad inmunoestimulatoria se debe a que es un ligando de TLR5. Varios estudios han demostrado su efectividad como adyuvante ya que es capaz de promover la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF-a, IL-1, IL-6 e IL-8) inducir el reclutamiento de linfocitos B y T a los órganos linfáticos secundarios y activar DCs. Induce respuestas Th1/Th2 contra los Ags conjugados así como también respuestas mediadas por Acs IgG e IgA. Esta propiedad inmunoestimulatoria de la flagelina ha permitido el desarrollo de proteínas de fusión Ag-flagelina que están actualmente siendo testeadas como formulaciones vacunales en modelos animales [118].Sin embargo, se ha descripto que luego de varias inmunizaciones con flagelina se produce una respuesta de Acs neutralizantes anti-flagelina que impiden la acción de dosis posteriores [119]. Además se ha reportado la inducción de Tregs [120].

La identificación de agonistas de TLR naturales ha llevado al diseño de ligandos sintéticos que pueden unir TLRs y activar la señalización intracelular con más precisión y seguridad [121]. Muchos compuestos que demostraron tener propiedades adyuvantes inmunoestimulatorias luego fueron identificados como agonistas TLR, entre ellos oligonucleótidos conteniendo motivos de ADN bacteriano (CpG-ODN) son agonistas de TLR9, poly (I:C) de TLR3, lipopéptidos y Pam3Cys de TLR2 e imidazoquinolinas de TLR7/TLR8 **(Tabla 2)** [122].

- **Proteínas de membrana bacteriana como adyuvantes**

Se ha descripto que las lipoproteínas bacterianas son activadores poderosos de células endoteliales, neutrófilos, monocitos/macrófagos, células B y DCs y aumentan la respuesta humoral a niveles comparables o superiores al CFA [123]. Estos efectos están mediados por el receptor de tipo "toll" 2 (TLR2) [124] y CD14 [125]. Además de las lipoproteínas que activan la inmunidad innata vía TLRs [126] las bacterias Gram negativas expresan proteínas de la membrana externa (Omp) como OmpA y porinas. En contraste con la mayoría de las proteínas solubles que inducen una respuesta inmune débil o tolerancia cuando son administradas en ausencia de adyuvantes [127], OmpA de diferentes especies inducen una respuesta humoral y citotóxica específica. Entre ellas, OmpA de *Klebsiella pneumoniae* (KpOmpA) tiene propiedades como carrier de Ags [128]. Las porinas de bacterias Gram negativas incluyendo *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Neisseria spp.* también inducen inflamación, activación de células B humanas y murinas y liberación de citoquinas de células humanas [129]. Las porinas purificadas de *Neisseria* spp. pueden inducir una respuesta inmune en humanos y animales en ausencia de adyuvantes [129], pueden aumentar la respuesta inmune humoral contra péptidos poco inmunogénicos [129] y han sido utilizadas en preparados vacunales como la vacuna anti-*Haemophilus influenzae tipo b* [130] o la vacuna anti-melanoma [131].

ANTECEDENTES PREVIOS DE NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACION

En nuestro laboratorio trabajamos desde hace tiempo en el desarrollo de vacunas contra *Brucella* spp. Hemos estudiado la utilización de la lipoproteína de membrana externa de 19 kiloDalton (kDa) de *Brucella* (Omp19) como un candidato vacunal contra la brucelosis. Hemos demostrado que la inmunización con Omp19 lipidada (L) o no lipidada (U) purificada y libre de LPS es capaz de inducir una respuesta inmune Th1 y de conferir protección contra *B. abortus* en ratones en similar magnitud cuando es administrada en ausencia o presencia de adyuvantes [132, 133]. Recordemos que *Brucella* spp. es una bacteria intracelular y es sabido que para que una vacuna confiera protección contra este patógeno es fundamental el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa celular Th1 y/o CTL [132, 134]. Incluso, a partir de experimentos de protección ante el desafío con *B. abortus* en ratones knock out para el receptor tipo Toll 4 (TLR4) hemos demostrado que la capacidad de U-Omp19 para inducir una respuesta inmune protectora es independiente de este receptor [133].

De manera que los resultados de protección en ausencia de adyuvantes de la versión de Omp19 sin lipidar nos sugerían que la porción proteica (U-Omp19) por si misma tiene capacidad adyuvante celular y podría ser utilizada como adyuvante para otros Ags.

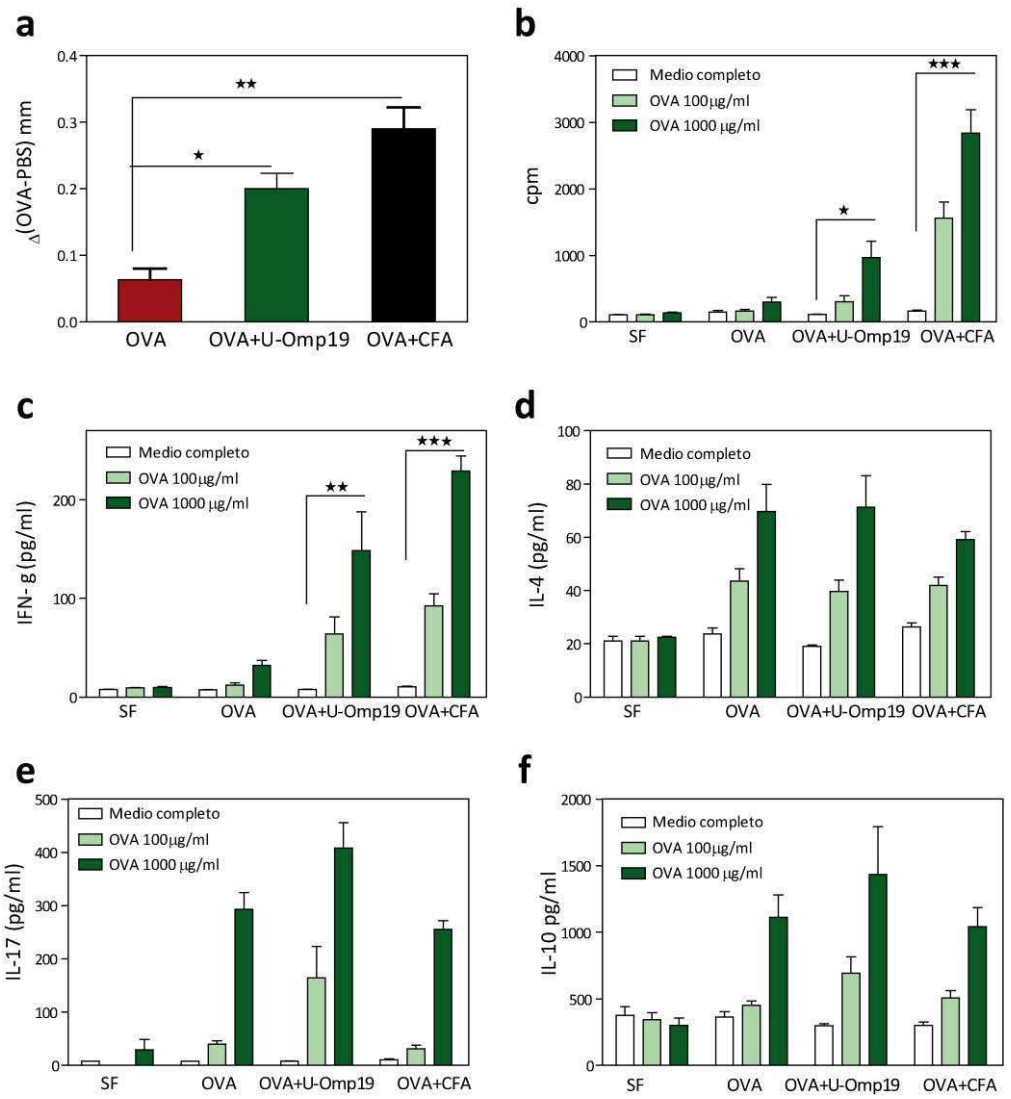

Figura A. La co-administración de U-Omp19 induce una respuesta celular de tipo Th1. Ratones BALB/c fueron inmunizados al día 0, 7 y 14 con: i) SF, ii) OVA (60μg), iii) OVA (60μg)+U-Omp19 (100μg) u iv) OVA (60μg)+CFA (100μl). Tres semanas después se determinó la respuesta celular inducida. **a. Reacción DTH** en respuesta a la inoculación de 20μg OVA en la almohadilla plantar de los animales inmunizados. Las barras representan la media del incremento del pliegue cutáneo plantar entre la pata derecha y la izquierda ± error estándar de la media (SEM) a las 48hs. **b. Proliferación *in vitro*** en respuesta a diferentes dosis de OVA en los esplenocitos de los ratones inmunizados. Los resultados representan la media del índice de estimulación SI (cpm OVA/cpm RPMI) ± SEM de determinaciones hechas por triplicado. **c-f. Producción de IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-17** por los esplencocitos de los ratones inmunizados estimulados *in vitro* durante 72 hs. con distintas concentraciones de OVA o medio completo. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. grupo OVA. ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni. *n*/grupo=5. Los valores representan la media de determinaciones hechas por duplicado para cada ratón ± SEM. Representativo de 2 experimentos con resultados similares.

como adyuvante de otros Ags. Utilizando OVA como Ag modelo evaluamos la respuesta celular inducida luego de la inmunización en ratones BALB/c por vía s.c. con OVA+U-Omp19 en comparación con la inmunización de OVA en solución fisiológica (SF) o con un adyuvante conocido como es el CFA. Observamos que la co-administración del Ag con U-Omp19 induce una respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) *in vivo* anti-OVA y un aumento en la proliferación *in vitro* en los esplenocitos de los animales inmunizados luego de la reestimulación con el Ag **(Figura Aa y b)**. Nuestros resultados demostraron que la inmunización con OVA+U-Omp19 induce respuestas de tipo Th1 específicas con producción de de IFN-γ ($P<0.01$ *vs* OVA) mientras que no se produce un cambio en la producción de IL-4,IL-10 e IL-17- en comparación con la administración de OVA sóla- **(Figura A c-f)**.

Con respecto a la respuesta humoral, se observó que la co-administración del Ag con U-Omp19 no afecta la magnitud de la respuesta humoral ya que no aumenta el titulo de Acs IgG anti-OVA producidos. A pesar de esto, observamos en los animales inmunizados con OVA+U-Omp19 una baja en la relación del título de isotipos IgG1/IgG2a comparado con los ratones inmunizados con OVA sola (**Figura B**, $P<0.05$ *vs* OVA). Esta baja en la relación de isotipos está asociada con una disminución de los anticuerpos IgG1 característicos de una respuesta Th2.

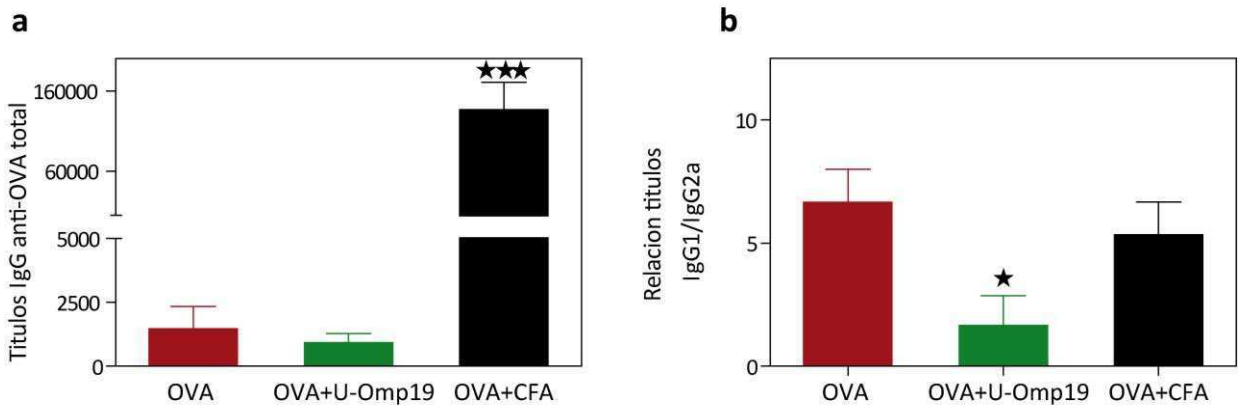

Figura B. La co-administración con U-Omp19 no afecta la magnitud de la respuesta humoral pero si el perfil de los isotipos inducidos. Ratones BALB/c fueron inmunizados al día 0, 7 y 14 con: i) SF, ii) OVA (60μg), iii) OVA (60μg)+U-Omp19 (100μg) u iv) OVA (60μg)+CFA (100μl). Tres semanas después de la última inmunización se determinó la respuesta inmune humoral. **a**. Títulos de Acs IgG total anti-OVA en los sueros de los animales inmunizados determinados por ELISA. **b**. Relación de isotipos IgG1/IgG2a anti-OVA en los sueros de los animales inmunizados * $P<0.05$** $P<0.01$ *vs* OVA. *n*/grupo=5. Los valores representan la media de determinaciones realizadas para cada ratón ± SEM. ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni. Representativo de 2 experimentos con similares resultados.

Por otro lado, análisis de homología de secuencias (BLAST) revelan que la porción proteica de Omp19 de *B. abortus* posee alta homología con inhibidores de proteasas bacterianos (30⁄ identidad, Z-score 112.7), particularmente con el inhibidor de metaloproteasas de *Serratia* I38 [135, 136]. Específicamente, la homología se encuentra en la porción carboxilo terminal de la proteína U-Omp19 (aminoácidos 61 al 157).

Utilizando colecciones de alineamientos múltiples de secuencias (PFAM) y bases de datos de proteasas e inhibidores (MEROPS) hemos descubierto que U-Omp19 pertenece a una familia de proteínas con actividad de inhibidores de proteasas alcalinas y metaloproteasas llamada inh (I38). El inhibidor Inh es secretado en el periplasma donde se presume que su función es

proteger a las proteínas periplásmicas de la acción de proteasas secretadas [135]. Los miembros más conocidos de esta familia incluyen el inhibidor de metaloproteasas de *Erwinia*, el inhibidor de serralisinas de *Serratia* y Aprin (inhibidor de metaloproteasas de *Pseudomonoas aeruginosa*). Un amplio rango de proteasas incluyendo la A, B y C de *E. chrysanthemi,* la proteasa alcalina de *Pseudomonas aeruginosa* y la proteasa de 50 kDa de *Serratia marcescens* son inhibidas por estos inhibidores. Los inhibidores de proteasas pueden encontrarse como dominios completos de una proteína o ser parte de uno o varios dominios dentro de una proteína. En muchos casos son sintetizados como parte de un precursor mayor como un pre-propéptido o con un dominio N-terminal asociado con una peptidasa inactiva o zimógeno.

Efectivamente, otro estudiante de doctorado de nuestro laboratorio ha demostrado que U-Omp19 inhibe parcialmente la actividad de serin y aspartil proteasas presentes en el estómago (pepsina) e intestino (tripsina, α-quimiotripsina y elastasa pancreática) aumentando la vida media del Ag co-administrado por vía oral.

PROTEASAS LISOSOMALES Y PRESENTACION ANTIGENICA

Las proteasas median la hidrólisis de las uniones peptídicas y pueden ser clasificadas según el mecanismo de acción proteolítica en cistein, serin, aspartil o metalo proteasas. Las proteasas lisosomales son en su mayoría catepsinas, esta familia contiene tanto cistein (catepsinas S, L, B, C, H, y otras) como aspartil proteasas (catepsina D y E) [137]. En humanos se conocen 11 catepsinas (B, C (J, DPPI), F, H, K, L, O, S, V, X y W) y todas son miembros de la

familia de la papaína la cual pertenece al clan CA (catepsinas) de las cistein proteasas [138, 139].

Las cistein proteasas controlan varios procesos celulares como la homeostasis, autofagia, apoptosis y presentación antigénica **(Tabla 3)** [140-143]. Dada la relevancia de la acción de estas proteasas su actividad está estrictamente regulada [144]. Las catepsinas son sintetizadas como zimógenos inactivos que requieren de la remoción del propéptido de su N-terminal para activarse. Los zimógenos pueden ser activados por la acción de otras proteasas o de forma autocatalítica, esta última puede ser inducida mediante la caída del pH endosomal o por la presencia de glicosaminoglicanos los cuales facilitan la disociación del propéptido y el resto de la catepsina [138]. Además, diferencias en los niveles de expresión, actividad y proporción de estas proteasas en los diferentes tejidos y tipos celulares contribuyen a la regulación de su actividad. Los mayores reguladores de la actividad de las catepsinas son inhibidores de proteasas endógenos, entre ellos encontramos las cistatinas, estefinas, tirofinas y serpinas los cuales se unen fuertemente a la enzima blanco previniendo la hidrólisis del sustrato [145]. En DCs murinas se ha demostrado que la cistatina C juega un rol importante en la regulación de la catepsina S [146] mientras que en humanos se ha observado que la maduración de las DCs se ve acompañada por una disminución significativa en la expresión y localización de la cistatina C [147].

Catepsinas involucradas en la presentación antigénica			
Catepsina	Ubicación	Patrón de clivaje	Fenotipo Nulo
B	Endosoma temprano	Carboxipeptidasa	Afecta la vía lisosomal de la apoptosis
X(Z)	Endosoma temprano	Carboxipeptidasa	No reportado
S	Endosoma temprano/lisosoma	Endoproteasa	Reducida presentación antigénica mediante MHCI, MHCII y CD1
L(V)	Endosoma tardío/lisosoma	Endoproteasa	Reducción en la selección timica y células CD4 y NKT
D	Lisosoma	Endoproteasa	Deposito lisosomal, muerte temprana
H	Lisosoma	Aminopeptidasa	No reportado
C	Endosoma temprano/lisosoma	Aminopeptidasa	Reducción en la activación de serin proteasas
AEP	Lisosoma	Asparagina	Defectos menores en el procesamiento de catepsinas

a Catepsina X es también conocida como catepsina Z.
b Catepsina V está presente en humanos pero no en ratón.

Tabla 3. Catepsinas involucradas en la presentación antigénica. Adaptado de Chapman HA. 2006.

En el caso de las CPAs, en particular las DCs, la degradación lisosomal es un proceso fuertemente controlado dado que las proteasas son probablemente los mayores seleccionadores del repertorio de péptidos presentados en los complejos MHCI o MHCII en la superficie de la CPA [148]. Un fino balance entre la formación de péptidos con epitopes antigénicos y su completa destrucción determina su capacidad presentadora de Ags [149] **(Tabla 3)**.

Se ha observado que los macrófagos contienen altos niveles de proteasas endosomales y degradan rápidamente los Ags internalizados en comparación con las DCs, que expresan menores niveles de proteasas lisosomales y degradan los Ags lentamente. Esta limitada proteólisis lisosomal en la DC podría favorecer una más eficiente presentación de Ags [150]. Asimismo, la estabilidad de los Ags en las DCs puede ser incrementada inhibiendo la acidificación lisosomal, previniendo la activación de las proteasas y por consiguiente incrementando la presentación cruzada de Ags [151]. Justamente, se ha observado que la

alcalinización endosomal mediada por la NADPH oxidasa NOX2 es importante en la presentación cruzada de Ags particulados en los fagosomas y de Ags solubles en los endosomas [152, 153].

Efectivamente, se ha demostrado que una limitada proteólisis lisosomal incrementa la inmunogenicidad de los Ags *in vivo* [150, 154]. Por ejemplo, ratones inmunizados con diferentes formas del mismo Ag que varían en cuanto a su susceptibilidad a la degradación por proteasas demostraron que los Ags más resistentes resultaban mas inmunogénicos induciendo respuestas inmunes más potentes. Este efecto se ha atribuido a un retraso en la destrucción del Ag que lleva a una mayor disponibilidad de péptidos intactos para ser presentados a las células T [154].

Por otra parte, se ha observado que la eficacia en la presentación cruzada de Ags exógenos por parte de las DCs está relacionada con la capacidad de éstos a escapar de la degradación lisosomal y ser exportados al citosol donde serán procesados por el proteasoma u otras proteasas citosólicas y de esta forma ser presentados vía MHCI a las células T $CD8^+$ [155, 156]. Por lo tanto, esta habilidad de las DCs de impedir la degradación rápida de los antígenos internalizados podría contribuir a su capacidad de procesar y realizar presentación cruzada de antígenos. La limitada capacidad proteolítica de las DCs, aumentaría la retención del Ag favoreciendo su diseminación a través del sistema inmune [157].

Dado que hay descriptos inhibidores de proteasas bacterianos de amplio espectro como el de *Photorhabdus luminescens* que puede inhibir tripsina, elastasa, proteinasa A y catepsinas [158]. Nuestra hipótesis plantea que U-Omp19 podría actuar como inhibidor de cistein proteasas presentes en el lisosoma (catepsinas) reduciendo la susceptibilidad de los Ags a la degradación lisosomal e incrementando la vida media del Ag dentro de la CPA.

OBJETIVO GENERAL

Por lo anteriormente expuesto y en vista de nuestros resultados previos el objetivo general de este trabajo es estudiar la capacidad adyuvante de la proteína U-Omp19 de *Brucella* spp. administrada por vía s.c. sobre la respuesta inmune adaptativa celular e investigar su acción sobre las CPAs.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Evaluar la capacidad adyuvante de U-Omp19 sobre la respuesta inmune celular T $CD8^+$.

Particularmente y siguiendo con el trabajo realizado en mi tesis de licenciatura se profundizará sobre el tipo de respuesta celular que se induce luego de la co-administración de U-Omp19. Se evaluará la capacidad de U-Omp19 de inducir respuestas celulares de tipo T $CD8^+$ y CTLs.

II. Estudiar la acción de U-Omp19 sobre las CPAs.

La interacción directa o indirecta del adyuvante con las células presentadoras de Ag profesionales, principalmente las células dendríticas cumple un rol fundamental en la generación de la respuesta inmune adaptativa [159]. Nuestra hipótesis plantea que la capacidad adyuvante de U-Omp19 podría estar relacionada con i) su función biológica como inhibidor de proteasas lisosomales, ii) por ser una proteína inflamatoria y/o inmunoestimulatoria o iii) es posible que ambas hipótesis sean correctas.

IIa. Evaluar la actividad de U-Omp19 como inhibidor de proteasas lisosomales.

Específicamente, se estudiará la actividad inhibitoria de U-Omp19 sobre proteasas lisosomales comerciales *in vitro*. Se investigará la inhibición de la proteólisis del Ag por parte de U-Omp19 en ensayos de degradación *ex vivo* utilizando CPAs purificadas o derivadas de medula ósea y microsomas derivados de las mismas. Por último se evaluará la capacidad de la proteína de inhibir la degradación de Ags *in vivo* luego de su co-administración s.c.

IIb. Investigar la capacidad inmunoestimulatoria de U-Omp19.

Por otro lado, se determinará *in vivo* la capacidad inflamatoria de U-Omp19 caracterizando los infiltrados celulares que migran a los ganglios drenantes en respuesta a la inmunización por vía s.c. Del mismo modo, se evaluará la capacidad de U-Omp19 de inducir la activación de DCs *in vitro.*

III. Determinar *in vivo* la capacidad adyuvante de U-Omp19 sobre formulaciones vacunales.

Se evaluará la capacidad adyuvante *in vivo* de U-Omp19 para inducir respuestas i) antitumorales utilizando un modelo de melanoma murino y ii) anti-parasitarias utilizando un extracto antigénico de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino de infección por este patógeno.

MATERIALES Y METODOS

Declaraciones éticas

Todos los protocolos experimentales de esta tesis se llevaron a cabo en estricta conformidad con las normas éticas internacionales para animales de experimentación (Declaración de Helsinki y sus modificaciones, Protocolos de bienestar y protección de los animales de Amsterdam (Holanda) y los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de EE.UU, las directrices: Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio). Siempre se trató de minimizar el sufrimiento al que los animales fueron expuestos y se utilizó el número mínimo de animales experimentales para asegurar resultados estadísticamente significativos. Los protocolos de este estudio fueron aprobados por nuestro Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad de Buenos Aires.

Animales

Se emplearon ratones hembras BALB/c (H-2^d) y C57BL/6 (H-2^d) de 8 semanas de edad adquiridos en el Bioterio de la Universidad Nacional de La Plata (La Plata, Argentina). Los ratones transgénicos OTI (animales transgénicos cuyas células T $CD8^+$ expresan el receptor T para un epítope específico de OVA -el péptido OVA_{257} SIINFEKL-) y OTII (animales transgénicos cuyas células T $CD4^+$ expresan el receptor T para un epítope específico de OVA -el péptido $OVA_{323-339}$ ISQAVHAAHAEINEAGR) fueron provistos por el Bioterio de la Fundación Instituto Leloir en colaboración con el proyecto. Los ratones se mantuvieron en condiciones y cuidados adecuados de acuerdo a las normativas internacionales requeridas para experimentación en animales.

Antígenos y adyuvantes

Como antígeno modelo se utilizó la ovoalbúmina (OVA) de grado V (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Esta fue disuelta en buffer fosfato salino (PBS) estéril o medio de cultivo completo (RPMI 1640 con el agregado de 10 ⁄ de suero fetal bovino (SFB), 2mM de L–glutamina y piruvato, 25 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina y 100 μg/ml de estreptomicina).

Como adyuvante se utilizó a la proteína recombinante no lipidada (U-) Omp19 que fue expresada y purificada como fue descripto previamente [132, 160]. Brevemente, el polipéptido U-Omp19 fue clonado sin la secuencia consenso de lipidación en el vector pET22+ con el agregado de una cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal (Novagen, Madison, WI, USA). Con esta construcción se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) y se indujo la expresión de la proteína con isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) (Gibco/Invitrogen). La proteína recombinante U-Omp19 fue aislada del citoplasma bacteriano mediante sonicación y centrifugación, recuperando el sobrenadante donde se encontraba la proteína soluble. Posteriormente fue purificada mediante cromatografía de afinidad con una resina Ni-NTA (Qiagen, Dorking, UK) utilizando el método de batch. Luego de cada paso de elución la proteína fue neutralizada a pH 7 con NaOH 10N. La expresión y purificación de la proteína se evaluó mediante SDS-PAGE, seguido de una tinción con Coomassie blue. Para confirmar la identidad de U-Omp19 se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo polioclonal específico anti-Omp19 hecho en conejo y se reveló con un anticuerpo anti-IgG acoplado a peroxidasa (Sigma-aldrich). La concentración de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinconinico (BCA, Pierce, Rockford, IL). La contaminación por lipopolisacárido (LPS) fue eliminada mediante la adsorción de las muestras purificadas a una resina de sefarosa-Polimixina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La determinación de trazas de endotoxina se llevó a cabo mediante un ensayo cromogénico de amebocitos de Limulus -LAL- (LONZA, Argentina). Todas las preparaciones de U-Omp19 purificadas utilizadas en esta tesis contenían menos de 0,10 unidades endotóxicas (UE)/mg de proteína.

En varios experimentos realizados en esta tesis añadimos como control la proteína degradada con proteinasa K (U-Omp19PK). Este control nos permite observar el efecto de cualquier contaminante no proteico que pudiera resultar de la purificación. La proteína se incuba con proteinasa K agarosa (0.005 unidades enzimáticas (UE)/100μg de proteína) durante 1 hora a 37ºC y luego se inactiva la enzima remanente incubando 2hs a 60ºC. Se confirmó la degradación de la proteína mediante un gel SDS-PAGE 15⁄ teñido con Coomasie Blue.

Se utilizaron el Adyuvante de Freund completo (CFA) o incompleto (IFA) (Sigma-Aldrich) como adyuvantes controles y se administraron en igual volumen que U-Omp19.

I.ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DE U-OMP19 SOBRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

Inmunizaciones

Ratones C57BL/6 (*n*/grupo=5) fueron inmunizados por vía subcutánea (s.c.) en tres ocasiones cada 7 días con i) 60µg de OVA, ii) 60µg de OVA + 100µg de U-Omp19, iii) 60µg de OVA+ 100µl de CFA o iv) solucion fisiologica (SF). Tres semanas después de la última inmunización los animales fueron sacrificados y se evaluó la respuesta inmune celular desencadenada.

Obtención de suspensiones de bazo

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se practicó una incisión adecuada, abriendo la cavidad peritoneal, para poner en descubierto el bazo, el cual se extrajo con pinzas y tijeras en condiciones asépticas. Se trituró en fragmentos pequeños usando una tijera de punta curva. Se agregaron 3 ml de RPMI 1640 y se homogeneizó. La suspensión se llevó a 8 ml con RPMI 1640 y se filtró mediante filtros de nylon estériles de 70 µm (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) para retener los detritos celulares y restos de tejidos. Luego se realizó un lavado con RPMI 1640 y las células se incubaron con buffer lisis ACK durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación fueron lavadas con medio RPMI 1640 y se realizó el recuento celular mediante la técnica de Azul de Tripán. Finalmente fueron lavadas y se resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo completo (RPMI 1640 con el agregado de 10⁄ de suero fetal bovino (SFB), 2mM de L–glutamina y piruvato, 25 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina).

Obtención de suspensiones celulares de ganglios linfáticos drenantes

Se extrajeron los órganos en condiciones de esterilidad. Se disgregaron mecánicamente con tijeras estériles y luego se incubaron con colagenasa Tipo IV (Gibco) (2,5 mg/ml) suplementada con suero fetal bovino (SFB) (Gibco) 2⁄ y 50 µg/ml DNasa durante 15 minutos. A

continuación se retiró la colagenasa y se trituraron los órganos en fragmentos pequeños usando una tijera de punta curva y se homogeneizaron mecánicamente. Las suspensiones se llevaron a 10 ml con RPMI 1640-SFB 2% y se filtraron mediante filtros de nylon estériles de 70 µm (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) para retener los detritos celulares y restos de tejidos. Las células fueron lavadas dos veces con PBS-SFB 5% estéril.

Recuento de células viables

Para determinar el número de células viables se utilizó el método de exclusión de Azul de Tripán. Se preparó una solución de Azul de Tripán 0,2% en PBS. Se tomaron 10 µl de la suspensión celular a contar y se agregaron 10 µl de Azul de Tripán. Se cargó en una cámara de Neubauer y se determinó el número de células viables utilizando un microscopio óptico.

Determinación de IFN-γ intracelular en linfocitos T $CD8^+$

Tres semanas luego de la última inmunización se obtuvieron suspensiones de esplenocitos ($4x10^6$ células/ml) que fueron estimuladas con: i) medio completo u ii) OVA (500 µg/ml) más células presentadoras de Ag en una relación 25 esplenocitos:1 célula presentadora (células A20J estimuladas previamente con OVA y tratadas con mitomicina C) más péptido $OVA_{257-264}$ (SIINFEKL) (5 µg/ml) por 18 hs. Ambos estímulos fueron suplementados con IL-2 recombinante (10 U/ml) (Peprotech. Inc., Rocky Hill, USA). Durante las ultimas 6hs de cultivo se agregaron 10 µg/ml de brefeldina A (Sigma-Aldrich). Las células estimuladas se lavaron con PBS y se marcó con el anticuerpo monoclonal anti-CD8 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) durante 30 minutos en hielo. Subsecuentemente, las células fueron fijadas con 100 µl de paraformaldehído al 4% y seguidamente permeabilizadas con buffer saponina (0.2%) (Sigma-Aldrich). La marcación intracelular se realizó con anticuerpos anti-IFN-γ PE o su Isotipo (BD Biosciences). Las muestras fueron analizadas mediante citómetría de flujo (FACsAria II, BD Biosciences) y los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Ensayo de proliferación in vivo mediante transferencia adoptiva de células transgénicas

Se obtuvieron suspensiones celulares de bazo y ganglios linfáticos (axilares e inguinales) de ratones OTI o OTII y se llevaron a una concentración de $20x10^6$ células/ml en PBS y se les agregó carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Invitrogen) en una concentración final de 5μM en PBS. Se incubaron las células por 15 a 37°C y se lavaron extensivamente con PBS (3 lavados). Se contaron nuevamente las células por el método de exclusión de Azul de Tripán. Se transfirieron $10x10^6$ células/ratón vía endovenosa en PBS a ratones C57BL/6 salvajes. Al día siguiente los animales fueron inmunizados con i) SF, ii) OVA (30ug), OVA (30μg)+U-Omp19 (60μg), OVA+U-Omp19PK (30μg), u OVA (30ug)+LPS (1μg). Tres días después se obtuvieron células de bazo y ganglios drenantes (GLD) de los ratones inmunizados y se analizó la dilución de CFSE por citometría de flujo (FACsAria II) y se analizaron los resultados obtenidos utilizando el programa FlowJo.

Ensayo de presentación cruzada de OVA por DCs

Se purificaron DCs de bazo y ganglios axilares e inguinales de ratones C57BL/6 mediante selección negativa con un kit comercial (BD IMag, BD Biosciences) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se chequeó la pureza de la purificación marcando las células obtenidas con anticuerpos anti-CD11c y anti-MHCII, se consideraron DCs a la población doble positiva ($CD11c^+$ $MHCII^+$). Se utilizaron suspensiones celulares con un porcentaje mayor al 80% de pureza. Posteriormente, $1x10^6$ DCs se estimularon con: i) medio de cultivo completo, ii) OVA (50 μg/ml), iii) OVA (50 μg/ml), +U-Omp19 (100 μg /ml), u iv) OVA (50 μg/ml), +U-Omp19PK (100μg/ml) durante 18hs. Al dia siguiente se obtuvieron suspensiones celulares de bazo y ganglios linfaticos de ratones OTI. Las DCs fueron lavadas y co-incubadas con células provenientes de ratones OTI ($2x10^6$) durante 12hs. Durante las ultimas 6hs de cultivo se agregaron 10 μg/ml de monensina (BD Biosciences). Posteriormente, las células fueron lavadas y marcadas con anti-CD8, anti-CD62L, anti-CD107a y las células fueron fijadas con 100 μl de paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con buffer saponina (0.2%) (Sigma-Aldrich). La marcación intracelular se realizó con anticuerpos anti-IFN-γ PE o su Isotipo (BD Biosciences). Se determinó la producción intracelular de IFN-γ y la expresión de CD62L y CD107a en la población de LT $CD8^+$ mediante

citometria de flujo (FACsAria II) y se analizaron los resultados obtenidos utilizando el programa FlowJo.

II.ESTUDIO DEL ROL DE U-OMP19 COMO INHIBIDOR DE CISTEIN PROTEASAS

Antígenos utilizados para estudiar la actividad de inhibidor de proteasas

Para determinar la actividad proteolítica se utilizaron como Ags modelo OVADQ y caseína BODIPY FL (Invitrogen, Carsbad, CA). Estos poseen grupos fluorescentes quencheados que luego de ser degradados son expuestos induciendo un incremento en la emisión de fluorescencia **(Ilustración 10)** [161, 162].

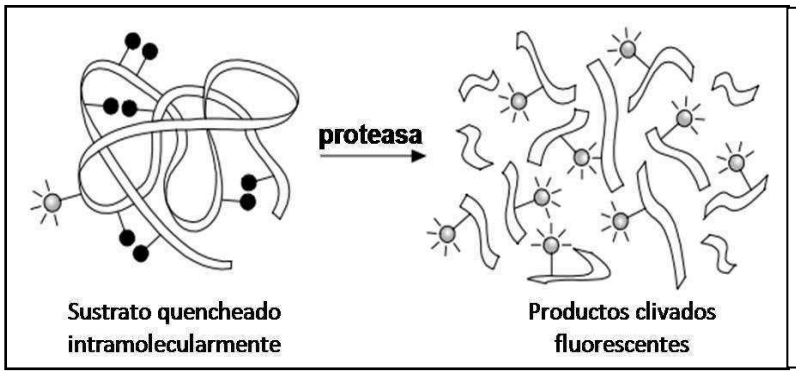

Ilustración 10. Principio de detección de actividad proteolítica utilizando los sustratos caseína BODIPY u OVADQ. En presencia de actividad proteolítica las moléculas son digeridas y exponen sus grupos fluorescentes (que se encontraban atenuados en el interior de la molécula) induciendo un incremento en la fluorescencia.

Determinación de actividad de inhibidor de proteasas in vitro

Para evaluar la actividad de inhibidor de proteasas de U-Omp19 *in vitro*, se incubaron diferentes cantidades (U/ml) de cada enzima ($1x7.10^{-3}$ U/ml de catepsina L, 2U/ml de catepsina B, 2U/ml de catepsina C y 0.5 U/ml de papaína) con U-Omp19 en diferentes relaciones molares (proteasa:inhibidor 1:1, 1:5, 1:10, 1:0). Las reacciones se realizaron al pH óptimo de cada enzima. Como control positivo se utilizó un cocktail de inhibidor de proteasas eucariotas (Sigma-Aldrich). La porción proteica de la lipoproteína de membrana externa de *Brucella abortus* de 16 KDa (U-Omp16) expresada y purificada de la misma forma que U-Omp19 fue utilizada como control negativo. Todas las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por 1h en placas de 96 pocillos (Corning Life Sciences, Acton, MA). Luego a cada mezcla de reacción

se le adicionaron 1μg/ml de sustrato caseína BODIPY. Finalmente, se midió la emisión de fluorescencia en un fluorómetro (Victor3, Perkin Elmer, Waltham, MA).

Estudio de la estabilidad estructural de U-Omp19 mediante espectros de dicroismo circular

Las mediciones se realizaron en un espectropolarímetro (Jasco J-810) utilizando una celda de control de temperatura Peltier. El espectro de dicroismo circular en el ultravioleta (UV) lejano se realizó entre 193 y 240nm a una sensibilidad estándar con una velocidad de barrido de 200nm/min con 2s de tiempo de respuesta, 0.2 nm tono de datos y 2nm de ancho de banda. El espectro es un promedio de nueve escaneos al cual se le sustrajo el espectro del buffer en las mismas condiciones. Los datos crudos fueron convertidos a la elipticidad media de los residuos utilizando la siguiente relación:

$$[\theta]MRW\ (deg.cm2.dmol\text{-}1) = \frac{\theta\ (mdeg)}{10\ .\ L\ (cm)\ .\ [M]\ (M)\ .\ N}$$

Donde θ es la señal cruda en miligrados, L paso óptico en cm, [M] es la concentración molar de la proteína y N es el numero de uniones peptídicas (numero de aminoácidos -1). Para estudiar el efecto del pH en la estructura secundaria de la proteína la solución stock (pH 7.5) de U-Omp19 fue expuesta a un buffer pH 2 o 5 utilizando filtros Amicon Ultra 0.5ml (Biopore, Germany). El espectro fue medido antes y después del cambio de pH de la solución. En cada condición U-Omp19 fue medida a aproximadamente 3μM en el buffer de dicroísmo circular conteniendo 10 mM sodio fosfato y 50 mM NaCl a pH 7.5, 2 o 5 a 20 + 0.1 °C.

Determinación del mecanismo inhibidor y la constante de inhibición (Ki)

El ensayo fue llevado a cabo utilizando como enzima catepsina L obtenida de hígado humana (Sigma-Aldrich) y Ac-HRYR-ACC (Calbiochem, San Diego,CA) como sustrato. El buffer de reacción consiste en 400mM de acetato de sodio, 4mM EDTA, pH 5,5 y se agrega en el momento de la reacción 8mM de dithiothreitol (DTT). La enzima (0.25nM) se pre-incuba en el buffer por 15 min antes del inicio de la reacción para asegurar que la enzima se encuentre

reducida. Luego se incubó la enzima durante 1h a temperatura ambiente con distintas concentraciones de inhibidor (U-Omp19, 6 puntos de diluciones seriadas a partir de una concentración de 10000nM). Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Corning Life Sciences, Acton, MA) contiene: 25ul de la enzima diluida en el buffer de reacción y 50ul de las diluciones seriadas del inhibidor. Luego se agregan 25ul de las diluciones seriadas del sustrato (8 puntos de diluciones seriadas a partir de una concentración de 16000nM). La cinética (0-2030seg Δ70s) de la reacción enzimática es leída en un lector de fluorescencia de placas, la emisión de señal de fluorescencia fue leída a una longitud de onda de emisión de 360nm ±35 y de excitación 450 nm. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico GraphPad Prism (versión 5.0, GraphPad, San Diego, CA). Se graficaron las unidades de fluorescencia (UF) obtenidas en función del tiempo para las distintas concentraciones de sustrato y fueron ajustadas según una regresión no lineal para obtener las pendientes de las curvas en la zona de linealidad de las mismas. La pendiente de la curva del gráfico UF vs tiempo se corresponde con la velocidad de la reacción para esa concentración de sustrato e inhibidor.

Cultivo de macrófagos y células dendríticas derivadas de medula ósea

Se extrajo la medula ósea de tibias y fémures de los animales. Se las coloca en una placa de petri con 10ml de RPMI 1640 y con la ayuda de un bisturí se extrae la piel y el músculo. Luego se cortan los huesos por los extremos y con una jeringa de 1ml conteniendo RPMI 1640 se les extrae la medula ósea en un tubo 15 ml Falcon®. Se resuspenden los agregados con pipeta y se centrifuga 5 min a 1600 rpm. Al pellet se le lisan los rojos con 1 ml ACK durante 5 min, se lava el ACK y se cuentan las células con azul de Tripán. Se plaquearon $1x5.10^6$ células por pocillo en placa de 6 pocillos en un volumen final de 2ml de medio de cultivo completo suplementado con 20ng/ml de GMCSF recombinante murino (Peprotech INC) para la diferenciación de dendríticas derivadas de medula ósea (BMDCs) o MCSF recombinante murino (Peprotech INC) para la diferenciación de monocitos/macrófagos derivadas de medula ósea (BMMOs). Se renueva el medio de cultivo al día 3 y 6 y al día 9 se levantan las células con SF-EDTA 0.2⁄ . Se chequea la diferenciación a BMDCs marcando las células con Ac anti-CD11c y anti-MHCII y de BMMOs marcando las células con un Ac anti-F4/80. En todos los experimentos

realizados en esta tesis doctoral se utilizaron suspensiones celulares con un porcentaje mayor al 90⁄ de pureza.

Obtención de microsomas derivados de CPAs

Los microsomas se obtuvieron por fraccionamiento diferencial mediante centrifugación en gradiente de sucrosa. Específicamente, los pellet de células BMDCs o macrófagos de la línea celular J744 obtenidos por centrifugación a 1000xg se resuspenden en 200µl buffer sucrosa (0.25M, 1mM EDTA, 10mM HEPES, pH 7.4) y se homogenizan mecánicamente con un homogeneizador de vidrio. Se centrifugan los homogenatos a 6000xg para obtener el sobrenadante. El sobrenadante luego se centrifuga a 10000xg y se obtienen los microsomas en el sobrenadante. Se realiza una cuantificación de las proteínas totales por el método del ácido bicinconinico (BCA, Pierce).

Ensayo de actividad proteolitica con microsomas derivados de CPAs

Se evaluó la actividad proteolítica en microsomas de APCs *in vitro*. Se incubaron 50 o 100µg de microsomas solos o con distintas cantidades de U-Omp19 (1, 10, 50 o 100 µg). Como control positivo se utilizó un cocktail inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). U-Omp16 -una proteína de *Brucella* con un peso molecular similar al de U-Omp19- fue utilizada como control negativo. Las reacciones fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente en placas de 96 pocillos (Corning Life Sciences). Luego se agregó el sustrato caseína BODIPY (1µg/ml). Finalmente se determinaron las unidades arbitrarias de fluorescencia (UA) en un fluorómetro (Victor3, Perkin Elmer, Waltham, MA).

Determinación de la capacidad lítica de APCs in vitro

BMDCs y macrófagos de la línea celular J744 ($5x10^5$ células) se incubaron en placas de 48 pocillos con i) medio completo, ii) caseína BODIPY (25 µg/ml) u OVADQ (50 µg /ml) iii) caseína BODIPY u OVADQ + U-Omp19 (50 o 100 µg/ml respectivamente) iv) caseína BODIPY uOVADQ + leupeptina-(inhibidor de cistein proteasas, Sigma-Aldrich- (5 µg/ml) o v) caseína BODIPY u OVADQ + BSA (50 o 100 µg/ml respectivamente) durante 1h a 37°C. Luego las células

fueron lavadas y se determinó la degradación del Ag mediante citometría de flujo (FACsAria II). Los resultados se analizaron utilizando el programa FlowJo.

Ensayo de la actividad de catepsina L en APCs

BMDCs y BMMOs ($5x10^5$ células/ml) se incubaron en placas de 48 pocillos con i) OVA (50μg/ml), ii) OVA (50μg/ml)+ U-Omp19 100μg/ml, u iii) OVA (50μg/ml)+Leupeptina 5μg/ml durante 60 min en estufa a 37°C y 5% CO_2, luego se retiró el Ag, se lavaron las células y se incubaron en presencia de 10μg/ml del sustrato fluorogénico específico de catepsina L $(CBZ-Phe-Arg)_2$ (Invitrogen Life Sciences). A distintos tiempos, las células se lavaron y se dispensaron en placas de 96 pocillos (Corning Life Sciences) y se midió la fluorescencia en un lector de fluorescencia de placas (Victor3, Perkin Elmer, Waltham, MA).

Western blot para la detección de catepsina L y C en extractos de APCs

BMDCs ($1x10^6$ células/ml) fueron incubadas con i) medio completo, ii) OVA (50μg/ml), iii) OVA (50μg/ml)+U-Omp19 (100μg/ml), iv) OVA (50μg/ml)+Leupeptina (5μg/ml) durante 1h a 37°C. Luego se lavaron las células y se les agregó buffer de extracción (TBS 1X, cocktail inhibidor de proteasas Inhibidor 1X, 1% tritón x-100). Se cuantificó la cantidad de proteína en los extractos mediante el método de ácido bicinconinico (Pierce) usando seroálbumina bovina (BSA) como estándar. Luego se realizó electroforesis en los geles de poliacrilamida con SDS para separar las proteínas presentes en los extractos, estas proteínas luego se electrotransfirieron a papel de nitrocelulosa (Bio-Rad, CA, USA) utilizando el sistema Mini Protean (Bio-Rad). La transferencia a nitrocelulosa se realizó a 300 mA durante 40min. El buffer de transferencia utilizado fue Tris 0.025 M, Gly 0.193 M, metanol 20% pH: 8.35. Los estándares de peso molecular (Bio-Rad) se colorearon con Amido Schwartz y se decoloraron con metanol 90%, ácido acético 2%. Se bloqueó la membrana con PBS 0.1% tween-20. Las incubaciones con los Acs monoclonales específicos anti-catepsina L de ratón, anti-catepsina C y anti-β actina murino (Santa Cruz Biotechnology, CA) y el anticuerpo anti-inmunoglobulinas (Ig) G de ratón conjugados a peroxidada (HRP) (Sigma-Aldrich) se realizaron en buffer fosfato salino (PBS) con 0.05% tween 20. Todas las incubaciones se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente

con agitación. Los lavados posteriores a las incubaciones se efectuaron por agitación en solución salina tamponada Tris pH: 7.4, Tween 0.05⁄ . Finalmente, las membranas se lavaron y se revelaron utilizando el reactivo quimioluminiscente ECL (GE Healthcare). Se realizó un análisis densitométrico de las bandas observadas utilizando el programa (National Institute of Health, EEUU). Se evaluaron los niveles de expresión normalizando las bandas con respecto a las bandas del control (β-actina).

Ensayo de determinacion del pH intracelular

Se utilizó una sonda sensible al pH conjugada con partículas de dextran 10000 MW para permitir la endocitosis de la sonda (pHrodo Dextran, Invitrogen Life technologies). BMDCs ($1x10^6$ células/ml) fueron incubadas con i) buffer Ph 7.4, ii) OVA 50μg/ml +pHrodo Dextran 10 μg/ml, iii) OVA 50μg/ml +pHrodo Dextran 10 μg/ml +U-Omp19 100 μg/ml, iv) OVA 50μg/ml +pHrodo Dextran 10 μg/ml +Leupeptina 5 μg/ml, v) OVA 50μg/ml +pHrodo Dextran 10 μg/ml +BSA 100 μ /ml o vi) buffer pH 5 durante 1h. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en el buffer especificado por el fabricante (Live cell imaging solution, 140mM NaCl2, 5mM KCl, 1.8mM CaCl2, 1.0mM MgCl2, 20mM HEPES, pH:7.4, mOsm: 300) excepto la condición con buffer pH 5. Luego las células fueron lavadas, resuspendidas en 200μl de buffer y plaqueadas en placas negras de 96 pocillos. Se analizó la señal de fluorescencia en un lector de fluorescencia de placas (Victor3, Perkin Elmer, Waltham, MA).

Ensayo de internalización in vitro

BMDCs o BMMOs ($1x10^6$ células/ml) fueron incubadas con Ags proteicos: OVA Alexa Fluor 647 (Invitrogen) y la proteína fluorescente verde (GFP) o no proteicos: Dextran Alexa Fluor 647 (Invitrogen) y microesferas Yellow green (Polysciences) (50μg/ml) en presencia de i) medio de cultivo completo, ii) U-Omp19 (100μg/ml), iii) Leupeptina (5μg/ml) o iv) BSA (100μg/ml) durante 30 o 60 min. Luego se lavaron las células y se determinó la presencia del Ag mediante citometría de flujo (FACsAria II). Los resultados se analizaron utilizando el programa FlowJo.

Microscopia confocal

BMDCs ($2x10^5$celulas/pocillo) se plaquearon en un portaobjetos compartimentalizado de 8 pocillos (Nalge Nunc International, Rochester, NY) y se incuban durante 60 min con OVA-AlexaFluor647 (50μg/ml) sola o en presencia de U-Omp19 (100 μg/ml). Luego se lavaron las células con solución fisiológica y se fijan con PFA 2⁄ durante 15 min. A continuación se permeabilizaron con saponina 0.2⁄ durante 30 min y se marcaron con suero policlonal anti-Omp19 obtenido de conejo (dilución 1/2000) o con anti-Rab5 (dilución 1:250) o anti-Lamp-2 (dilución 1:1000) (BD Biosciences). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-IgG de conejo AlexaFluor488 o anti-Ig de ratón AlexaFluor 546 (Invitrogen). Luego se cubrieron los portaobjetos con cubreobjetos, se sellaron utilizando liquido de montaje PolyMount (Polysciences) y se analizaron usando un microscopio confocal FV-1000 con objetivo de inmersión oleosa 60X NA1.42 (Olympus). Para el conteo de células OVA positivas y Rab-5 o Lamp-2 positivas se utilizó el programa Image J (National Institute of Health, EEUU), se analizaron aproximadamente 20 campos por condición y se contabilizaron un total de 500 células. Las fotos que se muestran en resultados ilustran algunas células representativas de las examinadas.

Determinación de la expresión de complejos OVA péptido-MHCI por parte de DCs

BMDCs ($1x10^6$ células/ml) se incubaron con OVA (50μg/ml) o OVA+U-Omp19 (100μg/ml) durante 3 hs a 37°C 5⁄ CO_2. Luego se retira el antígeno y se lavan las células y se las incuba a distintos tiempos (0, 2, 6, 12 y 18hs). La expresión de complejos H-2Kb-OVA (257-264) en la superficie de las DCs se evalúa marcando las células con el anticuerpo especifico 25D1.16 anti- H-2K unido al péptido SIINFEKL (eBioscience, San Diego, CA) Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo (FACsAria II) y los resultados fueron analizados utilizando el programa FlowJo.

Ensayo de degradación e internalización in vivo

Ratones BALB/c (*n*/grupo=3) fueron inoculados por vía subcutánea (s.c.) una vez con OVADQ (25μg) + OVAAlexaFluor647 (25 μg) solas o en presencia de U-Omp19 (100 μg). Se

utilizó como control OVA + Aprotinina (1ug) -inhibidor de serin proteasas comercial, Sigma Aldrich-. La co-administración con ambos Ags permitió evaluar la degradación (OVADQ) y la internalización del Ag (OVA Alexa Fluor 647) simultáneamente. Doce horas post-administración se obtuvieron suspensiones celulares de los bazos y los ganglios axilares e inguinales de los ratones inoculados. Luego las suspensiones celulares de dichos órganos fueron lavadas con RPMI 1640-SFB 2⁄ y se centrifugaron a 1600 rpm para eliminar trazas de Ag extracelular presente en las suspensiones (para determinar la internalización y degradación del Ag intracelular). Se realizó el recuento de células viables mediante Azul de Tripán.

Para evaluar la internalización y degradación del Ag en diferentes subpoblaciones celulares, se marcaron las suspensiones celulares ($4x10^6$ células) con anticuerpos monoclonales específicos de ratón marcados anti-CD11c, anti-CD11b y anti-CD8α (eBioscience, San Diego, CA y BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (FACsAria II) y los resultados utilizando el programa FlowJo.

III.ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES INMUNOESTIMULATORIAS DE U-OMP19

Ensayo de reclutamiento de celular

Ratones BALB/c (*n*/grupo=3) fueron inoculados por vía s.c. una vez con OVA 50µg solo o en presencia de U-Omp19 (100 µg). Se utilizó como control un inhibidor de serin proteasas comercial: Aprotinina (1ug, Sigma-Aldrich). Doce horas post-administración se obtuvieron suspensiones celulares de los bazos y los ganglios axilares e inguinales de los ratones inoculados. Luego las suspensiones celulares de dichos órganos fueron marcadas con Acs anti-CD11c, anti-CD11b y anti-CD8α (eBioscience, San Diego, CA y BD Biosciences) y se analizó la frecuencia de las distintas poblaciones celulares mediante citometria de flujo (FACsAria II) y el programa FlowJo.

Ensayo de activación de DCs

La activación de DCs *in vitro* luego de la co-incubación con U-Omp19 fue evaluada midiendo la expresión en membrana de las moléculas CD40 y CD86 mediante citometría de flujo y el nivel de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF-α e IL-1β) producidas en el sobrenadante de las células estimuladas fue evaluado mediante ELISA.

Análisis de la expresión de las moléculas co-estimulatorias por las DCs

Se incubaron BMDCs ($1x10^6$ células/ml) con: i) medio de cultivo completo, ii) OVA 50 μg/ml, iii) OVA 50 μg/ml + U-Omp19 100 μg/ml, iv) OVA 50 μg/ml + U-Omp19 200 μg/ml, v) OVA 50 μg/ml + U-Omp19 PK 200 μg/ml u vi) OVA 50 μg/ml + LPS 1μg/ml durante 18hs a 37°C 5⁄ CO_2. Luego las células fueron marcadas con Acs anti-CD11c PE y anti MHCII FITC para definir la población de análisis y con Acs anti- CD40 y CD86 APC para evaluar la expresión de las moléculas co-estimulatorias (eBioscience, San Diego, CA y BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Se analizó la intensidad de fluorescencia emitida por el fluorocromo APC en la población de células $CD11c^+$ $MHCII^+$.

Análisis del nivel de citoquinas pro-inflamatorias secretadas por la DC

Se colectaron los sobrenadantes de cultivo de las celulas estimuladas con: i) medio de cultivo completo, ii) OVA 50 μg/ml, iii) OVA 50 μg/ml + U-Omp19 100 μg/ml, iv) OVA 50 μg/ml + U-Omp19 200 μg/ml, v) OVA 50 μg/ml + U-Omp19 PK 200 μg/ml u vi) OVA 50 μg/ml + LPS 1μg/ml durante 18hs a 37°C 5⁄ CO_2. Se determinó la concentración (pg/ml) de IL-6, TNF-α e IL-1β) mediante ELISA de captura siguiendo las instrucciones del fabricante (OptEIATM, PharMingen, San Diego, USA).

Ensayo de presentación cruzada de las quimeras GFP-OT por DCs

Se purificaron DCs de bazo y ganglios axilares e inguinales de ratones C57BL/6 mediante selección negativa con un kit comercial (BD IMag, BD Biosciences) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se chequeó la pureza de la purificación marcando las células obtenidas con

anticuerpos anti-CD11c y anti-MHCII, se utilizaron preparaciones celulares mayores a 80% de pureza. Las quimeras: GFP-OTI (quimera entre la proteína GFP y el péptido SIINFEKL de OVA) y GFP-OTII (quimera entre la proteína GFP y el péptido SQAVHAAHAEINEAGRL de OVA) fueron cedidas por el Dr. Sergio Trombetta [163]. Posteriormente, $1x10^6$/ml DCs se estimularon con: i) medio de cultivo completo, ii) GFP-OTI o GFP-OTII (50 μg /ml), iii) GFP-OTI o GFP-OTII +U-Omp19 (100 μg /ml), o iv) GFP-OTI o GFP-OTII +Leupeptina (5μg/ml) durante 12hs. Durante las ultimas 6hs de incubacion se agregó brefeldina A (10 μg/ml). Al día siguiente se obtuvieron suspensiones celulares de bazo y ganglios linfáticos de ratones OTI e OTII. Las DCs fueron lavadas y co-incubadas con células provenientes de los ratones transgénicos ($2x10^6$), durante 18 hs. Posteriormente, las células fueron lavadas y marcadas con anti-CD8, anti-CD62L, anti-CD107a, las células fueron fijadas con 100 μl de paraformaldehído al 4% y seguidamente permeabilizadas con buffer saponina (0.2%) (Sigma-Aldrich). La marcación intracelular se realizó con anticuerpos (Acs) anti-IFN-γ PE o su isotipo (BD Biosciences). Se determinó la producción intracelular de IFN-γ, la expresión de CD62L y CD107a en la población de LT $CD8^+$ mediante citometria de flujo (FACsAria II) y se analizaron los resultados obtenidos utilizando el programa FlowJo.

IV.ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DE U-OMP19 EN FORMULACIONES VACUNALES IN VIVO.

Desafío tumoral con células de melanoma murino MO5

Ratones C57BL/6 (*n*/grupo =6) se inmunizaron por vía subcutánea con i) OVA 60μg, ii) OVA + U-Omp19 100μg, iii) OVA + U-Omp19PK 100μg, u iv) OVA + CFA 100μl, al día 0, 7 y 14. Tres semanas luego de la última inmunización se desafiaron los ratones por vía s.c. con células de melanoma murino que expresan OVA (MO5). Las células MO5 fueron cedidas por el Dr. K. Rock (Dana-Farber Cancer Institute, Boston,MA).

Las células MO5 fueron crecidas *in vitro* en medio de cultivo con genticina (1mg/ml) y se cosecharon con tripsina 0.25% EDTA (Gibco), luego se resuspendieron en PBS en una concentración de $5x10^5$ células/100μl y se inyectaron subcutáneamente 100 μl en el flanco

izquierdo del ratón utilizando una jeringa 25G (Terumo, Somerset, NJ, EEUU). Cuando los tumores se hicieron palpables, aproximadamente una semana después de la inoculación, se comenzó a medir el largo y el ancho de los mismos con un calibre de Vernier calculando tres veces por semana el volumen tumoral. El volumen tumoral (mm3) se calculó con la siguiente fórmula: (Lx W2)/2, donde L=largo del tumor (mm), W=ancho del tumor (mm). Se monitoreó el tamaño del tumor y la supervivencia de los animales hasta el día 40 o hasta que los animales alcanzaran el punto final (Volumen tumoral >1000 mm^3) momento en el cual fueron sacrificados.

Ensayo de protección frente al desafío con parásitos de Trypanosoma cruzi

Se utilizó un extracto crudo de *T. cruzi* obtenido a partir de formas epimastigote del parásito y preparado como fuera descripto en [164]. Ratones BALB/c (*n*/grupo =7) se inmunizaron por vía subcutánea con i) F105 (50μg), ii) OVA (50μg)+U-Omp19 (100μg) u iii) OVA (50μg)+CFA (100μl), al día 0, 7 y 14. Tres semanas luego de la última inmunización se desafiaron los ratones por vía intradermoplantar con $1x10^3$ parásitos de la cepa RA. Se realizaron mediciones del peso de los animales y el número de parásitos en sangre. Se normalizó la parasitemia a número de parásitos/ml teniendo en cuenta el volumen de sangre extraído por ratón y se realizaron mediciones del hematocrito en las muestras de sangre de los animales. Por último se evaluó la supervivencia de los animales hasta el día 40 post-infección.

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los grupos de estudio con respecto a los grupos control especificados en cada ensayo fueron evaluadas mediante T test cuando se comparaban 2 grupos experimentales mientras que se utilizó ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni cuando se compararon más de 2 grupos experimentales. Cuando los datos de los grupos de estudio no siguieron una distribución normal, se realizó una transformación logarítmica [Y=Log (Y)] para normalizar a los mismos y se evaluó dicha normalización mediante el test Shapiro-Wilks. Finalmente los datos transformados se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido

del test Bonferroni. En el caso del análisis estadístico de las curvas de supervivencia los datos fueron evaluados utilizando una curva de supervivencia de Kaplan-Meier y la prueba estadística log Rank. Se consideró como nivel de significancia respecto al grupo control un valor $P<0.05$. Para la realización de los cálculos se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism (versión 5.0, GraphPad, San Diego, CA.)

RESULTADOS

EXPRESION Y PURFICACION DE U-OMP19

El primer paso para el estudio de la capacidad adyuvante de la proteína de membrana externa de 19KDa de *Brucella spp*. (Omp19) fue obtenerla en cantidad y pureza suficiente. Previamente, nuestro equipo de trabajo clonó la proteína Omp19 sin la secuencia consenso de lipidación (U-Omp19) en un vector plasmídico (pET22) [160]. A partir de esta construcción se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) y se indujo la expresión de la proteína con IPTG, luego la misma fue aislada del citoplasma bacteriano mediante sonicación.

La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad en batch con una resina Ni-NTA-agarosa debido a que la proteína recombinante posee una cola de histidinas (6xHis). La expresión y grado de pureza de U-Omp19 en las distintas fracciones obtenidas se evaluó mediante SDS-PAGE 15⁄ , seguido de una tinción con Coomassie Blue. Además, se realizó un western blot para confirmar la identidad de las fracciones seleccionadas utilizando un suero policlonal de conejo anti-Omp19 (dilución 1:2000) **(Figura 1a)**. Se observan dos bandas correspondientes a dos conformaciones de U-Omp19: monómerica (19KDa) y dímerica (38KDa), este es el patrón típico de bandas que se obtiene cuando a la proteína se le realiza un SDS-PAGE **(Figura 1a)**.

Luego de la purificación la proteína fue depletada de LPS con una resina de sefarosa-Polimixina B y mediante el test de Limulus amebocyte lysate (LAL) se analizó la concentración de endotoxina presente. Todas las preparaciones utilizadas en esta tesis doctoral poseen menos de 0,1 unidades endotóxicas (UE)/mg de proteína. A continuación la pureza de la misma se corroboró mediante un gel SDS-PAGE 15⁄ teñido con Coomassie Blue **(Figura 1b)**.

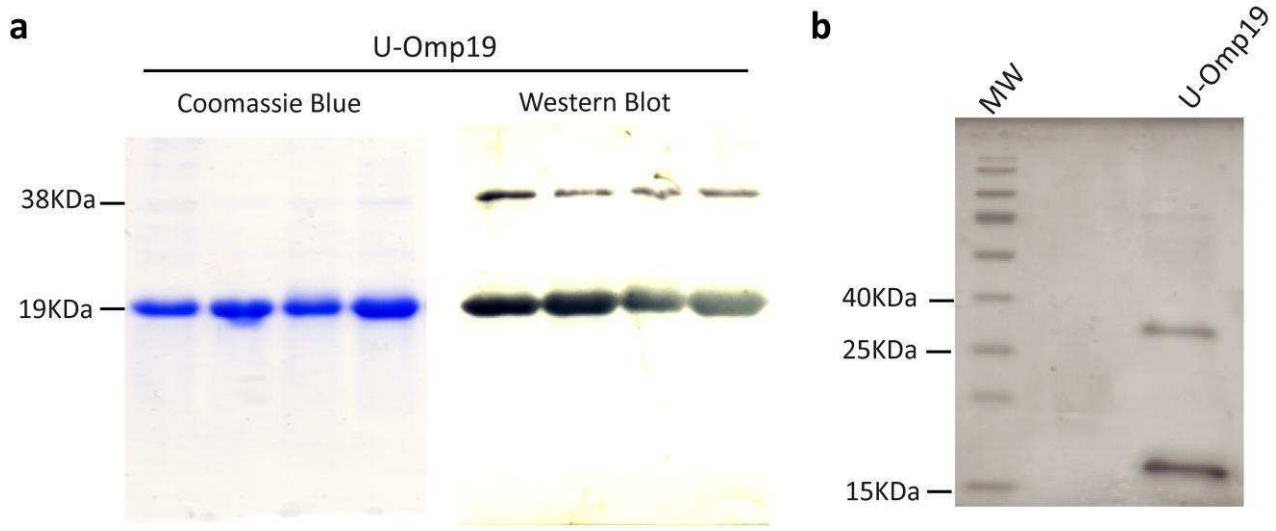

Figura 1. Purificación de la proteína U-Omp19 de *B. abortus* en el extracto citosoluble de *E. coli*. Se purificó la proteína U-Omp19 mediante cromatografía de afinidad obteniéndose distintas fracciones. **a**. Se corroboró la identidad de la proteína a partir de un SDS-PAGE 15⁄ teñido con Coomassie Blue seguido de un Western Blot de las fracciones purificadas de U-Omp19. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-U-Omp19 hecho en conejo y se reveló con un anti-conejo conjugado a peroxidasa de rabano (HRP). **b.** SDS-PAGE 15⁄ de U-Omp19 purificada y depletada de LPS.

En varios experimentos realizados en esta tesis añadimos como control la proteína degradada con proteinasa K (U-Omp19PK). Este control nos permite observar el efecto de cualquier contaminante no proteico que pudiera resultar de la purificación. La proteína se incuba con proteinasa K agarosa, se centrifuga, y luego se inactiva la enzima remanente incubando a 60ºC el sobrenadante. El hecho de que la proteinasa K este inmovilizada en agarosa permite que la enzima no contamine la mezcla de reacción. Se confirmó la degradación de la proteína mediante un gel SDS-PAGE 15⁄ teñido con Coomassie Blue **(Figura 2).**

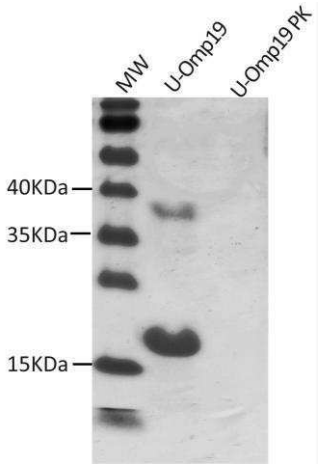

Figura 2. Degradación de U-Omp19 con proteinasa K. SDS-PAGE 15⁄ teñido con Coomassie Blue de U-Omp19 y U-Omp19PK.

I.ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DE U-OMP19 SOBRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

U-Omp19 como adyuvante de OVA induce una respuesta inmune celular T CD8$^+$ antígeno específica *in vivo*

Resultados previos obtenidos durante mi tesis de Licenciatura demostraban que la co-inmunización de U-Omp19 con OVA por vía s.c. induce una respuesta celular T helper anti-OVA *in vivo* con producción de IFN-γ en ratones BALB/c (H2d), lo que nos indicaba que esta proteína posee propiedades adyuvantes sobre la respuesta inmune celular.

Para profundizar en el estudio de la capacidad adyuvante de U-Omp19 sobre la respuesta inmune celular en esta tesis se evaluó la actividad adyuvante de esta proteína utilizando otra cepa de ratones (C57BL/6, H2k) y particularmente se determinó la capacidad de esta proteína de inducir respuestas inmunes que involucran células T CD8$^+$. En la actualidad existe una mayor necesidad en el diseño de vacunas capaces de inducir fuertes respuestas inmunes celulares del tipo Th1, T CD8$^+$ y citotóxicas (CTL) que puedan prevenir infecciones crónicas virales, infecciones relacionadas con patógenos intracelulares o el cáncer [165].

Ratones C57BL/6 fueron inmunizados en tres oportunidades con i) OVA, ii) OVA+U-Omp19, iii) OVA+CFA o iv) solución fisiológica (SF). A las tres semanas se evaluó mediante citometría de flujo la producción intracelular de IFN-γ por los esplenocitos de los ratones inmunizados. Observamos que luego de la co-administración de OVA con U-Omp19 se incrementa la población de células T CD8$^+$ OVA específica productora de IFN-γ (1.40⁄) en comparación a las células provenientes de los animales inmunizados con OVA sin adyuvante (0.64⁄). La co-administración del Ag con un adyuvante conocido como es el CFA incrementó levemente el porcentaje de linfocitos T CD8$^+$ productores de IFN-γ (0.90⁄). Si bien el CFA es reconocido como un potente adyuvante estimulador de respuestas humorales y celulares falla en la inducción de fuertes respuestas de tipo T CD8$^+$. Estos resultados indican que U-Omp19

como adyuvante de OVA es capaz de inducir *in vivo* respuestas de tipo T CD8$^+$ específicas con producción de IFN-γ en respuesta a la estimulación con el antígeno (OVA) **(Figura 3).**

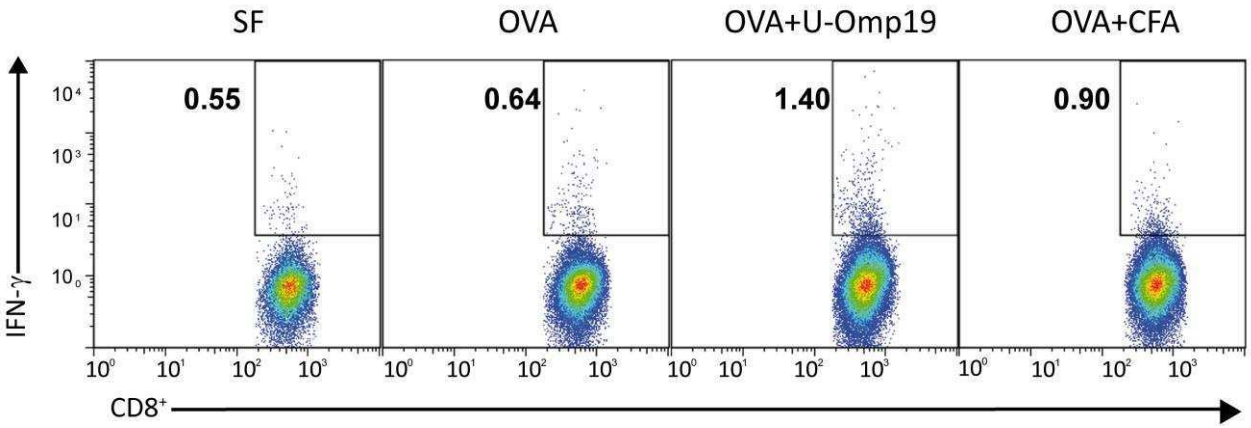

Figura 3. La co-administracíon de U-Omp19 por vía s.c. con OVA como Ag modelo induce la producción de IFN-γ por células T CD8$^+$. Ratones C57BL/6 (*n*/grupo=5) fueron inmunizados por vía s.c al día 0, 7 y 14 con i) SF, ii) OVA (60μg), iii) OVA (60μg)+U-Omp19 (100μg) u iv) OVA (60μg)+CFA (100μl). Tres semanas después se obtuvieron los esplenocitos de los ratones inmunizados los cuales fueron re-estimulados *in vitro* durante 18hs con OVA (500μg/ml) y luego marcados con Acs anti-CD8. Posteriormente las células fueron permeabilizadas y se marcaron con Acs anti-IFN-γ o control de isotipo. Los números expresan la frecuencia de células productoras de IFN-γ de la población CD8$^+$ restado su control de isotipo. Representativo de tres experimentos con resultados similares.

U-Omp19 induce la proliferación *in vivo* de células T CD8$^+$

La activación de las células T luego del reconocimiento del Ag en la CPA conduce, entre otros fenómenos, a la proliferación clonal de la célula T activada aumentando la población de células efectoras específicas para el Ag reconocido. Este evento es crucial para el curso de la respuesta inmune adaptativa celular.

Para poder analizar en detalle la respuesta inmune adaptativa T CD8$^+$ *in vivo* utilizamos una fuente de células T CD8$^+$ con alta especificidad para OVA como son las células T de ratones transgénicos OT-I. Los ratones OT-I poseen células T CD8$^+$ que expresan un único receptor T

específico para el péptido SIINFEKL de OVA que es presentado en el contexto de moléculas co-estimulatorias MHC I (H-2K^b) [166].

Para estudiar la respuesta proliferativa específica que se desencadena luego de la inmunización del Ag con nuestro adyuvante se realizó un ensayo de proliferación *in vivo*. Con este propósito, se realizó transferencia adoptiva por vía endovenosa de células OT-I marcadas con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) a ratones C57BL/6. Al día siguiente se les administró por vía s.c. OVA con: i) U-Omp19, ii) U-Omp19 PK (U-Omp19 tratada con proteinasa K), iv) LPS u v) SF. Tres días después se analizó mediante citometría de flujo el porcentaje de células OT-I proliferantes por dilución de marca de CFSE en las células de bazo y ganglios linfáticos drenantes (GLD).

En los animales inmunizados con OVA+U-Omp19 se observó una mayor proporción de células en división comparado con el grupo OVA sin adyuvante tanto en bazo (OVA 30.27% *vs* OVA+U-Omp19 47.57%) como en GLD (OVA 59.8% *vs* OVA+U-Omp19 88.5%) **(Figura 4).** En células de bazo como de GLD se observa aproximadamente un 20% más de proliferación de células específicas para OVA cuando se co-administra con U-Omp19. El control con el adyuvante degradado con proteinasa K indujo niveles de proliferación comparables a los de la inoculación de OVA sin adyuvante, indicando que el efecto observado se debe a la proteína y no a la posible presencia de contaminantes no proteicos en la preparación de U-Omp19 utilizada. El control positivo con LPS aumentó los niveles de proliferación hasta un 57.5% en bazo y un 92% en GLD. Estos resultados demuestran que U-Omp19 es capaz de incrementar la proliferación de células T CD8$^+$ específicas *in vivo* contra el Ag co-administrado por vía s.c.

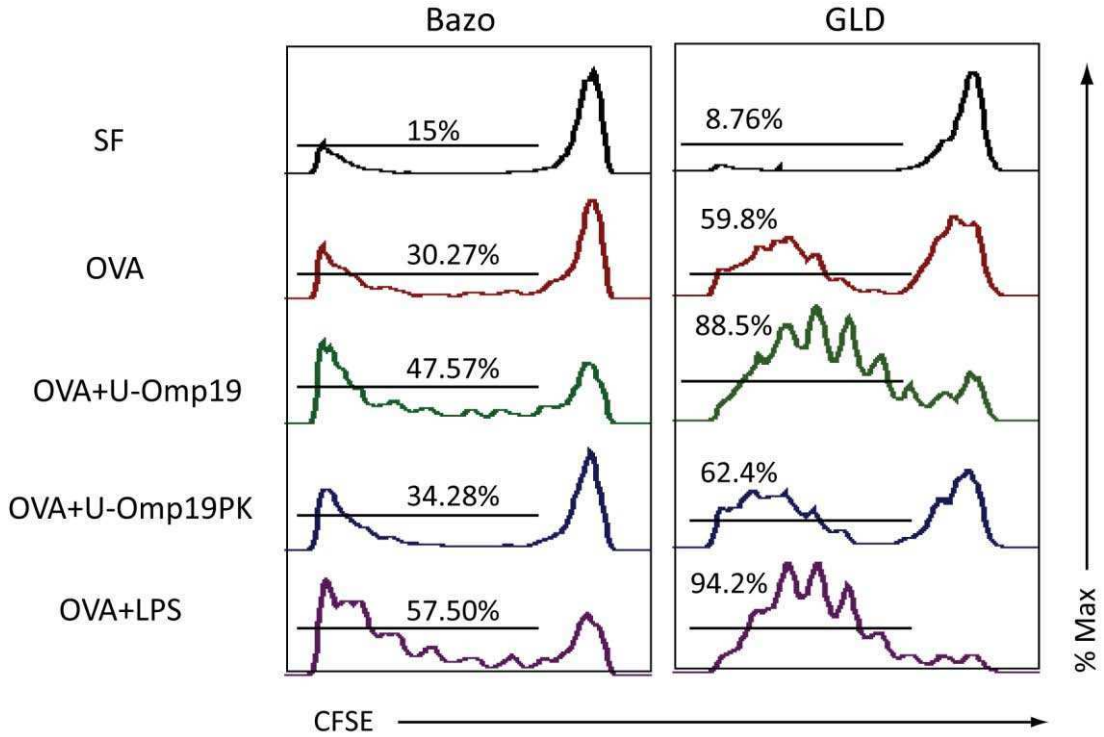

Figura 4. U-Omp19 aumenta la proliferación de células T CD8$^+$ *in vivo*. Se marcaron con CFSE células de bazo y ganglios linfáticos de ratones OTI y se transfirieron a ratones C57BL/6 (*n*/grupo=3) por vía endovenosa (10x10^6 células/ratón). Al día siguiente los animales fueron inmunizados con i) SF, ii) OVA (30μg), iii) OVA (30μg)+U-Omp19 (50μg), iv) OVA (30μg)+U-Omp19PK (50μg), u v) OVA (30μg)+LPS (1μg) por vía s.c. Tres días después se obtuvieron células de bazo y de ganglios linfáticos drenantes (GLD) y se analizó la dilución de CFSE por citometría de flujo. En los histogramas se muestra el porcentaje de células T CD8$^+$ CFSE$^+$ que sufrieron más de una división. Representativo de 3 experimentos con resultados similares.

U-Omp19 induce la presentación cruzada de Ags exógenos

En conjunto, los resultados mostrados anteriormente indican que U-Omp19 induce respuestas de tipo T CD8$^+$ específicas *in vivo* contra el Ag co-administrado. Teniendo en cuenta que a los ratones se les co-administra una proteína soluble como Ag (OVA), la inducción de respuestas de tipo T CD8$^+$ específicas contra OVA nos sugiere que está ocurriendo presentación cruzada de péptidos derivados de esta proteína. La DC es la célula presentadora de Ags profesional más eficiente en realizar presentación cruzada de Ags [167]. Entonces, decidimos

evaluar si U-Omp19 es capaz de actuar directamente sobre las DCs promoviendo la presentación cruzada de Ags a las células T $CD8^+$.

Con este propósito, se purificaron DCs de bazo y ganglios linfáticos de ratones C57BL/6 mediante selección negativa utilizando un kit de perlas magnéticas. Luego, estas células fueron estimuladas con i) OVA, ii) OVA+U-Omp19, iii) OVA+U-Omp19 PK u iv) OVA+LPS. Dieciocho horas después se lavaron las células y se co-cultivaron con células provenientes de ratones OTI durante 18 hs. Se estudió la activación de las células T $CD8^+$ transgénicas mediante marcación intracelular de IFN-γ y expresión del marcador CD62L (L-selectina). Los linfocitos T al activarse dejan de expresar esta selectina, lo que les permite abandonar los ganglios linfáticos para ejercer sus funciones efectoras en los tejidos periféricos [168].

Las DCs estimuladas con OVA+U-Omp19 indujeron un mayor porcentaje de células T $CD8^+$ productoras de IFN-γ (5.67⁄) comparadas con las DCs incubadas con OVA sola (1.20⁄) **(Figura 5a)**. Del mismo modo, las DCs estimuladas con U-Omp19 aumentan la proporción de linfocitos T $CD8^+$ efectores evidenciado por un mayor porcentaje de células T $CD8^+$ que dejan de expresar L-selectina (49.5⁄ OVA *vs* 80.6⁄ U-Omp19) **(Figura 5b)**.

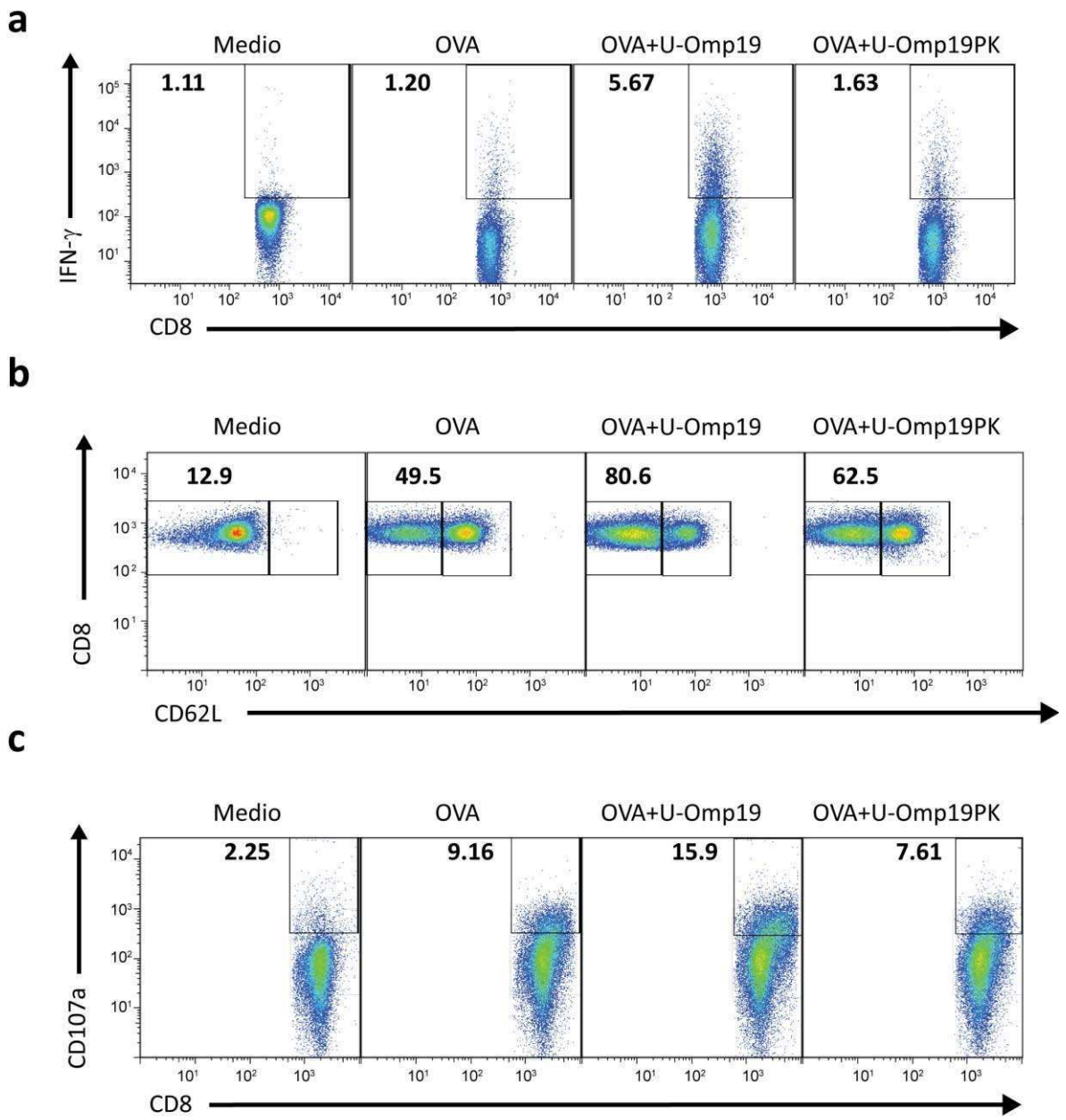

Figura 5. U-Omp19 induce la presentación cruzada de OVA por DCs *in vitro*. DCs purificadas de bazo y ganglios linfaticos de ratones C57BL/6 por selección negativa utilizando un kit de perlas magneticas fueron estimuladas con i) medio completo, ii) OVA (50μg/ml), iii) OVA (50μg/ml)+U-Omp19 (100μg/ml), iv) OVA (50μg/ml)+U-Omp19PK (100μg/ml), u v) OVA (50μg/ml)+LPS (1μg/ml). Al día siguiente estas DCs fueron co-incubadas con células OTI ($2x10^6$ células/ml) por 18hs. Las células fueron marcadas con anti-CD8, anti-CD62L y anti CD107a, se permeabilizaron y se marcaron con anti-IFN-γ o control de isotipo. Se determinó el porcentaje de células T $CD8^+$ productoras de IFN-γ (a), $CD8^+$ $CD107a^+$ y (b) $CD8^+$ $CD62L^+$ (c) restado su correspondiente control de isotipo. Representativo de 3 experimentos con resultados similares.

También se evaluó la capacidad de las DCs de inducir CTLs mediante un ensayo de citotoxicidad por degranulación de linfocitos T. Las células T al degranularse expresan la proteína de membrana asociada a lisosoma LAMP-1 (CD107a) en membrana [169], por lo tanto, la expresión de esta proteína en los LT específicos correlaciona con su capacidad lítica [170, 171]. Las DCs fueron estimuladas por 18hs con i) OVA, ii) OVA+U-Omp19, iii) OVA+U-Omp19 PK u iv) OVA+LPS, luego se co-incubaron con células OT-I durante 6hs en presencia de monensina y anti-CD107a y se evaluó la expresión de este marcador en la población de células T $CD8^+$.

Observamos un mayor porcentaje de LT $CD8^+$ $CD107a^+$ en el grupo incubado con DCs estimuladas con OVA+U-Omp19 (15.9%) comparado con el grupo incubado con las DCs estimuladas con OVA sola (9.16%) **(Figura 5c**). Las DCs incubadas con U-Omp19PK inducen porcentajes de LT citotóxicos comparables a la incubación con OVA sola (7.61%).

Estos resultados demuestran que U-Omp19 tiene la capacidad de actuar directamente sobre las DCs, estimulando su capacidad de realizar presentación cruzada de Ags a las células T $CD8^+$ específicas, las cuales se activan y se transforman en células efectoras productoras de IFN-γ y citotóxicas. Esta habilidad de U-Omp19 para inducir la presentación cruzada de OVA desaparece cuando la proteína es digerida con proteinasa K, confirmando que el efecto reside en la proteína y no es debido a posibles contaminantes no proteicos.

II. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE U-OMP19 COMO INHIBIDOR DE PROTEASAS LISOSOMALES

Los resultados obtenidos durante mi tesis de Licenciatura junto con los anteriormente expuestos demuestran que U-Omp19 es capaz de actuar como adyuvante de OVA induciendo respuestas de tipo Th1, T $CD8^+$ y CTL *in vitro* e *in vivo.* También observamos que U-Omp19 tiene un efecto directo sobre la DC promoviendo la presentación cruzada de Ags. Entonces, decidimos caracterizar el mecanismo de acción de U-Omp19. Nuestra hipótesis plantea que su capacidad como adyuvante podría estar relacionada con i) su actividad biológica como inhibidor proteasas lisosomales y/o ii) con su capacidad inmunoestimulatoria.

U-Omp19 es un inhibidor de cistein proteasas lisosomales

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que U-Omp19 posee alta homología con inhibidores de proteasas bacterianos (30⁄ identidad, Z-score 112.7). Análisis posteriores utilizando los programas PFAM y MEROPS nos revelaron que U-Omp19 pertenece a una familia de proteínas con actividad de inhibidores de proteasas alcalinas y metaloproteasas llamada inh **(Ilustración 11).**

Se ha propuesto que la susceptibilidad de los Ags proteicos a la degradación por proteasas lisosomales determina en parte su inmunogenicidad [154]. Entonces, decidimos estudiar la capacidad de U-Omp19 como inhibidor de cistein proteasas lisosomales. Se determinó la capacidad de U-Omp19 de inhibir la actividad proteolítica de proteasas lisosomales comerciales. En estos ensayos se utilizó como sustrato caseína BODIPY FL, esta proteína posee grupos fluorescentes quencheados que se exponen cuando el sustrato es digerido. Por lo tanto, un incremento en la emisión de fluorescencia es proporcional a la degradación del sustrato [161, 162].

```
U-Omp19_B.     mqssrlgnldnvsppppapvnavpagtvqKgnLdsptqfpnapstdmsaqsgtqvASLp
Aprin_Prot     -----------------------msasakLsRmvc---------llcGffsTGisMASSLi
Serratia_m     -------------------------mKgtLtRaaL---------aagGmmvTsavMAgSLa
Erwinia_ch     -------------------------mKqliiatlL-------------salSGgcMASSLr

U-Omp19_B.     paSApDLtpgavAGvWnaSlggQs--CkIa--tpqtkyGqGYr-aGplrCpgEl--Anla
Aprin_Prot     LlSAsDL-----AGQWtLqqdEapaiChlELrdsEvaEasGYdLgGdtACLtrwLPSepr
Serratia_m     LptAqsL-----AGQWeVAdsERq--CqIEflanEqsEtnGYqLvdrqrCLqsvfaAevv
Erwinia_ch     LpSAaEL-----sGQWvLSgaEQh--CdIrL-ntdvlDGttwkLaGdtACLqKlLPeapv

U-Omp19_B.     SWavngkqlvLydANGgTvAslyssGqGrfdgQttgGqavTLsR---
Aprin_Prot     AWrptPaGIALlErgGlTLmllgRqGEGdYRvQkgdGgqlvLRRatp
Serratia_m     A-gagPdGIALlQADGsTLAfFsRDGD-lYRnQlgaGdalTLKalA-
Erwinia_ch     gWrptPdGltLtQADGsavAfFsRNrD-rYehklvdGsvrTLKKkA-

                                   Average BLOSUM62 score:  Max: 3.0  Mid: 1.5  Low: 0.5
```

Ilustración 11. U-Omp19 posee homología significativa con proteínas de la familia Inh. Análisis de homología de secuencias (BLAST) entre U-Omp19 de *Brucella abortus* e inhibidores de proteasas miembros de esta familia: Aprin (inhibidor de metaloproteasas de *Pseudomonoas aeruginosa),* el inhibidor de serralisinas de *Serratia marcescens* y el inhibidor de metaloproteasas de *Erwinia chrysanthemi.* Esta homología se encuentra específicamente entre los residuos de aminoácidos 61-157. Se muestran en celeste los residuos con una identidad alta (score:3.0) y en gris los residuos con baja identidad (score:0.5).

Dado que las proteasas lisosomales son en su mayoría cistein proteasas (catepsinas) pertenecientes a la familia de las proteasas tipo papaína (papain-like cistein proteasas), decidimos evaluar la actividad de U-Omp19 sobre distintas catepsinas y la papaína. La papaína es un miembro de la misma familia de cistein proteasas presente en plantas (se encuentra en la papaya).

Específicamente, cada enzima (catepsina L, C, B o papaína) fue incubada en diferentes relaciones molares con U-Omp19 y luego se evaluó la actividad de cada proteasa. Como control negativo se utilizó U-Omp16, una proteína de *Brucella* spp. recombinante clonada, expresada y purificada de igual forma que U-Omp19 pero que no posee actividad conocida de inhibidor de proteasas. Mientras que como control positivo se utilizó un cocktail inhibidor de proteasas comercial (Sigma Aldrich). Es importante destacar que estos ensayos se realizaron utilizando un

buffer al pH óptimo de actividad de cada enzima, en este caso pH 5 para las catepsinas y pH: 6.2 para papaína.

U-Omp19 fue capaz de inhibir parcialmente la actividad de catepsina L a partir de la relación molar 1:5 ($P<0.05$ *vs* relación 1:0) mientras que inhibe la actividad de la catepsina C y B cuando se utiliza la misma relación molar inhibidor:enzima (1:1) ($P<0.001$, $P<0.01$ *vs* relación 1:0). U-Omp16 en la máxima relación molar (1:10) no fue capaz de inhibir la actividad de estas enzimas demostrando la especificidad del ensayo. Como era de esperar el cocktail inhibidor de proteasas disminuye significativamente la actividad proteolítica de todas las enzimas estudiadas **(Figura 6).** Del mismo modo, U-Omp19 fue capaz de inhibir la actividad proteolítica de la papaína ($P<0.05$, $P<0.01$ *vs* relación 1:0). Estos resultados demuestran que U-Omp19 puede inhibir la actividad proteolítica de cistein proteasas comerciales.

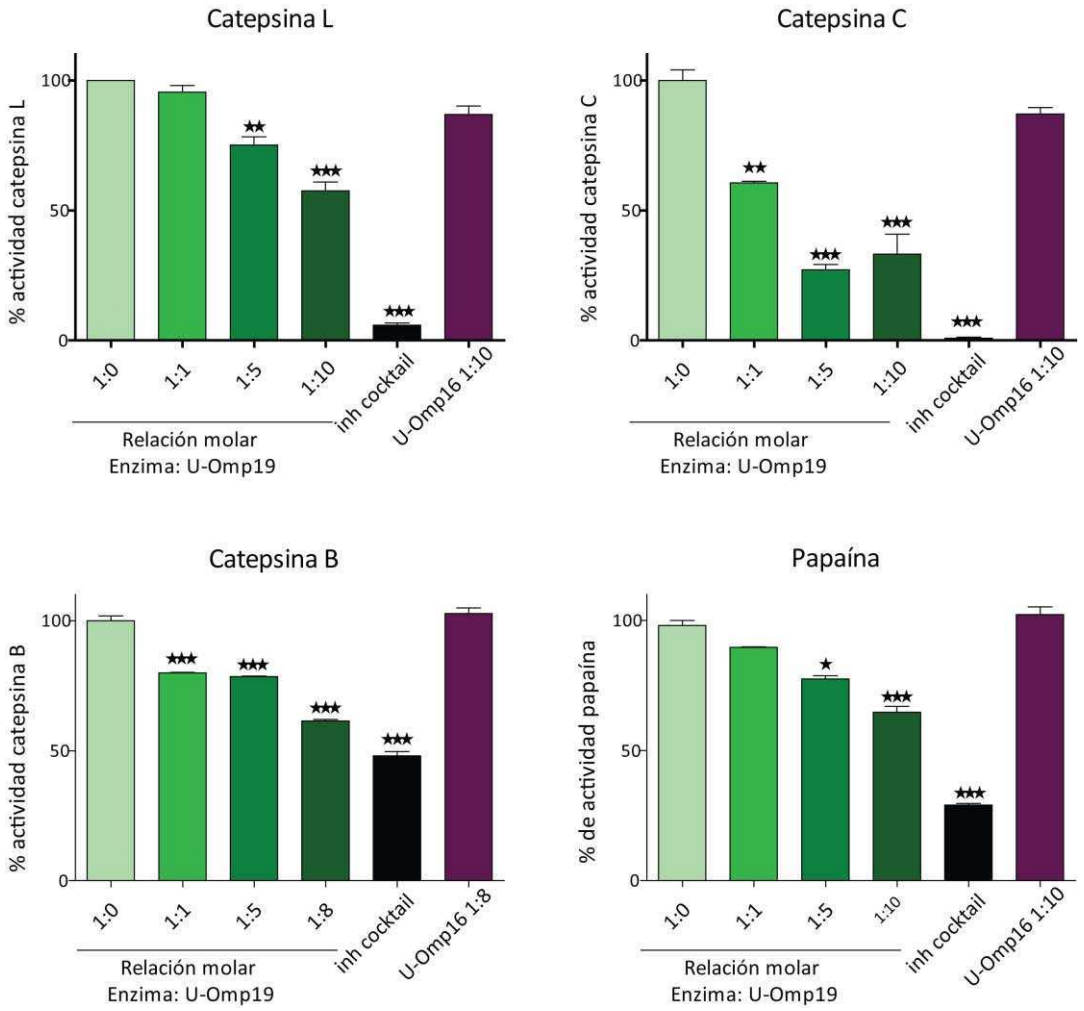

Figura 6. U-Omp19 inhibe parcialmente la actividad de cistein proteasas comerciales. Se determinó la actividad proteolítica utilizando un kit fluorométrico (Enzcheck) donde se usa caseína BODIPY como sustrato. La emisión de fluorescencia es proporcional a la degradación del sustrato. Específicamente, $1x7.10^{-3}$U/ml de catepsina L, 2U/ml de catepsina B o C y 0.5U/ml de papaína fueron incubadas en diferentes relaciones molares con U-Omp19 (proteína: inhibidor); [1:1, 1:5, 1:10 (o 1:8) o 1:0 (sin inhibidor)]. Como control positivo de inhibición se utilizó un cocktail inhibidor de proteasas eucariota. U-Omp16 en la máxima relación fue utilizada como control negativo. Todas las reacciones fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente y luego se les agregó 1µg/ml de caseína BODIPY como sustrato. Se midió la emisión de fluorescencia en un lector de fluorescencia de placas. Los datos representan la media ± SEM de determinaciones realizadas por duplicado. Los datos representan el porcentaje de la actividad proteolítica remanente tomando 100⁄ la actividad de caseína sola (relación 1:0). ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 *vs* relación 1:0. ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni. Representativo de 2 experimentos independientes con resultados similares.

U-Omp19 mantiene su estructura secundaria a distintos valores de pH

Dado que U-Omp19 ejerce su actividad *in vitro* como inhibidor de catepsinas comerciales en un ambiente ácido (pH 5) decidimos evaluar la estabilidad estructural de la proteína a estos valores de pH. Para ello, se realizó un espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta (UV) lejano (200-240nm) cuando se expone U-Omp19 a distintos pH.

La técnica de dicroísmo circular permite estudiar la estructura de proteínas en solución mediante el análisis de la absorbancia de luz circularmente polarizada. Cuando la luz polarizada atraviesa un medio ópticamente activo se producen desviaciones en el plano que están expresadas mediante el parámetro θ (expresado en grados). La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos [172]. Los espectros de dicroísmo en la región del UV lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructuras secundarias presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural.

El espectro de dicroísmo circular en el UV lejano obtenido para U-Omp19 expuesta a diferentes valores de pH (pH 2, 5 o 7.5) no evidencia ningún cambio estructural importante sobre las estructuras secundarias de la proteína **(Figura 7)**. El espectro muestra una mezcla de espectros entre los que se puede identificar un mínimo intenso a 200nm, característico de una estructura desordenada (random coil). También se observa un máximo simple a 230nm característico de proteínas con estructura lámina β, aunque estos espectros son muy variables porque las láminas pueden ser paralelas o antiparalelas y variar en el largo y ancho.

Como control se expuso la proteína a una solución de cloruro de guanidinio 6M, en este buffer la proteína se desnaturaliza y se pierde la señal característica de dicroísmo circular para

una proteína estructuralmente estable que se encuentra entre 210 y 240 nm **(Figura 7)**. Este resultado indica que U-Omp19 es estructuralmente resistente a los cambios de pH lo que le permitiría actuar como inhibidor de proteasas en ambientes extremos.

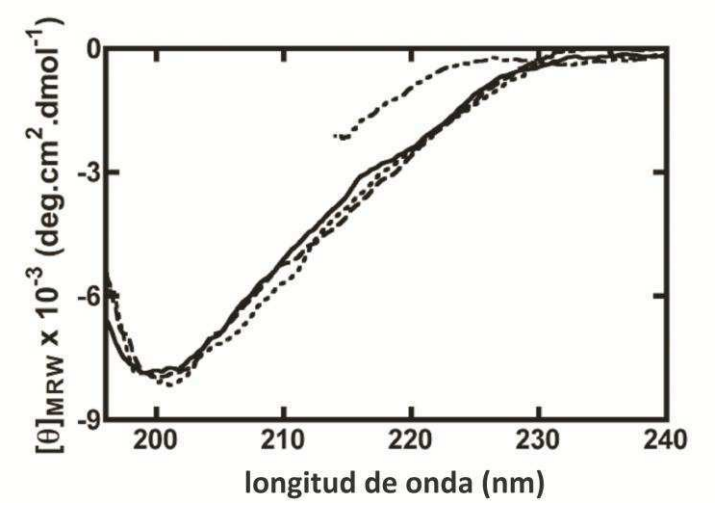

Figura 7. U-Omp19 mantiene su estructura secundaria ante cambios en el pH. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de U-Omp19 expuesta a pH 7.5 (línea entera), pH 2 (línea punteada), pH 5 (línea discontinua) y pH 7.5 cloruro de guanidinio 6M (línea punteada y discontinua).

U-Omp19 es un inhibidor competitivo de catepsina L

Con el fin de realizar una mejor caracterización de la capacidad de U-Omp19 como inhibidor de cistein proteasas se determinó el mecanismo de inhibición y la constante de inhibición (Ki) para la catepsina L utilizando un sustrato fluorogénico específico.

La enzima (catepsina L) fue incubada con distintas concentraciones de U-Omp19 durante 1h y luego se agregaron distintas concentraciones de sustrato (S) específico (Ac-HRYR-ACC). Se evaluó la cinética de degradación del sustrato mediante un lector de fluorescencia de placas. A partir de los valores de las unidades de fluorescencia obtenidas a los distintos tiempos para cada concentración de sustrato se obtuvieron las velocidades (V_0) de la reacción enzimática.

La cinética de Michaelis-Menten describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas donde: V_0= [S] Vmax/[S] Km. Graficando V_0 vs [S] y aplicando una regresión no líneal se obtiene la hipérbola característica de Michaelis Menten **(Figura 8a)** y los valores de

$Km_{aparente}$ y $Vmax_{aparente}$ para cada concentración de inhibidor (U-Omp19). La constante de Michaelis-Menten (Km) corresponde a la concentración de sustrato con la cual la velocidad de reacción enzimática alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima, este valor cambia con un inhibidor y se denomina Km aparente ($Km_{aparente}$). Mientras que la $Vmax_{aparente}$ es la velocidad a la cual los sitios activos de la enzima están saturados con sustrato.

En un mecanismo de inhibición competitiva el inhibidor se une directamente al sitio de la enzima compitiendo con el sustrato. Este tipo de inhibición se puede superar con concentraciones suficientemente altas del sustrato, es decir, dejando fuera de competición al inhibidor. En la cinética de la reacción enzimática con un inhibidor competitivo se observa que el $Km_{aparente}$ se incrementa con la concentración de inhibidor, ya que la afinidad del sustrato al sitio activo de la enzima decrece, mientras que la $Vmax_{aparente}$ permanece constante. Justamente, al graficar $Km_{aparente}$ *vs*. [U-Omp19] y $Vmax_{aparente}$ *vs*. [U-Omp19] y realizar una regresión lineal de las rectas obtenidas se observa que la $Km_{aparente}$ aumenta a medida que se incrementa la concentración de U-Omp19 (R^2 0.9648) mientras que los valores de $Vmax_{aparente}$ sufren pequeñas variaciones **(Figura 8b).**

Los efectos de diferentes tipos de inhibidores en la actividad enzimática también pueden ser visualizados usando la representación gráfica de la ecuación de Michaelis–Menten mediante los diagramas de Lineweaver-Burke al graficar las reciprocas de V_0 y [S] ($1/V_0$ *vs.* 1/[S]). En un modelo de inhibición competitiva, como la Vmax no varía con la concentración de inhibidor todas las rectas se intersectan en 1/Vmax. El diagrama de Lineweaver-Burke obtenido para U-Omp19 es consistente con un modelo de inhibición competitiva **(Figura 8c)**.

Utilizando el software del programa estadístico Graphpad se ajustó la curva de Michaelis-Menten obtenida a los cuatro principales modelos de inhibición (competitivo, no competitivo, acompetitivo y mixto) obteniendo valores de Ki y Km para la cinética de reacción de catepsina L con U-Omp19 como inhibidor. Al analizar la bondad del ajuste observamos que

el modelo que mejor se ajusta a nuestra curva es el de inhibición competitiva (R^2 0.9861). El valor de la constante de inhibición de U-Omp19 considerando que se ajusta a un modelo de inhibición está en el orden micromolar (Ki= 2,4μM).

Otra forma de evaluar la potencia de un inhibidor es calculando la concentración a la cual inhibe un 50⁄ de la enzima (IC50). El valor de IC50 varía con la concentración de sustrato y depende de la Ki. Para obtener el valor de IC50 de U-Omp19 se graficó el porcentaje de actividad proteolítica de catepsina L para cada concentración de sustrato en función de la concentración de U-Omp19 **(Figura 8d).** Los valores de IC50 obtenidos fueron graficados en función de la concentración del sustrato ([S]/Km), si los valores de IC50 aumentan con la concentración de sustrato esto sugiere un mecanismo competitivo de inhibición **(Figura 8e)**. Ademas, es posible obtener un valor de Ki a partir de la pendiente de este grafico teniendo en cuenta la siguiente ecuación: Ki= IC50/(S/Km+1). El valor de Ki obtenido para U-Omp19 a partir del gráfico de IC50 en función de [S]/Km fue de 1929 ± 179.6 nM, este valor coincide con el calculado utilizando el ajuste del programa Graphpad.

En conjunto, estos resultados indican que la cinética de reacción enzimática de la catepsina L incubada con U-Omp19 se ajustaría a un modelo de inhibición competitiva **(Figura 8f)** con una constante de inhibición en el orden micromolar.

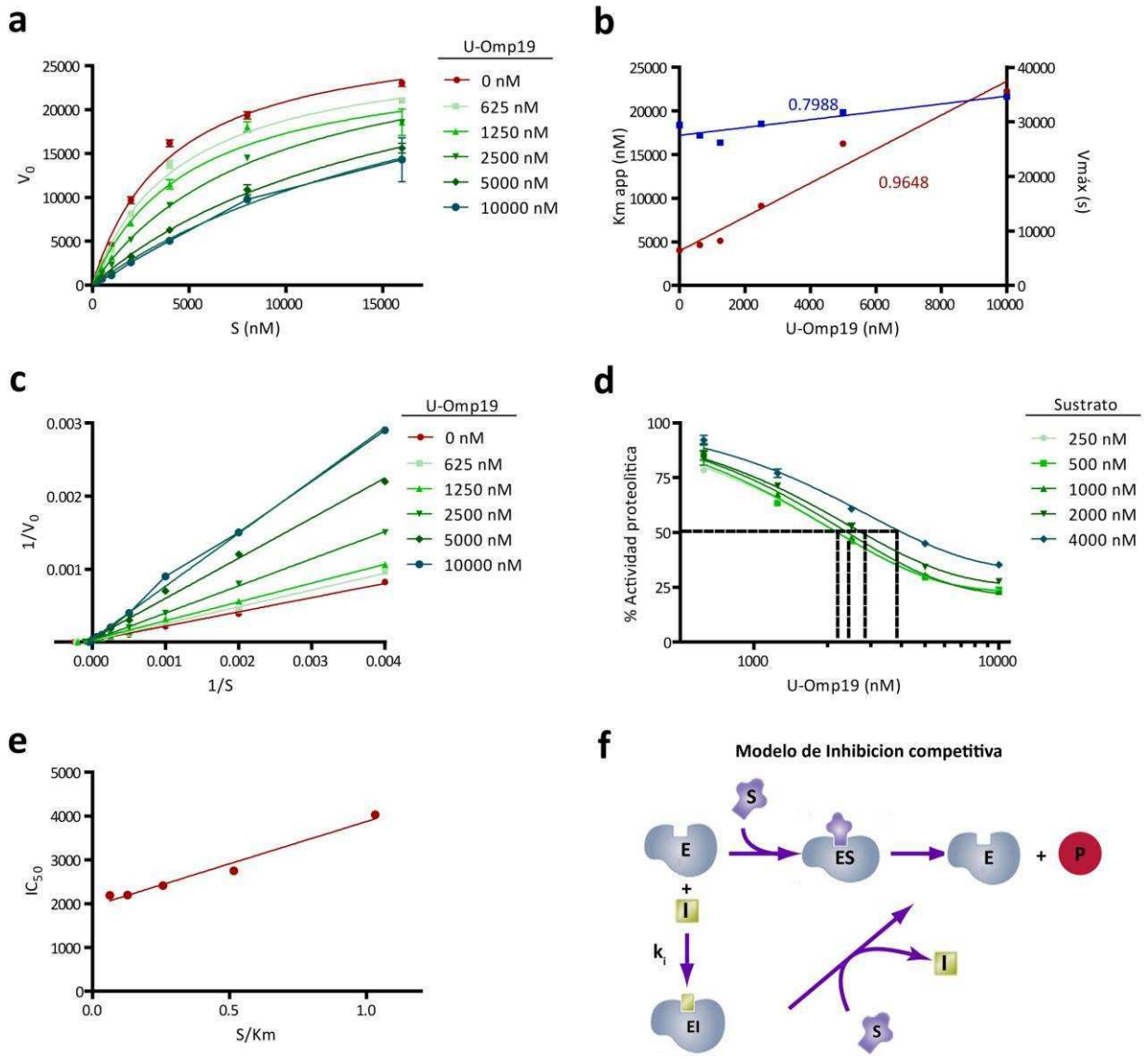

Figura 8. U-Omp19 se ajusta a un modelo de inhibición competitiva para la catepsina L. La enzima (catepsina L, 0.25nM) fue incubada con distintas concentraciones de U-Omp19 (0-1000 nM) durante 1h y luego se agregaron distintas concentraciones del sustrato fluorogénico (Ac-HRYR-ACC, 0-4000nM). Se evaluó la cinética (0-2000s, Δs=70s) de degradación del sustrato (S) mediante un lector de fluorescencia de placas. **a.** Hipérbola de Michaelis Menten de la cinética de la reacción enzimática obtenida a partir de regresión no lineal del gráfico de V_0 *vs* [S]. **b**. Gráfico de Km app *vs* [U-Omp19] y de Vmax *vs* [U-Omp19]. **c.** Diagrama de Lineweaver Burk ($1/V_0$ *vs* 1/S) a las distintas concentraciones de inhibidor (U-Omp19). **d.** Determinación de la IC50 a partir de las curvas obtenidas del gráfico de ⁄ de actividad proteolítica en función de la concentración de inhibidor para las distintas concentraciones de sustrato. **e**. Regresión lineal del gráfico de los valores de IC50 en función de la concentración de sustrato (S/Km). **f**. Modelo esquemático de una reacción enzimática con un inhibidor competitivo.

U-Omp19 reduce parcialmente la capacidad proteolítica de microsomas derivados de CPAs

Dado que las diferentes CPAs presentan un contenido proteolítico particular, el cual difiere en cuanto a la proporción y actividad de las distintas proteasas [150], decidimos estudiar la actividad inhibitoria de U-Omp19 sobre la actividad lítica de extractos lisosomales (microsomas) derivados de CPAs.

Microsomas obtenidos de células dendríticas derivadas de medula ósea de ratones (BMDCs) o de la línea celular J744 de macrófagos murinos se incubaron con distintas cantidades de U-Omp19 durante 3 horas y luego se analizó la degradación del sustrato (CASEÍNA BODIPY) mediante un lector de fluorescencia. U-Omp16 y el cocktail de inhibidores fueron utilizados como controles.

Observamos que U-Omp19 fue capaz de reducir parcialmente la actividad proteolítica de microsomas de células dendríticas y macrófagos murinos ($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.5$ *vs* 0μg de U-Omp19). Mientras que U-Omp16 no fue capaz de disminuir la degradación del sustrato por parte de los microsomas. Como era de esperar el cocktail disminuyó significativamente la actividad lítica de los mismos **(Figura 9a y b)**.

Es sabido que sin procesamiento antigénico no hay presentación a las células T e inducción de la respuesta adaptativa. Por ello, es importante destacar que el efecto inhibitorio de U-Omp19 sobre las proteasas lisosomales no es total, observándose un máximo de 35⁄ de inhibición sobre microsomas obtenidos de BMDCs y macrófagos cuando se agrega la mayor cantidad de U-Omp19.

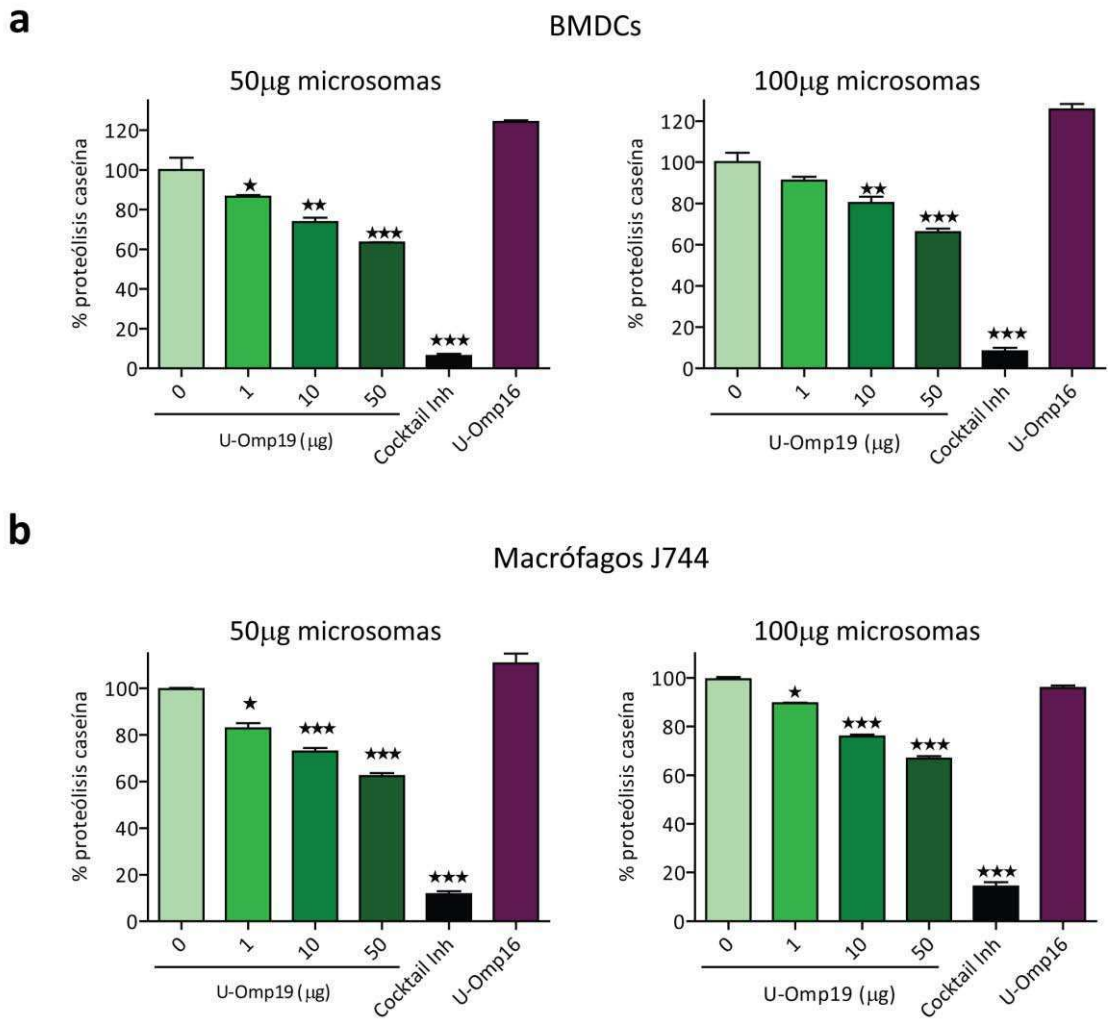

Figura 9. U-Omp19 inhibe parcialmente la capacidad lítica de microsomas derivados de CPAs *in vitro*. La capacidad lítica fue medida usando el kit fluorométrico con caseína BODIPY como sustrato (Enzcheck). Específicamente, 50 o 100µg de microsomas de BMDCs **(a)** o derivados de macrófagos de la línea celular J744 **(b)** fueron incubados con buffer o con distintas cantidades de U-Omp19 (1, 10 o 50µg) durante 3hs. Como control positivo se utilizó un cocktail de inhibidor de proteasas. U-Omp16 (50µg) se utilizó como control negativo. Los datos representan la media ± SEM de las determinaciones realizadas por duplicado del porcentaje de la actividad proteolítica remanente tomando 100⁄ la actividad de caseína sola (0µg de U-Omp19). ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 *vs* 0µg de U-Omp19. ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni. Representativo de 2 experimentos independientes con resultados similares.

Es importante destacar que se obtuvieron resultados similares en ensayos de degradación realizados con células dendríticas derivadas de medula ósea (BMDCs) – resultados no mostrados- indicando que no hay variaciones importantes en los resultados obtenidos entre estos dos tipos de células (DCs purifcadas o BMDCs).

U-Omp19 limita la actividad lítica de APCs *in vitro*

El siguiente paso fue estudiar si U-Omp19 era capaz de inhibir la capacidad degradativa de células presentadoras de antígeno *in vitro*. Para ello se utilizó OVADQ o CASEINA BODIPY como Ag, estas proteínas son muy útiles para estudiar la degradación de un antígeno ya que el incremento en su fluorescencia correlaciona con su nivel de degradación y pueden ser utilizadas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Macrófagos murinos derivados de medula ósea de ratón (BMMOs) o DCs purificadas a partir de bazo y ganglios de ratones fueron incubadas con OVADQ o CASEINBODIPY en presencia o ausencia de U-Omp19 durante 1 hora, posteriormente se determinó la degradación de los sustratos mediante citometría de flujo. Como control positivo se utilizó un inhibidor de cistein proteasas comercial (leupeptina) y como control negativo una proteína sin actividad proteasa (albúmina sérica bovina, BSA).

U-Omp19 reduce significativamente la degradación del Ag co-incubado por parte de BMMOs ($P<0.001$ *vs* caseína BODIPY) y DCs ($P<0.01$ *vs* OVADQ). De la misma forma, el inhibidor de cistein proteasas leupeptina reduce significativamente la degradación de estos Ags ($P<0.001$) mientras que BSA no altera la proteólisis de los mismos **(Figura 10a y b)**. Es importante destacar que la inhibición de la proteólisis del Ag por U-Omp19 es parcial (30-35⁄). Estos resultados demuestran que U-Omp19 es capaz de limitar la degradación intracelular del Ag co-administrado en las CPAs.

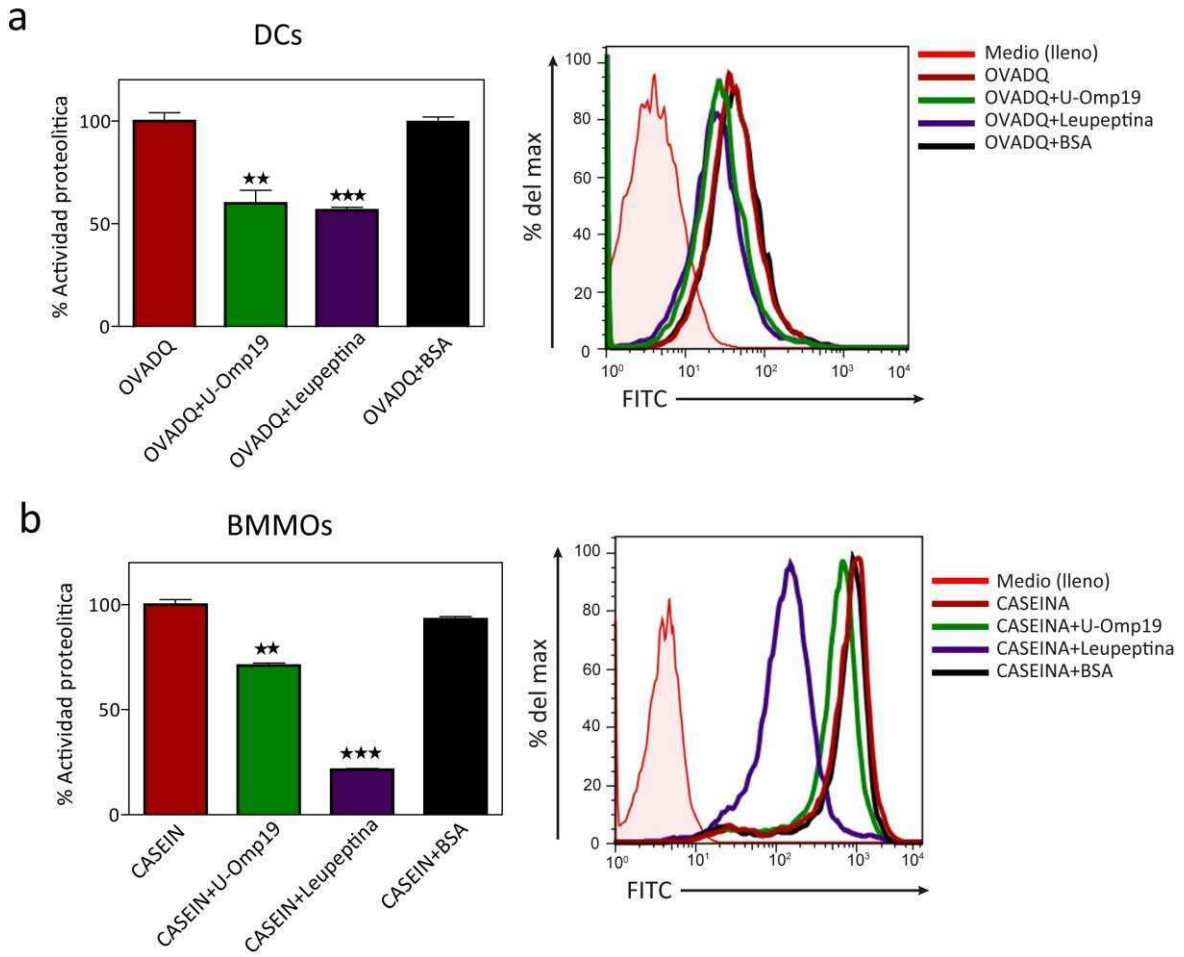

Figura 10. U-Omp19 limita la capacidad lítica de APCs *in vitro*. a) DCs purificadas de bazo y ganglios de ratones BALB/c o **b)** BMMOs ($1x10^6$ células/pocillo) fueron incubados durante 1hora con OVADQ o CASEINA BODIPY (25μg/ml) sola o en presencia de U-Omp19 (100μg/ml). Un inhibidor de cistein proteasas (leupeptina, 5μg/ml) o BSA (100μg/ml) fueron usados como controles. Se determinó la degradación de los antígenos mediante citometría de flujo. El incremento en la fluorescencia es proporcional a la degradación del Ag. Los resultados se representan en histogramas y en barras donde se muestra el porcentaje de actividad proteolítica remanente tomando 100⁄ la actividad de caseína u OVADQ sola ± SEM de las determinaciones realizadas por duplicado. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 *vs*. OVADQ o caseína BODIPY, ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni. Representativos de 3 experimentos con resultados similares.

U-Omp19 inhibe la actividad intracelular de catepsina L *in vitro*

Hasta aquí demostramos que la co-administración del Ag con U-Omp19 disminuye la susceptibilidad del mismo a la degradación por CPAs. Entonces, decidimos analizar su efecto sobre la actividad intracelular específica de catepsina L en la CPA *in vitro.*

Para ello, BMDCs o BMMOs se incubaron con OVA, OVA+U-Omp19 u OVA+leupeptina durante 1 hora. Luego el Ag fue removido y se incubó con un sustrato fluorogénico específico para catepsina L $(CBZ\text{-}Phe\text{-}Arg)_2$ [173]. Se midió la actividad de la enzima a distintos tiempos en un lector de fluorescencia de placas. Este sustrato, es permeable a la membrana celular y al igual que las sondas utilizadas anteriormente, presenta fluorescencia luego de su proteólisis de manera que permite determinar la actividad específica de la catepsina L lisosomal dentro de la célula.

Las células incubadas con OVA+U-Omp19 mostraron una reducción parcial en la actividad proteolítica de la enzima tanto en DCs como en BMMOs luego de 20, 40 o 60 min de incubación con el sustrato específico ($P<0.001$ *vs* OVA). Del mismo modo, la leupeptina redujo la actividad de esta catepsina **(Figura 11 a y b)**. En general, las catepsinas se sintetizan como pro-enzimas y requieren la eliminación de su dominio N-terminal para convertirse en proteínas enzimáticamente activas. En el caso de la catepsina L el mecanismo de eliminación del pro-dominio implica una reacción autocatalítica iniciada por el ambiente ácido de los compartimientos endosomales/lisosomales [174]. Por lo tanto, estos resultados sugieren que U-Omp19 estaría inhibiendo la forma activa de la catepsina L dentro del lisosoma de la célula presentadora.

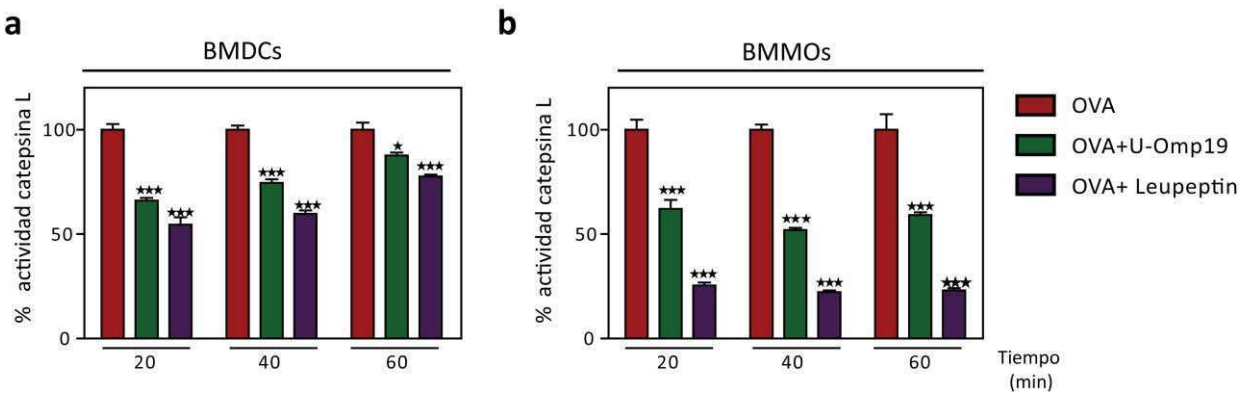

Figura 11. U-Omp19 inhibe la actividad proteolítica intracelular de catepsina L. BMDCs y BMMOs se incubaron en presencia de: i) OVA (50μg/ml), ii) OVA (50μg/ml)+U-Omp19 (100μg/ml) u iii) OVA (50μg/ml)+Leupeptina (5μg/ml) durante 60 min, luego el Ag es removido y se lavan las células. Posteriormente, se incuban en presencia de 10μg/ml del sustrato fluorogénico específico de catepsina L $(CBZ\text{-}Phe\text{-}Arg)_2$ durante 20, 40 o 60 min. Se determinó la degradación del sustrato (proporcional al aumento de fluorescencia) en un lector de fluorescencia de placas. Los datos representan la media ± SEM de determinaciones realizadas por duplicado. El porcentaje de actividad proteolítica se determina tomando como 100⁄ la actividad con OVA sola. ***P<0.001, *P<0.05 *vs* OVA sola, ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni. Representativo de 3 experimentos independientes con resultados similares.

U-Omp19 no afecta la expresión de catepsinas por la CPA

La actividad de las proteasas lisosomales se encuentra altamente controlada en las CPAs. Las catepsinas pueden regularse a varios niveles, por ejemplo; a nivel de transcripción y expresión, modificaciones post-traduccionales, localización intracelular, pH, activación de zimógenos, presencia o ausencia de inhibidores endógenos, tráfico e inactivación por degradación [138]. Particularmente, se ha descripto que el nivel de expresión de la catepsina L puede ser aumentando por factores de crecimiento y hormonas [175].

Entonces, decidimos analizar el efecto de U-Omp19 sobre la expresión de las catepsinas en las CPAs. BMDCs fueron incubadas con i) OVA, ii) OVA+U-Omp19, ii) OVA+Leupeptina o iv) medio completo durante 1h y se realizaron extractos proteicos de estas células. Se identificó la

presencia de catepsina L y C por western blot en dichos extractos utilizando anticuerpos monoclonales específicos que detectan la procatepsina L y las distintas formas de la catepsina C.

La catepsina L murina se sintetiza como una proteína entera que posee un propéptido en su N terminal, la cual es denominada procatepsina L (39-42 KDa), la remoción de este péptido de la procatepsina L puede generar dos formas de la proteína enzimáticamente activas (la cadena simple de 25KDa y la cadena pesada de 28KDa) [176]. Nuestro objetivo fue analizar la presencia de la proteína inmadura para evaluar posibles cambios en su expresión, por este motivo utilizamos un anticuerpo monoclonal que detecta a la procatepsina L. Observamos que la incubación con U-Omp19 no afecta la expresión de esta catepsina en las DCs (no hay diferencias significativas en la densidad relativa respecto de OVA), lo cual indicaría que la inhibición de la actividad proteolítica intracelular de la catepsina L observada con U-Omp19 no está mediada por una variación en la expresión de esta catepsina. La incubación con leupeptina, otro inhibidor de cistein proteasas, tampoco modifica la cantidad de catepsina L presente en los extractos **(Figura 12a)**.

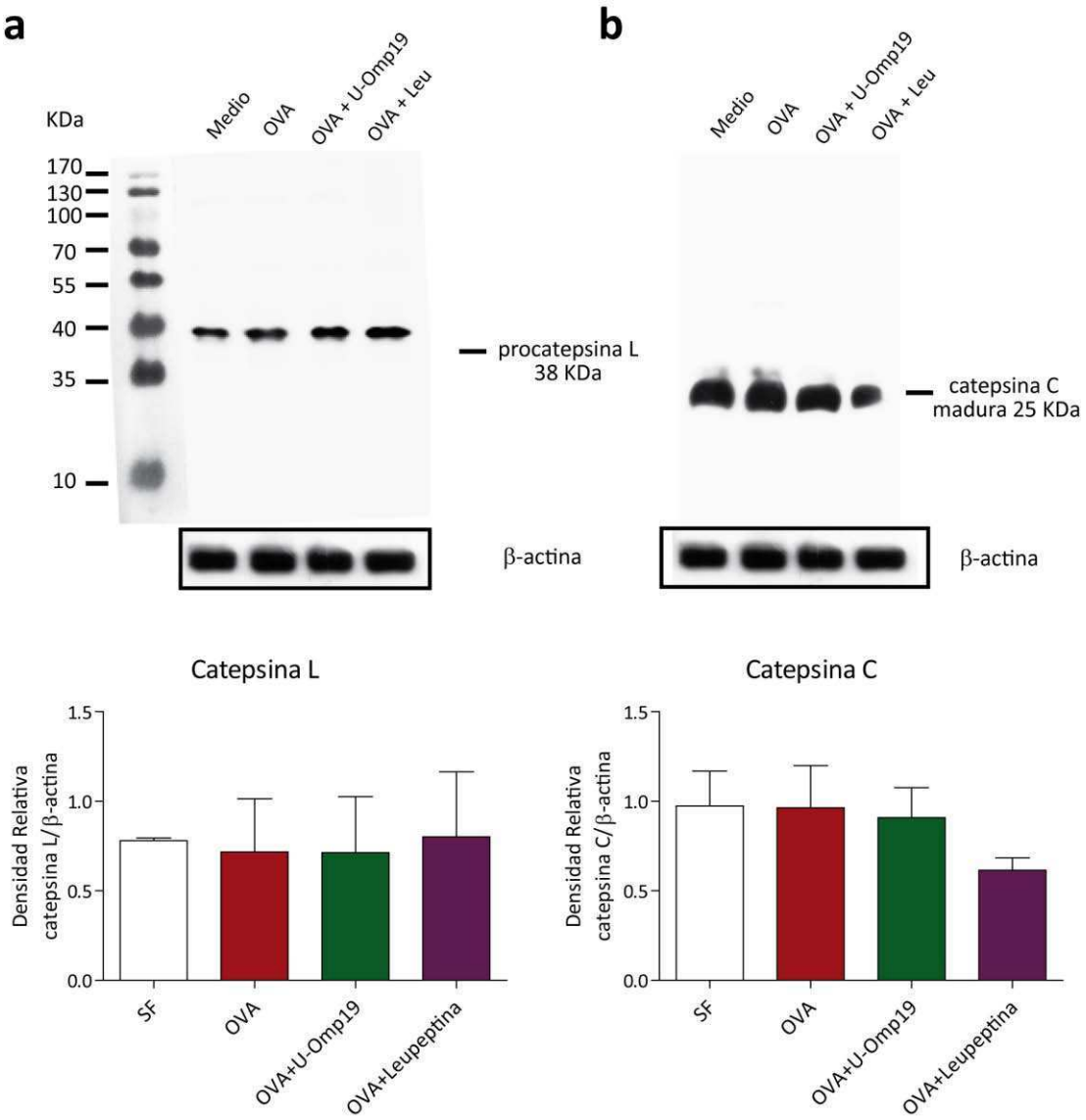

Figura 12. U-Omp19 no modifica la expresión proteica de catepsina L y C en DCs. BMDCs fueron incubadas con i) medio completo ii) OVA (50μg/ml), iii) OVA (50μg/ml)+U-Omp19 (100μg/ml) u iv) OVA (50μg/ml)+Leupeptina (5μg/ml) durante 1 hora. Se obtuvieron extractos proteicos de estas células y se realizó un Western blot para identificar la presencia de catepsina L y C utilizando Acs monoclonales específicos. Como control de carga se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-β actina. Se reveló utilizando un anticuerpo IgG acoplado a la peroxidasa de rabano (HRP). Se muestra en gráfico de barras un análisis densitométrico de la expresión relativa de las catepsinas. Los resultados fueron normalizados determinando arbitrariamente el valor 1 a la densitometría de la β actina. Se muestra la media ± SEM. n=2. ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni.

También se detectó la presencia de catepsina C en los mismos extractos de DCs. La catepsina C posee formas inmaduras de alto peso molecular (aproximadamente 55 KDa) que luego del clivaje de un propéptido se obtiene su forma madura (aproximadamente 25 KDa). Utilizamos un anticuerpo monoclonal que detecta tanto las formas inactivas como las activas maduras. Observamos que no hay diferencias en la densidad relativa de esta proteína luego de la incubación con OVA+U-Omp19 respecto de la incubación con OVA sola, indicando que la presencia de esta catepsina no varía entre estas condiciones experimentales **(Figura 12b)**. Estos resultados, en conjunto, indican que la incubación con U-Omp19 no afecta la expresión proteica de las catepsinas L y C en extractos proteicos derivados de DCs.

U-Omp19 no afecta el pH de los compartimentos endosomales de la CPA

Es sabido que las CPAs regulan el pH de sus compartimentos endosomales, en el caso de las DCs la maduración de las mismas permite la acidificación del lisosoma generando un ambiente proteolíticamente activo [177]. El pH en el cual las proteasas lisosomales se encuentran activas es de alrededor 4.5-5. Incluso se ha propuesto que las DCs, gracias a la acción de la NADPH oxidasa NOX2, pueden alcalinizar levemente sus compartimentos lisosomales resultando en un ambiente menos acido que impide una total destrucción de los péptidos antigénicos permitiendo su presentación por las moléculas MHCI y MHCII [152]. Justamente, se ha descripto un agonista de TLR7 (ácido poliuridílico, polyU) con propiedades adyuvantes que puede alterar la acidificación de los endosomas y fagosomas de DCs [178].

Por ello, analizamos el efecto que pudiera estar teniendo U-Omp19 sobre el pH endosomal de las CPAs. Utilizamos una sonda fluorogénica (pHRodo, Invitrogen) la cual se encuentra quencheada a pH neutro e incrementa su fluorescencia a medida que el pH disminuye. Esta sonda se encuentra conjugada a partículas de dextran, lo que le permite ser internalizada en los compartimentos endosomales de las CPAs. Entonces, BMDCs y BMMOs

fueron incubados con i) medio completo, ii) OVA, iii) OVA+U-Omp19, iv) OVA+Leupeptina u v) OVA+BSA durante 1 hora y se evaluó la fluorescencia emitida mediante un lector de fluorescencia de placas. Leupeptina (inhibidor comercial de cistein proteasas) y BSA (proteína sin actividad inhibitoria de proteasas) fueron utilizadas como controles. Como control positivo y negativos se utilizaron buffers a pH 5 y pH 7 respectivamente.

La fluorescencia emitida por la sonda luego de la incubación con U-Omp19 no mostró diferencias significativas entre los distintos estímulos indicando que esta proteína no produce cambios significativos en el pH de los compartimentos endosómicos de BMDCs y BMMOs. Tampoco se encontraron diferencias luego de la incubación con BSA y leupeptina. La emisión de fluorescencia luego de una hora de incubación con U-Omp19 fue similar a la observada cuando la sonda es expuesta al buffer pH=5 indicando que la sonda, a ese tiempo, se encuentra en un compartimento a este valor de pH, posiblemente el lisosoma **(Figura 13)**.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con U-Omp19 no altera el pH intracelular de las CPA, de este modo, la inhibición de las proteasas lisosomales observada no estaría relacionada con su imposibilidad para convertirse en proteasas enzimáticamente activas.

En conjunto, los resultados expuestos hasta aquí demuestran que U-Omp19: i) es un inhibidor de cistein proteasas comerciales, ii) es capaz de inhibir la degradación del Ag por las CPAs y iii) que no altera la expresión de las catepsinas por la CPA ni el pH endosomal de las mismas. Esto indicaría que la limitada degradación del Ag por la CPA luego de su co-administración con U-Omp19 está relacionada con su actividad biológica como inhibidor de proteasas.

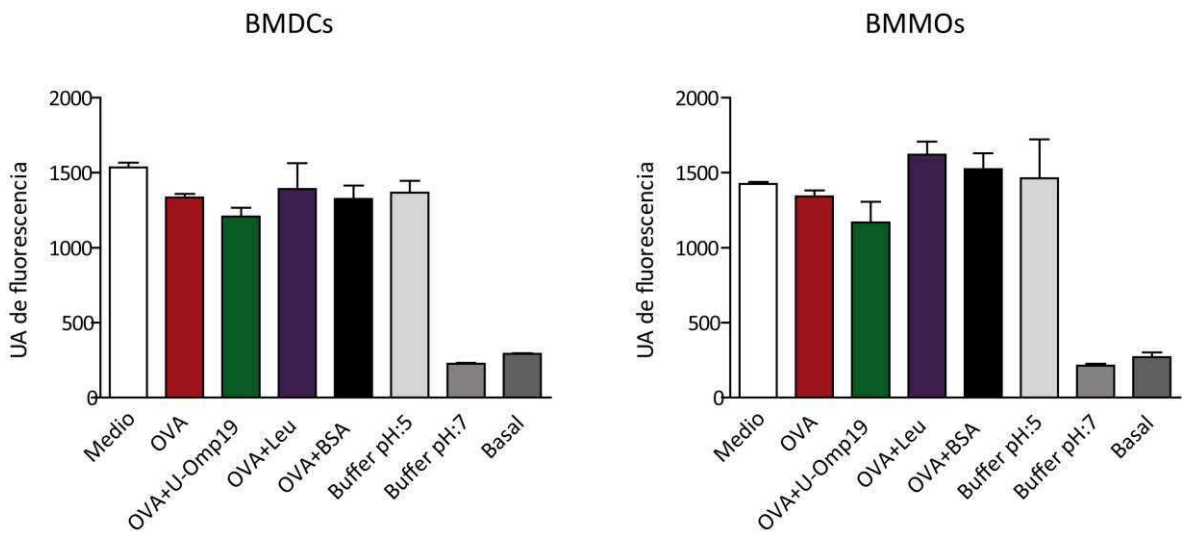

Figura 13. U-Omp19 no altera el pH intracelular de la CPA. BMDCs y BMMOs ($1x10^6$ células/ml) fueron incubados con: i) OVA (50μg/ml), ii) OVA (50μg/ml)+U-Omp19 (100μg/ml), iii) OVA (50μg/ml)+Leupeptina (5μg/ml), iv) OVA (50μg/ml)+BSA (100μg/ml) o v) medio completo durante 1h y se agregó 10μM de dextran-pHrodamine. Como control se utilizaron un buffer a pH 5 y 7. Al basal no se le agregó la sonda. La fluorescencia emitida se determinó mediante un lector de fluorescencia de placas. Los resultados representan las unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia ± SEM realizado por duplicado. Se realizó ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni. Representativo de 2 experimentos independientes con resultados similares.

La co-administración de U-Omp19 induce un aumento en la cantidad de Ag intracelular en la CPA

Nuestra hipótesis plantea que una reducción en la degradación del Ag aumentaría su disponibilidad dentro de la DC permitiendo una duradera y efectiva presentación del mismo a las células T. Con este propósito, se evaluó si la inhibición de la proteólisis del Ag co-administrado con U-Omp19 se refleja en un aumento en la presencia del mismo dentro de la CPA.

Se utilizó como Ag OVA acoplada a un fluoróforo (Alexa Flúor 647) el cual nos permite detectar su presencia dentro de la DC. Se incubaron BMDCs con el Ag durante 30 o 60 min en

presencia de U-Omp19, leupeptina, BSA o medio completo y luego se analizó la presencia del Ag (OVA-AF647) mediante citometría de flujo. A los 30 min de incubación no hay diferencias en la cantidad de Ag internalizado entre los distintos tratamientos, sin embargo luego de 60 min se observa un aumento significativo de OVA en aquellas células incubadas con U-Omp19 *(P*<0,001) y con leupeptina *(P*<0,05) respecto de OVA sola y OVA+BSA **(Figura 14a).** Este resultado sugiere que una limitada proteólisis del Ag por U-Omp19 o leupeptina correlaciona con un incremento en la cantidad de Ag dentro de la célula.

Para independizarnos de la particularidad del Ag decidimos realizar el mismo ensayo utilizando otra proteína como Ag. Por ello utilizamos la proteína fluorescente verde (GFP) y repetimos el ensayo de internalización co-incubando con medio completo, U-Omp19, leupeptina o BSA. Observamos que la cantidad intracelular de GFP es similar en todas las condiciones experimentales ensayadas a los 30 min mientras que luego de 60 min de incubación con U-Omp19 hay un aumento significativo en la presencia de GFP (*P*<0,05 *vs* GFP sola) **(Figura 14b)**.

En conjunto, estos resultados indican que la co-administración con U-Omp19 aumenta la cantidad de Ag dentro de la célula, sugiriendo que la inhibición de la proteólisis del Ag aumentaría su vida media lo cual se evidencia por una acumulación intracelular del mismo dentro de la CPA.

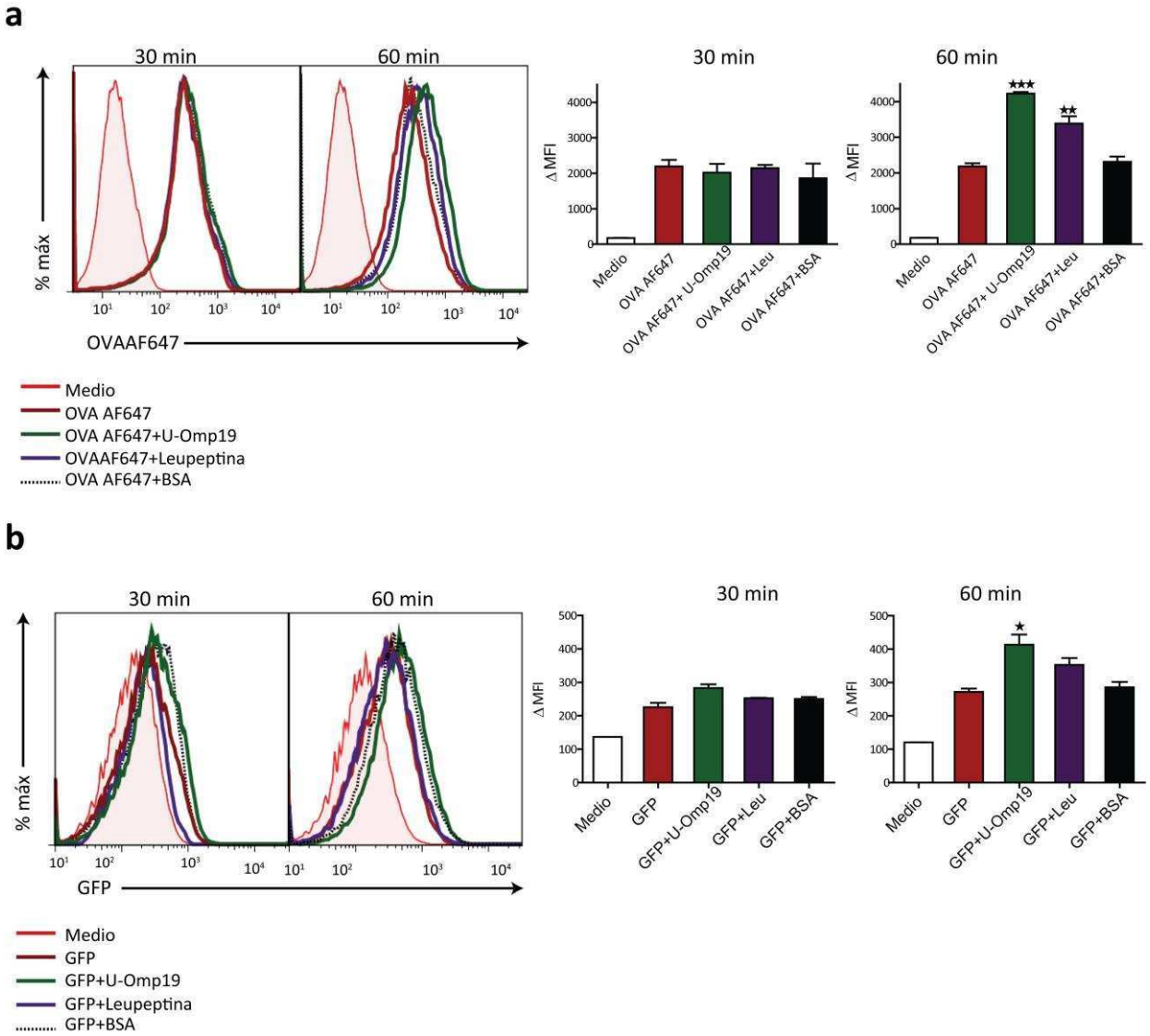

Figura 14. La co-incubación con U-Omp19 aumenta la cantidad de Ag en la DCs *in vitro*. BMDCs ($1x10^6$ células/ml) fueron incubadas con i) medio completo ii) OVA-AF647 o GFP (50µg/ml), iii) OVA-AF647 o GFP (50µg/ml)+ U-Omp19 (100µg/ml), iv) OVA-AF647 o GFP (50µg/ml)+ Leupeptina (5µg/ml) u v) OVA-AF647 o GFP (50µg/ml)+ BSA (100µg/ml) durante 30 o 60 min. Se determinó la presencia del Ag por citometría de flujo. Los datos están representados en histogramas y en gráficos de barras que muestran la MFI ± SEM. ***P<0.001, **P<0.01,*P<0.05 vs OVA-AF647 o GFP. ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni. Representativo de tres experimentos con resultados similares.

Existen adyuvantes que actúan aumentando la internalización del Ag por la CPA, por ejemplo se ha descripto que las sales de aluminio y el MF59 aumentan la eficiencia de internalización del Ag por la DC [84, 179]. Para determinar si U-Omp19 podría tener un efecto sobre la internalización del Ag y que este sea el responsable del aumento en la cantidad de Ag observado en la figura 14 se realizó un ensayo de internalización utilizando Ags no proteicos: dextran (Alexa Fluor 647) y microesferas fluorescentes (yellow green-YG), los cuales son internalizados mediante micropinocitosis y fagocitosis respectivamente pero al no ser de naturaleza proteica no pueden sufrir degradación por proteasas.

Específicamente, se incubaron BMDCs con dextran-AF647 o partículas-YG en presencia o ausencia de U-Omp19 durante 30 o 60 minutos y se analizó la cantidad de Ag internalizado mediante citometría de flujo.

Observamos que no hay diferencias en la cantidad de Dextran-AF647 o microesferas YG luego de la incubación con U-Omp19 respecto de la incubación con el Ag solo a los 30 o 60 min. Tampoco se observan diferencias significativas luego de la incubación con leupeptina o BSA **(Figura 15a y b)**. A los 60 min se observa un leve aumento en las cantidades de Dextran-AF647 o microesferas YG en todas las condiciones experimentales. Por lo tanto, la internalización de Ags no proteicos mediante pinocitosis y fagocitosis por la DC no se ve alterada por la incubación con U-Omp19.

Estos resultados sugieren que la mayor cantidad de Ag (OVA o GFP) observada en la figura 14 a los 60 min post incubación se debería a una acumulación del mismo dentro de la DC como resultado de una inhibición de su proteólisis y no a un efecto de U-Omp19 sobre la internalización de los Ags por la CPA.

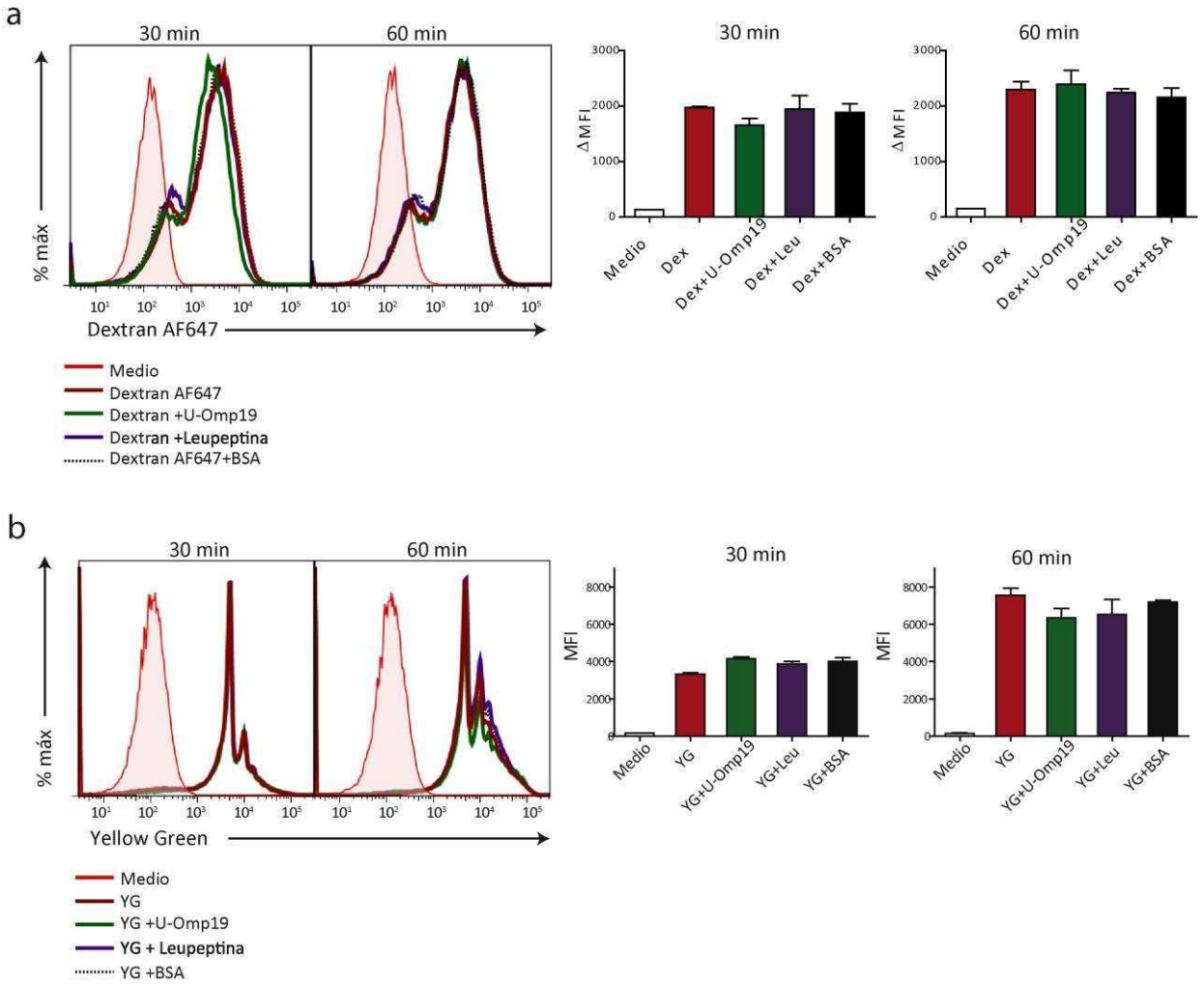

Figura 15. La incubación con U-Omp19 no afecta la internalización de Ags por las DCs. BMDCs ($1x10^6$ células/ml) fueron incubadas con i) medio completo ii) Ag (Dextran-AF647 o YG , 50µg/ml), iii) Dextran-AF647 o YG (50µg/ml)+ U-Omp19 (100µg/ml), iv) Dextran-AF647 o YG (50µg/ml)+Leupeptina (5µg/ml) o v) Dextran-AF647 o YG (50µg/ml)+BSA (100µg/ml) durante 30 o 60 min. Se determinó la presencia de Dextran-AF647 (a) o microesferas YG (b) por citometría de flujo. Los datos están representados en histogramas y en gráficos de barras que muestran la MFI ± SEM. ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni. Representativo de dos experimentos con resultados similares.

U-Omp19 retiene el Ag en compartimentos endosomales LAMP-2 positivos luego de su internalización por CPAs

Dado que observamos un incremento en la cantidad de Ag en el interior de la célula luego de la incubación con U-Omp19 decidimos investigar cual es el destino intracelular del Ag luego de su co-administración con U-Omp19. Con este propósito, se analizó la presencia del Ag en diferentes compartimentos subcelulares de las DCs por microscopía confocal.

BMDCs se incubaron durante 30 o 60 min con OVA-AF647 en ausencia o presencia de U-Omp19, luego se fijaron las células y se marcaron con anticuerpos monoclonales anti el marcador asociado a lisosoma (Lamp-2) y se identificó la presencia de U-Omp19 utilizando como Ac primario un suero policlonal anti-Omp19.

Luego de 30 minutos de co-incubación con U-Omp19 se observa que OVA se encuentra predominantemente en la periferia celular y muy poco Ag se superpone con la señal de Lamp-2 (20⁄ células Lamp-2 OVA positivas) mientras que luego de 60 min en presencia de U-Omp19, OVA se encuentra mayormente en compartimentos Lamp-2 positivos (50⁄ células Lamp-2 OVA positivas) **(Figura 16)**. Este resultado refuerza los resultados obtenidos por citometría de flujo en donde recién a los 60 min se observa un incremento significativo en la cantidad de Ag en el interior de la DC **(Figura 14a)**.

En cuanto a las células incubadas solo con OVA se observa que su presencia en los compartimentos Lamp-2 positivos es mínima y no se incrementa con el tiempo (15⁄ células Lamp-2 OVA positivas a los 30 min y 12⁄ a los 60 min). Nuestra hipótesis con respecto al comportamiento observado para OVA plantea que en ausencia de U-Omp19 el Ag estaría sufriendo proteólisis dentro de los compartimentos endosomales lo que explicaría que se pierda el efecto acumulativo observado con U-Omp19 **(Figura 16)**. Entonces, estos resultados indican que U-Omp19 aumenta la presencia del Ag co-administrado en compartimentos

endosomales Lamp-2 positivos, efecto que puede ser explicado como resultado de la inhibición de las proteasas presentes en este compartimento.

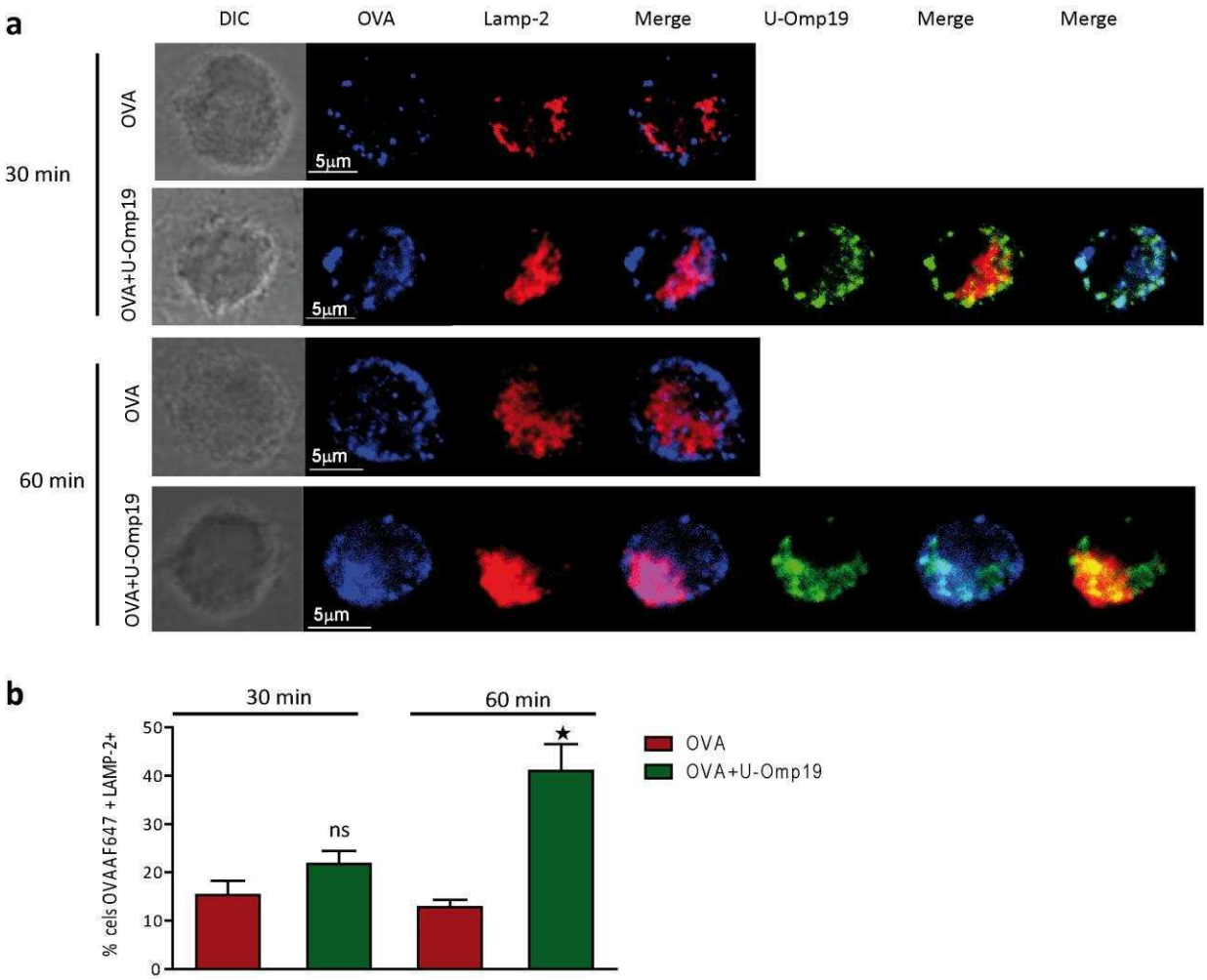

Figura 16. U-Omp19 incrementa la cantidad de Ag en los compartimentos endosomales de la DC. **a.** BMDCs ($1x10^6$ células/ml) se incubaron durante 30 o 60 min con OVA-AlexaFluor647 50µg/ml (azul) sola o en presencia de 50µg/ml de U-Omp19. Luego el Ag fue removido y las células se fijaron, se permeabilizaron y posteriormente se marcaron con suero policlonal anti-Omp19 obtenido de conejo y Ac monoclonal anti-Lamp-2. Como Acs secundarios se utilizaron anti-IgG de conejo Alexa-Fluor488 (verde) o anti-Ig de ratón Alexa-Fluor 546 (rojo) respectivamente. **b**. Conteo de células OVA-AF647 positivas y Lamp-2 positivas para determinar la localización subcelular del Ag. Los resultados representan el número de células donde se superpone la señal de OVA-AF647 y Lamp-2 ± SEM de las determinaciones. Se contaron un total de aproximadamente 500 células en 5 imágenes de diferentes campos. *P<0,05 *vs* OVA, t test. Representativo de dos experimentos con resultados similares.

Se ha propuesto que luego de la internalización de OVA soluble por el receptor de manosa (MR) en la DC una fracción de la misma puede traficar hacia los endosomas tempranos [28, 180]. Por ello, decidimos estudiar si la incubación con U-Omp19 tiene algún efecto diferencial en el tráfico regular de esta proteína luego de su internalización. En concordancia con lo que se ha reportado para OVA, observamos que luego de la incubación de las DCs durante 60 min con OVA sola aproximadamente un 30⁄ de la proteína se encuentra presente en compartimentos Rab-5 positivos (endosomas tempranos) dentro de la DC **(Figura 17),** mientras que la co-incubación con U-Omp19 no modifica significativamente la presencia de OVA en estos compartimentos (20⁄ OVA en compartimentos Rab-5 positivos).

En conjunto, los resultados obtenidos mediante microscopia confocal en la DC muestran que en presencia de U-Omp19 y luego de una hora de co-incubación, OVA se concentra principalmente en compartimentos Lamp-2 positivos (50⁄ de células OVA Lamp-2 positivas). Incluso se observa que las señales de U-Omp19 y OVA se superponen por lo que ambas proteínas se encontrarían juntas en el lisosoma **(Figura 16)**. Este resultado refuerza nuestra hipótesis ya que la presencia de U-Omp19 en el lisosoma junto con el Ag sería fundamental para que cumpla su función biológica como inhibidor de proteasas.

Estos resultados, en conjunto con los anteriormente expuestos nos permiten razonar que la acción biológica de U-Omp19 como inhibidor de catepsinas lisosomales conduce a una limitada degradación del Ag, la cual produce un “deposito antigénico” dentro de las células, almacenándose en los compartimentos lisosomales Lamp-2 positivos en donde también se encuentra a U-Omp19 luego de su co-administración con el Ag.

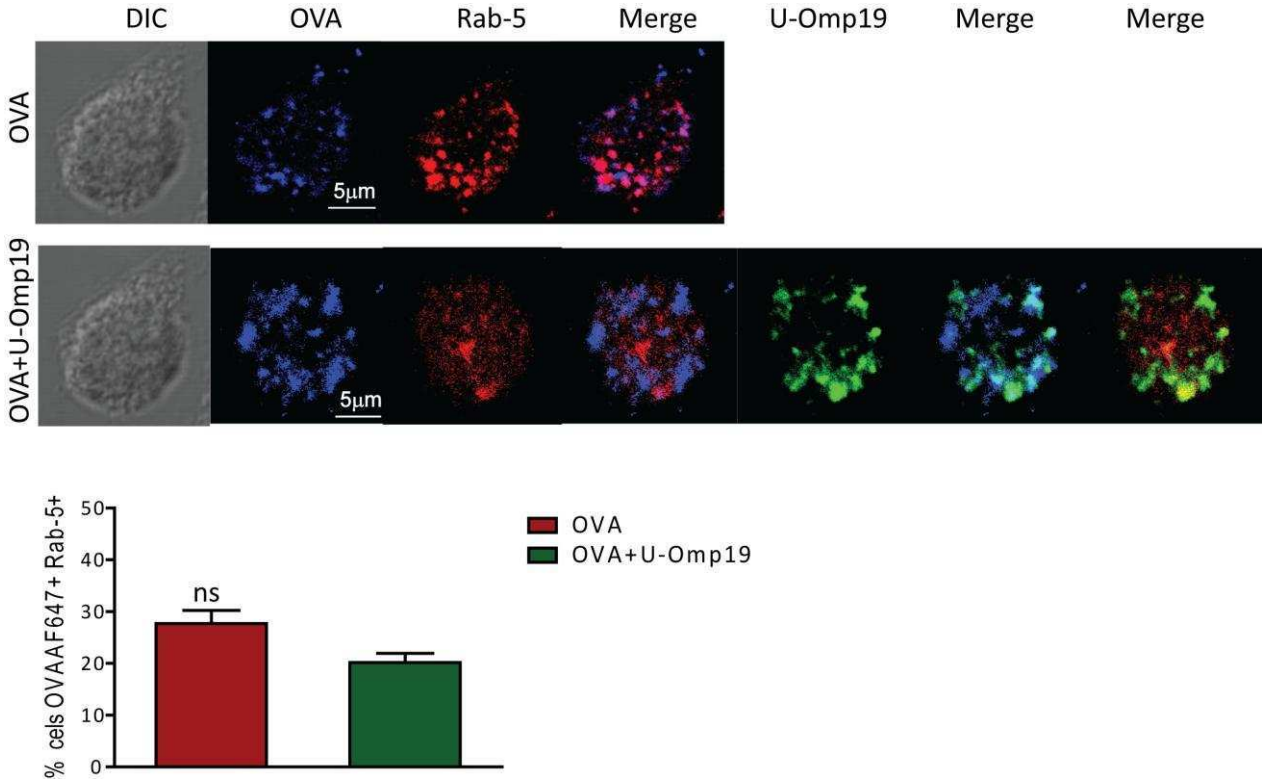

Figura 17. U-Omp19 no afecta el tráfico de OVA hacia los endosomas tempranos. BMDCs ($1x10^6$ células/ml) se incubaron durante 60 min con OVAAlexaFluor647 sola (50µg/ml) o en presencia de U-Omp19 (100µg/ml). Luego el Ag fue removido y las células se fijaron, se permeabilizaron y posteriormente se marcaron con suero policlonal anti-Omp19 obtenido de conejo o con anti-Rab5. Se utilizaron Acs secundarios anti-IgG de conejo Alexa-Fluor488 o anti-Ig de ratón Alexa-Fluor 546. Se realizó un conteo de células OVA-AF647 positivas y Rab-5 positivas para determinar la localización subcelular del Ag. Se contaron un total de aproximadamente 500 células en 5 fotos de diferentes campos. ns *vs* OVA, t test.

U-Omp19 aumenta la expresión de complejos OVA péptido-MHCI en la superficie de las DCs

Se ha reportado que la preservación prolongada del Ag dentro del lisosoma multiplicaría la oportunidad del mismo de acceder al citosol, donde estos péptidos pueden ser degradados por el proteasoma en una longitud apropiada para unirse a moléculas MHCI y ser presentados a las células T $CD8^+$ [150, 154].

Con el fin de evaluar si la actividad como inhibidor de proteasas de U-Omp19 afecta la expresión de complejos moléculas MHCI-péptido OVA en la superficie de la DC utilizamos un anticuerpo monoclonal que reconoce el péptido de OVA SIINFEKL (257-264) unido a moléculas H-2Kb (Ac 25-D1.16) [181]. BMDCs fueron incubadas con OVA en ausencia o presencia de U-Omp19 durante 3hs, luego se lavaron las células y se determinó a distintos tiempos post remoción del Ag expresión de complejos OVA257-264/H-2Kb en la superficie de la DC mediante citometría de flujo.

Las BMDCs incubadas con OVA soluble+U-Omp19 presentaron una mayor cantidad de complejos OVA257-264/H-2Kb en la superficie celular desde el tiempo 0h (retiro del Ag, $P<0.001$ *vs* OVA). Esta diferencia fue detectable hasta 12hs posteriores ($P<0.001$ a las 2hs y $P<0.001$ a las 12hs *vs* OVA) **(Figura 18)**. Por lo tanto, este resultado indica que U-Omp19 estabiliza y promueve una expresión sostenida de los complejos OVA257-264/H-2Kb en la superficie de la DC.

Si las células incubadas con OVA+U-Omp19 son tratadas con el inhibidor de proteasoma MG132 se previene la formación de complejos MHCI-SIINFEKL **(Figura 18)**, sugiriendo que la fuente de péptidos que forman los complejos con las moléculas MHCI es el citosol. Estos resultados indicarían que U-Omp19 afecta la vía citosólica de presentación cruzada de Ags exógenos ya que la expresión de complejos MHCI-SIINFEKL es sensible a la inhibición del proteasoma **(Figura 18)**.

En conjunto, los resultados hasta aquí expuestos demuestran que U-Omp19 aumenta la capacidad de la DC de realizar presentación cruzada de péptidos del Ag co-administrado (OVA) en moléculas MHCI, evento que estaría relacionado con su actividad como inhibidor de proteasas lisosomales. Una preservación del Ag en los compartimentos endosómicos permitiría una prolongada presentación del mismo por la DC al sistema inmune, y en consecuencia un aumento en la inmunogenicidad de los mismos [154].

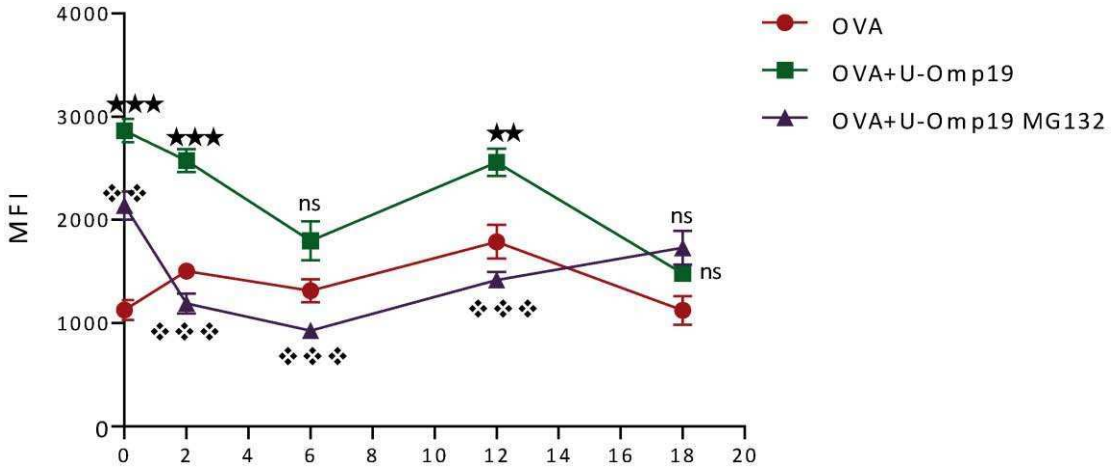

Figura 18. U-Omp19 aumenta la expresión de complejos MHCI-péptido OVA (257-264) por DCs. BMDCs ($1x10^6$ células/ml) se incubaron con OVA (50µg/ml) u OVA (50µg/ml) +U-Omp19 (100µg/ml) en ausencia o presencia de MG132 durante 3 hs. Luego el Ag es removido y se determina la expresión de complejos H-2Kb-OVA (257-264) en la superficie de las DCs utilizando el Ac específico 25D1.16 (anti-H-2K unido al péptido SIINFEKL). Se graficó la evolución de la intensidad de fluorescencia media (MFI) a través del tiempo ± SEM de determinaciones realizadas por duplicado. ****P*<0,001,* **P*<0,01 *vs* OVA. ❖❖*P*<0,01, ❖❖❖ *P*<0,001 *vs* OVA+U-Omp19. ANOVA de dos vías seguido del test Bonferroni. Representativo de 2 experimentos con resultados similares.

La co-administración de U-Omp19 por vía s.c. inhibe la degradación del Ag *in vivo* y aumenta la cantidad de Ag en las CPAs de los ganglios linfáticos drenantes

Hasta el momento demostramos que U-Omp19 es un inhibidor de proteasas lisosomales y reduce parcialmente la actividad proteolítica de CPAs murinas *in vitro*, evidenciándose una reducción en la proteólisis del Ag co-administrado y un consecuente aumento de la cantidad de Ag en los compartimentos endosomales. Así también, observamos que U-Omp19 aumenta la presentación de péptidos derivados de OVA en moléculas MHCI. Sin embargo, para la inducción de una eficiente respuesta adaptativa es importante que el Ag alcance los sitios inductivos del sistema inmune en donde la CPA presentará el Ag a las células T. Por lo tanto, decidimos evaluar si U-Omp19 efectivamente aumenta la cantidad de Ag en las CPAs en los ganglios linfáticos drenantes luego de su administración subcutánea (s.c) en ratones.

Con este propósito, ratones BALB/c fueron inoculados por vía s.c. con i) SF, ii) OVADQ+OVA-AF647, iii) OVADQ+OVA-AF647+U-Omp19 u iv) OVADQ+OVA-AF647 + aprotinina (inhibidor de proteasas comercial). El Ag OVADQ permite evaluar la degradación del mismo mientras que el Ag OVA Alexa Fluor 647 permite rastrear su presencia dentro de la célula, de esta forma, se evaluó simultáneamente la internalización y degradación del Ag en las distintas poblaciones celulares presentes en los ganglios linfáticos drenantes (axilares e inguinales) a las 12hs post-administración s.c. **(Figura 19 y 20)**.

Se analizaron las diferentes poblaciones celulares marcando las células con Acs monoclonales anti-CD11c, CD11b y CD8α. Dentro de las DCs convencionales murinas se pueden distinguir dos grandes poblaciones: las CD11c$^+$ CD11b$^-$ CD8α^+ y las DCs CD11c$^+$ CD11b$^+$. Las DCs de fenotipo CD11c$^+$ CD8α^+ se han asociado con una mayor eficiencia en la presentación cruzada de Ags [34, 182]. En el ganglio linfático además se puede encontrar monocitos/macrófagos (CD11b$^+$ CD11c$^-$) que internalizan y procesan Ag.

Observamos por citometría de flujo que luego de 12hs de la administración de OVA+U-Omp19 la cantidad de Ag (OVA-AF647) presente en DCs $CD11c^+$ $CD11b^-$ $CD8\alpha^+$ y $CD11c^+$ $CD11b^+$ aumenta significativamente ($P<0.05$ y $P<0.001$ respectivamente), pero no así en la población de monocitos/macrófagos $CD11b^+$ $CD11c^-$ **(Figura 19a y b)**. La aprotinina también aumentó significativamente la cantidad de OVA en las DCs $CD11c^+$ $CD11b^+$ ($P<0.01$) de los ganglios linfáticos luego de su co-administración.

Por otro lado, se analizó la señal de OVADQ (proporcional a la degradación del Ag) en las mismas células de ganglios linfáticos drenantes obtenidas de los ratones luego de la co-administración con U-Omp19. Observamos que en todas las poblaciones analizadas: DCs $CD11c^+$ $CD11b^-$ $CD8\alpha^+$ y $CD11c^+$ $CD11b^+$ y monocitos $CD11b^+$ $CD11c^-$ existe una reducción significativa en la degradación de OVA luego de la co-administración con U-Omp19 ($P<0.001$ y $P<0.001$ *vs* OVA, **Figura 20**). La aprotinina también redujo la proteólisis de OVA en todas las poblaciones analizadas) en una magnitud similar a U-Omp19 ($P<0.001$ y $P<0.001$ *vs* OVA).

Estos resultados indican que la co-administración de U-Omp19 por vía s.c. reduce la susceptibilidad a la proteólisis del Ag lo que a su vez incrementa la vida media del Ag en las CPA de los ganglios linfáticos drenantes. Entonces, la actividad como inhibidor de proteasas de U-Omp19 demostrada en esta tesis aumentaría la disponibilidad de Ag en la CPA *in vivo*.

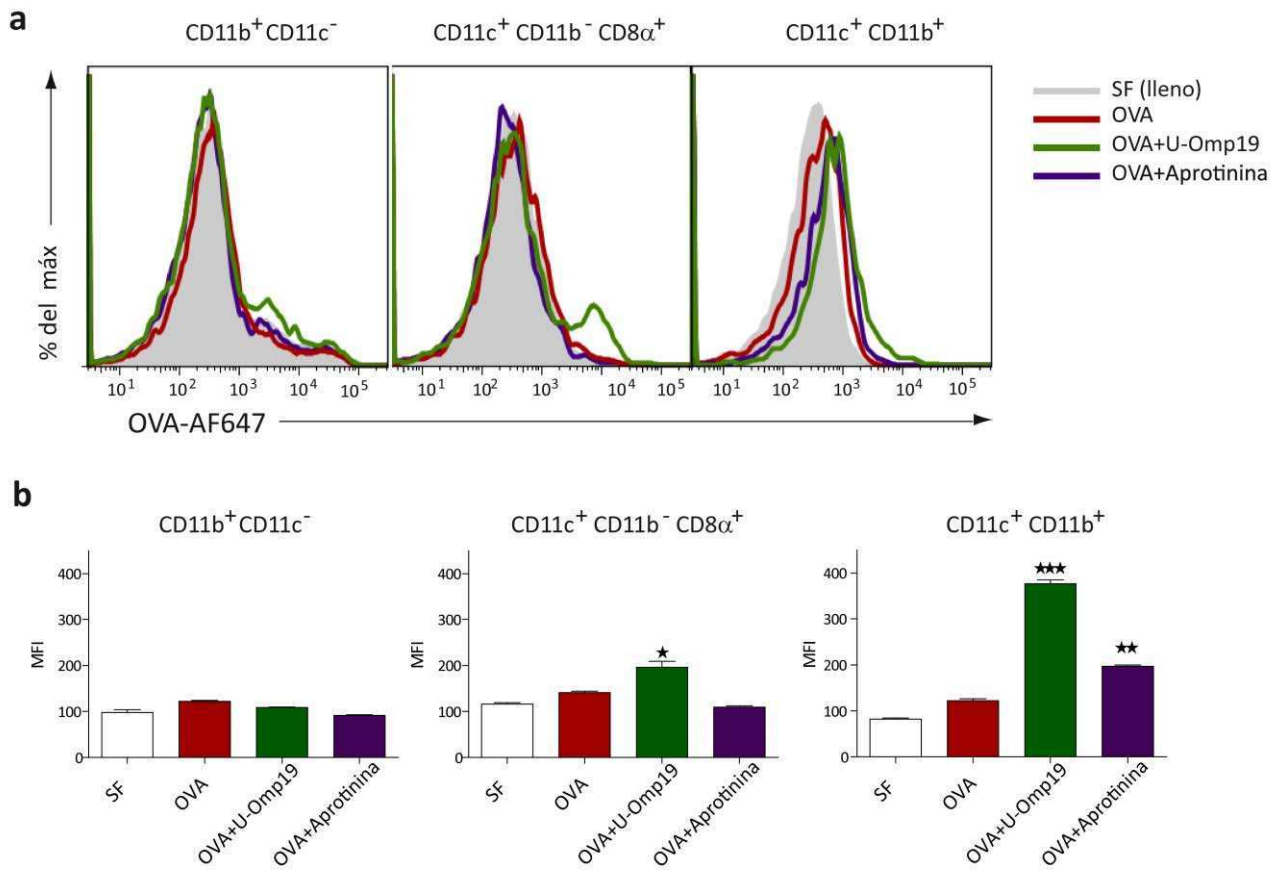

Figura 19. La co-administración de U-Omp19 por vía s.c. aumenta la cantidad de Ag en la CPA *in vivo*. Ratones BALB/c fueron inoculados con i) SF ii) OVADQ + OVA-AF647 (25µg de cada Ag), iii) OVADQ + OVA-AF647 (25µg de cada Ag)+ U-Omp19 (100 µg) u iv) OVADQ + OVA-AF647 (25µg de cada Ag) + Aprotinina (1µg). A las 12 post-inoculación se extrajo el bazo y los ganglios drenantes (axilares e inguinales) de los animales inmunizados y se obtuvieron suspensiones celulares de dichos órganos. Las células fueron lavadas y luego marcadas con anticuerpos anti-CD11c, anti-CD11b y anti-CD8α. Se determinó la presencia del Ag (OVA-AF647) en las distintas poblaciones celulares mediante citometría de flujo. Los datos están representados en histogramas y en gráficos de barras que muestran la MFI ± SEM. *n*/grupo=3. **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001 *vs* OVA. ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni. Representativo de dos experimentos con resultados similares.

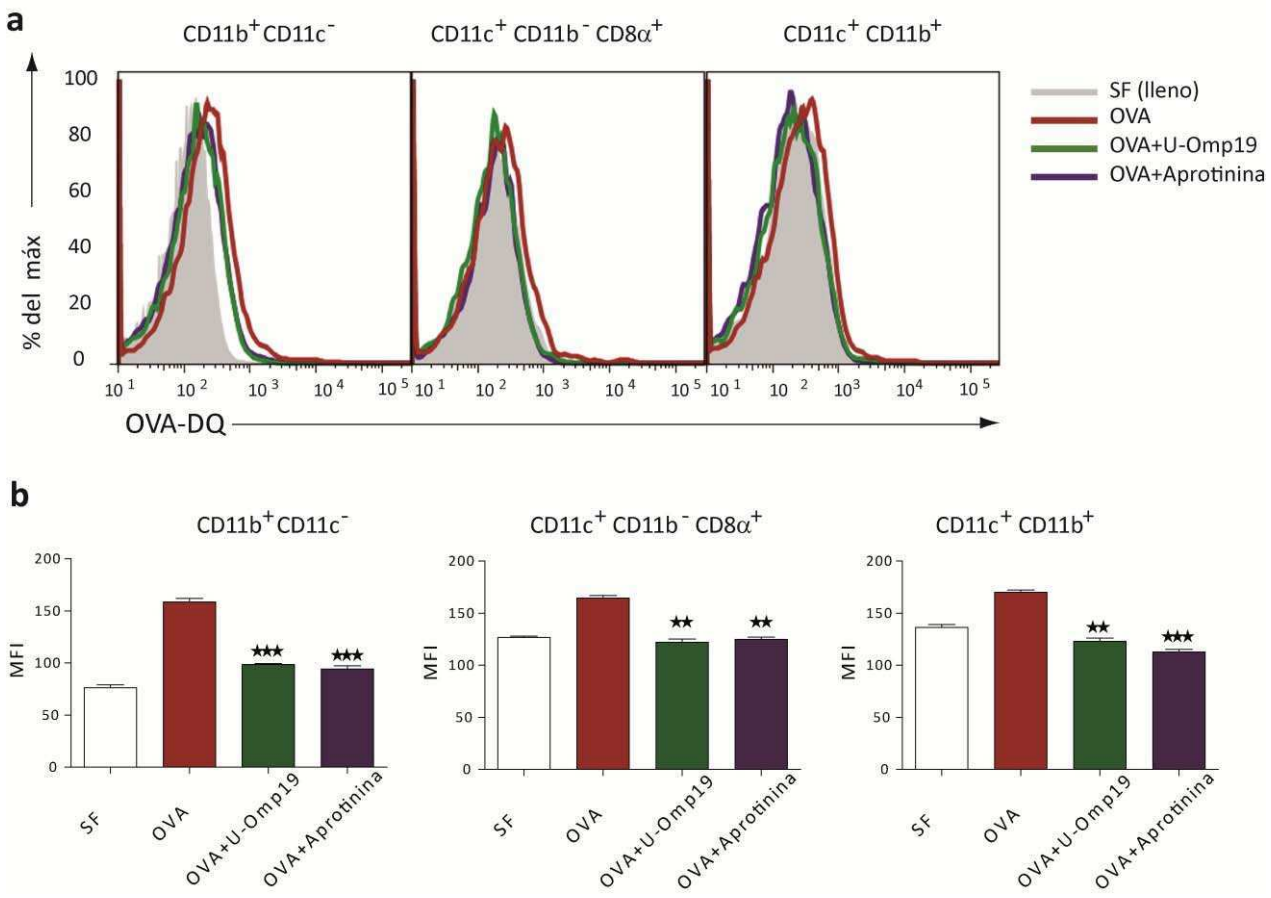

Figura 20. U-Omp19 reduce la proteólisis de OVA en las CPA *in vivo*. Ratones BALB/c fueron inoculados con i) SF ii) OVADQ + OVA-AF647 (25µg de cada Ag), iii) OVADQ + OVAA-F647 (25µg de cada Ag)+ U-Omp19 (100 µg) u iv) OVADQ + OVA-AF647 (25µg de cada Ag)+ Aprotinina (1µg). A las 12hs. post-inoculación se extrajeron los ganglios drenantes (axilares e inguinales) de los animales inmunizados y se obtuvieron suspensiones celulares de dichos órganos. Las células fueron lavadas y luego marcadas con Acs anti-CD11c, anti-CD11b y anti-CD8α. En esta figura se determinó la degradación del Ag (OVADQ) en las distintas poblaciones celulares mediante citometría de flujo. Los datos están representados en histogramas y en gráficos de barras que muestran la MFI ± SEM. *n*/grupo=3. **P*<0,05, *** P*<0,01, ****P*<0,001 *vs* OVA. ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni. Representativo de dos experimentos con resultados similares.

III. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INMUNOESTIMULATORIA DE U-OMP19

Nuestra hipótesis planteaba que la capacidad como adyuvante de U-Omp19 sobre la respuesta inmune celular podría estar relacionada con i) su actividad biológica como inhibidor proteasas lisosomales y/o ii) con su capacidad inmunoestimulatoria. Dado que ambas hipótesis no son excluyentes en esta sección de la tesis estudiaremos la capacidad inmunoestimulatoria de U-Omp19 sobre las DCs.

La co-administración de U-Omp19 aumenta el tráfico de células inmunes a los ganglios linfáticos drenantes

La inducción de una apropiada respuesta inflamatoria local luego de la inyección del Ag facilita la llegada a esa área de CPAs que endocitan y transportan el Ag desde el tejido periférico hacia los ganglios linfáticos donde se dará inicio a la respuesta inmune adaptativa. Se ha descripto que algunos adyuvantes, entre ellos las sales de aluminio y el MF59 pueden inducir el reclutamiento de monocitos al sitio de inyección que luego migrarán a los ganglios linfáticos [59].

Decidimos evaluar el efecto de U-Omp19 sobre el reclutamiento de CPAs a los ganglios linfáticos drenantes luego de su co-administración por vía s.c. Con este propósito, se inocularon animales con i) SF, ii) OVA, iii) OVA+U-Omp19 u iv) OVA+aprotinina y a las 12hs post-administración se extrajo el bazo y los ganglios linfáticos drenantes (axilares e inguinales) y se obtuvieron suspensiones celulares. Luego las células se marcaron con Acs específicos para cada subtipo celular (DCs $CD11c^+$ $CD11b^-$ $CD8\alpha^+$, DCs $CD11c^+$ $CD11b^-$ y monocitos/macrófagos $CD11b^+CD11c^-$) y se estudió la frecuencia de las distintas poblaciones celulares mediante citometría de flujo.

La co-administración del Ag con U-Omp19 indujo un aumento en el número de DCs $CD11c^{+}$ $CD11b^{-}$ $CD8\alpha^{+}$ ($P<0.01$ vs OVA) y de monocitos/macrófagos $CD11b^{+}CD11c^{-}$ ($P<0.05$ vs OVA) en los GLD a las 12 hs post-administración **(Figura 21a)**. La co-administración con aprotinina no fue capaz de aumentar el número de estas poblaciones en los GLD. Por otro lado, en las células de bazo no se observó un aumento signficativo en ninguna población en particular a las 12hs post-inoculación de OVA con U-Omp19 **(Figura 21b)**.

La administración de OVA+U-Omp19 indujo el reclutamiento diferencial hacia los GLD de DCs del subtipo $CD11c^{+}CD8\alpha^{+}CD11b^{-}$, las cuales han sido asociadas con una capacidad única para realizar presentación cruzada de Ags e inducir respuestas de tipo T $CD8^{+}$ y citotóxicas [183, 184].

En conjunto estos resultados demuestran que U-Omp19 es capaz de inducir la migración de CPAs desde el sitio de inyección a los órganos linfáticos secundarios, evento que sugiere la capacidad inflamatoria de esta proteína.

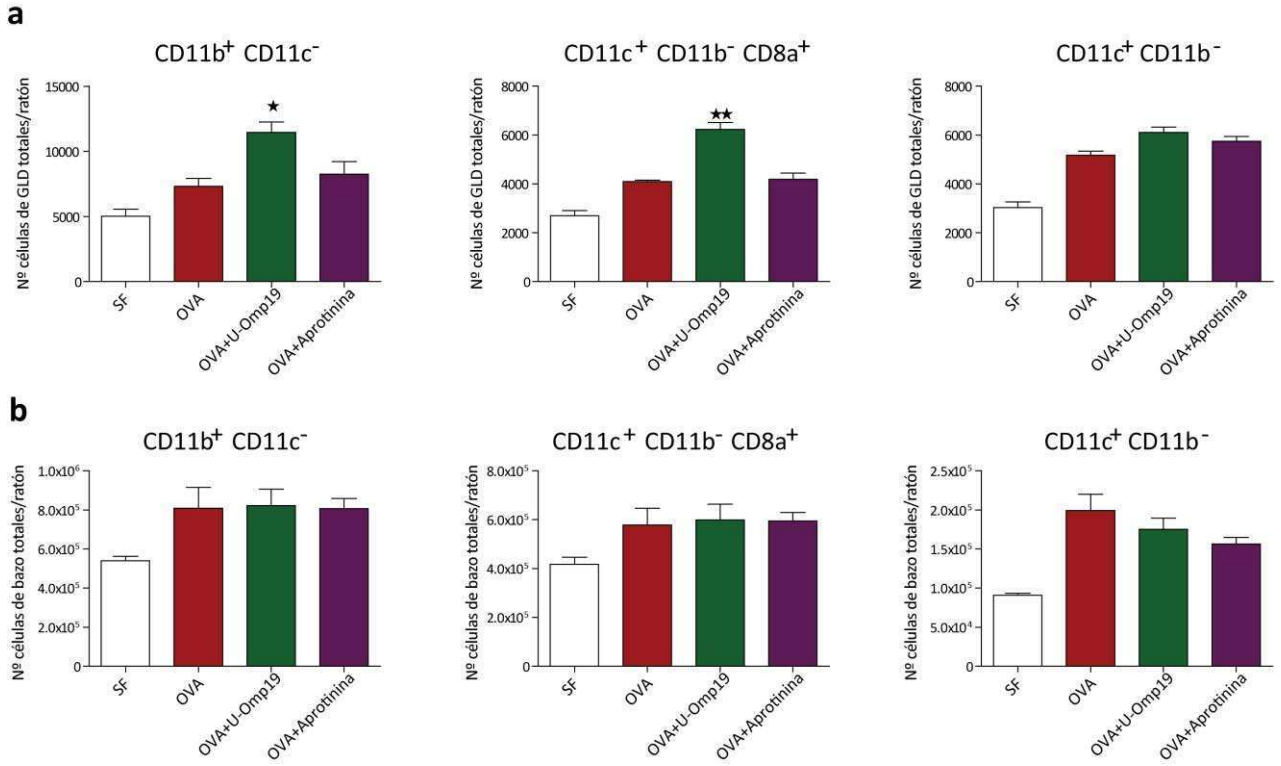

Figura 21. La administración de U-Omp19 por vía s.c. induce la migración de DCs y macrófagos a los ganglios linfáticos drenantes. Ratones BALB/c fueron inoculados con i) SF ii) OVA (50μg), iii) OVA (50μg)+U-Omp19 (100μg) u iv) OVA (50μg)+Aprotinina (1μg). A las 12 hs. post-inoculación se extrajo el bazo y los ganglios drenantes (axilares e inguinales) de los animales inmunizados y se obtuvieron suspensiones celulares de dichos órganos. Las células fueron lavadas y luego marcadas con Acs anti-CD11c, anti-CD11b y anti-CD8α. Se determinó el número de células totales en las distintas poblaciones celulares: ganglios drenantes (a) y bazo (b) mediante citometría de flujo. Los datos representan la media ± SEM del número de células totales por ratón en las poblaciones celulares indicadas. *n*/grupo=3.*P<0,05, ** P<0,01 *vs* OVA. ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni. Representativo de dos experimentos con resultados similares.

U-Omp19 promueve la activación de células dendríticas

Las DCs cumplen un rol esencial en el desarrollo de las respuestas inmunes adaptativas como iniciadoras y moduladoras de estas respuestas [185]. De esta forma, la interacción directa o indirecta del adyuvante con las APCs, principalmente las DCs, que promueva la activación de las mismas es uno de los mecanismos de acción más reportado de los adyuvantes [186-188].

Nuestro grupo ya ha demostrado que la administración de U-Omp19 por vía endovenosa promueve la activación de células dendríticas *in vivo* [189]. Teniendo en cuenta este hecho junto con los resultados anteriores los cuales demuestran que U-Omp19 tiene un efecto directo sobre las DCs que incrementa su capacidad de realizar presentación cruzada de Ags, decidimos analizar si U-Omp19 es capaz de producir la activación de DCs.

BMDCs fueron incubadas con: i) OVA, ii) OVA+U-Omp19, iii) OVA+U-Omp19PK, iv) OVA+Leupeptina, v) OVA+LPS, o vi) medio completo. El LPS de *E. coli* fue utilizado como control positivo de activación de DCs. Como control negativo se incubaron las células solo con medio completo. Luego de 18 hs se evaluó la expresión en membrana de las moléculas CD40, CD86 y MHCII (como marcadores de activación) en la población de DCs mediante citometría de flujo. Se seleccionó la población de DCs como aquella que expresa $CD11c^+$ y $MHCII^+$. También se evaluó la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1β, TNF-α) en los sobrenadantes de las células estimuladas mediante ELISA.

Las incubación con OVA+U-Omp19 induce un incremento significativo en la expresión en membrana de las moléculas CD40 y CD86 en las DCs ($P<0.001$ *vs* OVA), comparada con la expresión basal determinada en DCs incubadas con OVA sola, OVA+U-Omp19PK o con medio completo **(Figura 22)** pero no se observó un aumento en la expresión de MHCII. El tratamiento con LPS indujo un aumento en la expresión de las moléculas CD40 y CD86 ($P<0.001$ *vs* OVA). Se incluyó como control un inhibidor de cistein proteasas comercial- Leupeptina- el cual si bien

muestra un efecto en la inhibición de la degradación del Ag no induce la activación de las DCs **(Figura 22)**.

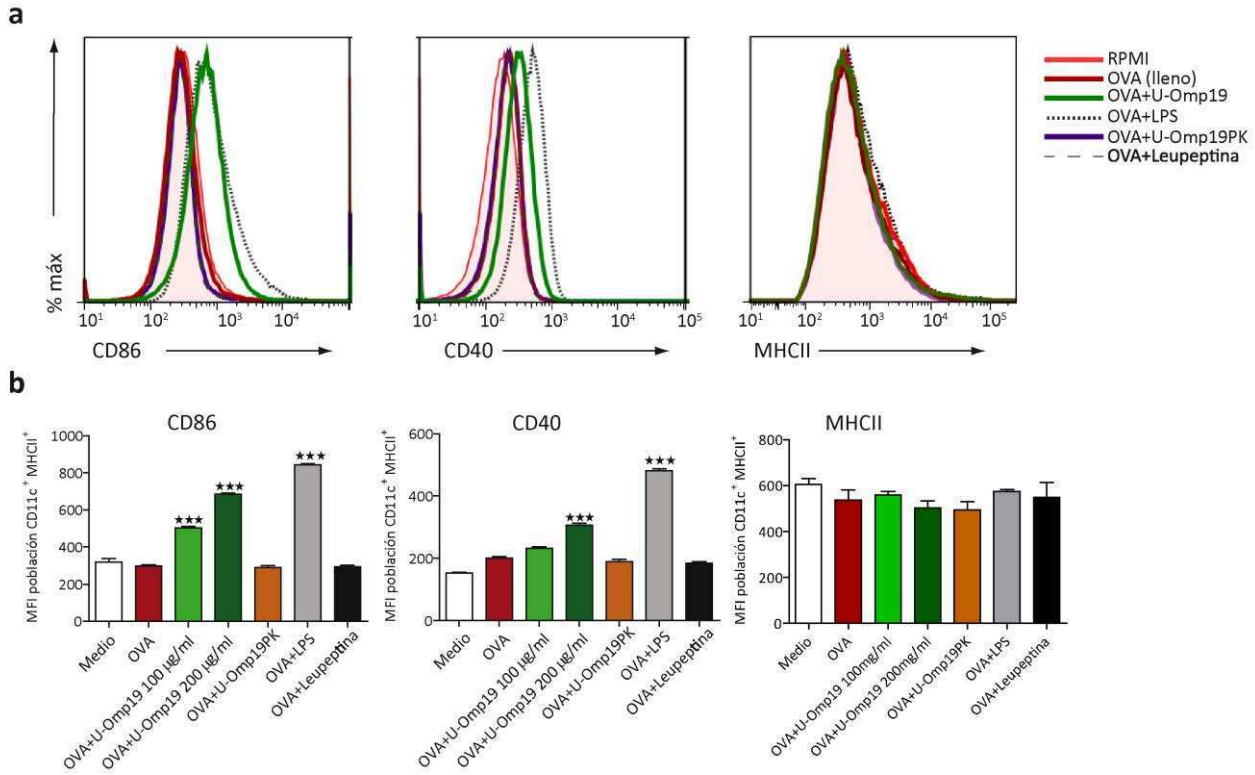

Figura 22. Activación de DCs por U-Omp19. BMDCs (1x10^6 células/ml) fueron estimuladas durante 18 hs con i) OVA (50µg/ml), ii) OVA (50µg/ml)+U-Omp19 (100µg/ml), iii) OVA (50µg/ml)+U-Omp19 (200µg/ml), iv) OVA (50µg/ml)+U-Omp19 PK (200µg/ml), v) OVA (50µg/ml)+Leupeptina (5µg/ml), vi) OVA (50µg/ml)+LPS (1µg/ml), o vii) medio completo. **a**. Se determinó la expresión en superficie de las moléculas CD86, CD40 y MHCII mediante marcación con Acs monoclonales y posterior análisis por citometría de flujo. Los resultados se representan en histogramas (a) y gráficos de barras (b) en éstos últimos los valores representan la MFI ± SEM de determinaciones realizadas por duplicado. ***P<0,001 *vs* OVA. ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni. Representativo de tres experimentos con resultados similares.

Por otro lado, se observó un aumento significativo y dosis dependiente en el nivel de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1β, TNF-α) secretadas por las DCs co-incubadas con OVA+U-Omp19 (100ug/ml y 200ug/ml, *P*<0.001 *vs* OVA) **(Figura 23)**. El tratamiento con U-Omp19PK no produce un aumento significativo en el nivel de las citoquinas producidas respecto a la co-administración del Ag con U-Omp19 confirmando que el efecto observado reside en la proteína. Mientras que el control con leupeptina tampoco fue capaz de incrementar la cantidad de citoquinas liberadas por la DC. El control positivo (LPS) aumentó significativamente (*P*<0.001 *vs* OVA) la producción de todas las citoquinas analizadas **(Figura 23)**.

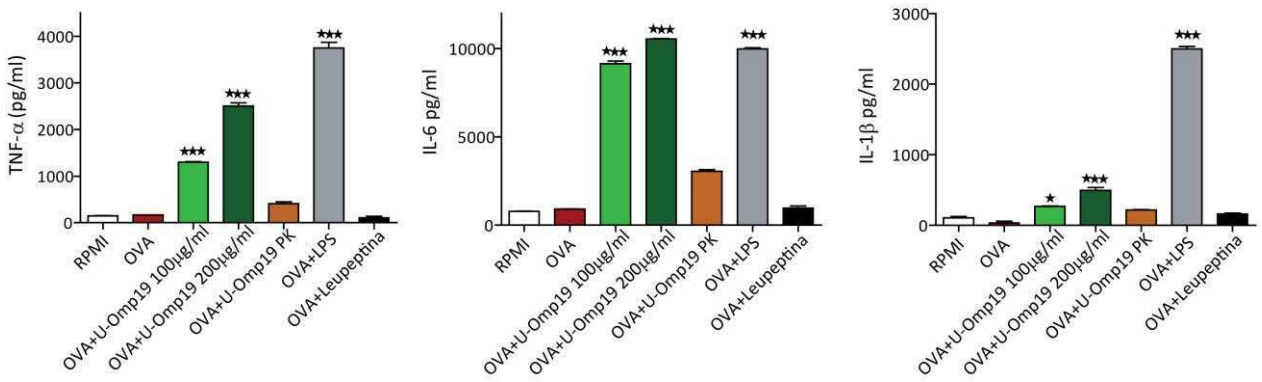

Figura 23. Activación de DCs por U-Omp19. BMDCs (1x10^6 células/ml) fueron estimuladas durante 18 hs con i) OVA (50μg/ml), ii) OVA (50μg/ml)+U-Omp19 (100μg/ml), iii) OVA (50μg/ml)+U-Omp19 (200μg/ml), iv) OVA (50μg/ml)+U-Omp19PK (200μg/ml), v) OVA (50μg/ml)+Leupeptina (5μg/ml), vi) OVA (50μg/ml)+LPS (1μg/ml), o vii) medio completo. **a**. Se determinó el nivel de las citoquinas IL-6, IL-1β, TNF-α secretadas en los sobrenadantes de las células estimuladas mediante ELISA. Los datos representan los pg/ml ± SEM de determinaciones realizadas por duplicado. **P*<0,05 ***P*<0,001 *vs* OVA. ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni. Representativo de tres experimentos con resultados similares.

En conjunto, estos resultados demuestran que U-Omp19 posee la capacidad de estimular la activación de DCs, aumentando la expresión de moléculas co-estimulatorias así como también la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Esta acción de U-Omp19 estaría contribuyendo a su capacidad adyuvante.

U-Omp19 actúa sobre la DC induciendo la activación de células T CD4$^+$ y T CD8$^+$

Resultados anteriores han demostrado que U-Omp19 es capaz de inducir la presentación cruzada de péptidos de OVA por DCs y promover eficientes respuestas TCD8$^+$ específicas (Figura 5). Se ha propuesto que el receptor de manosa contribuye a la internalización y el destino intracelular de OVA influyendo en su capacidad para ser presentada vía moléculas MHCI [190]. Entonces, decidimos extender nuestros resultados utilizando como Ags las proteínas quiméricas recombinantes GFP-OT [GFP-péptido SIINFEKL (257-264) restricto a MHCI y GFP-péptido ISQAVHAAHAEINEAGR (323-339) restricto a MHCII] [163]. Estas proteínas GFP-OT carecen de carbohidratos por lo cual su internalización es independiente de receptores de lectinas, familia de receptores a la cual pertenece el MR.

DCs purificadas mediante selección negativa de bazo y ganglios de ratones se incubaron con GFP-SIINFEKL (GFP-OTI) ó GFP-ISQAVHAAHAEINEAGR (GFP-OTII) y luego se co-incubaron con células T provenientes de ratones transgénicos OTI u OTII durante 18hs, posteriormente se analizó la producción intracelular de IFN-γ en las células transgénicas mediante citometría de flujo. Observamos que luego de la incubación de DCs con GFP-OTI+U-Omp19 aumenta el porcentaje de células T CD8$^+$ productoras de IFN-γ (5.05⁄) con respecto al grupo GFP-OTI solo (1.83⁄). Como era de esperar, el control positivo con LPS también aumentó la producción de IFN-γ (4.44⁄). En el caso de las células incubadas en presencia de GFP-OTI+Leupeptina se observa un menor porcentaje de células T CD8$^+$ productoras de IFN-γ (2.97⁄) respecto al observado con U-Omp19 **(Figura 24a)**. El hecho de que otro inhibidor de cistein proteasas como la leupeptina no sea tan eficiente para inducir la activación de las células TCD8$^+$ refuerza la idea de que la inhibición de la proteólisis del Ag por sí sola no es suficiente para explicar la acción adyuvante de U-Omp19.

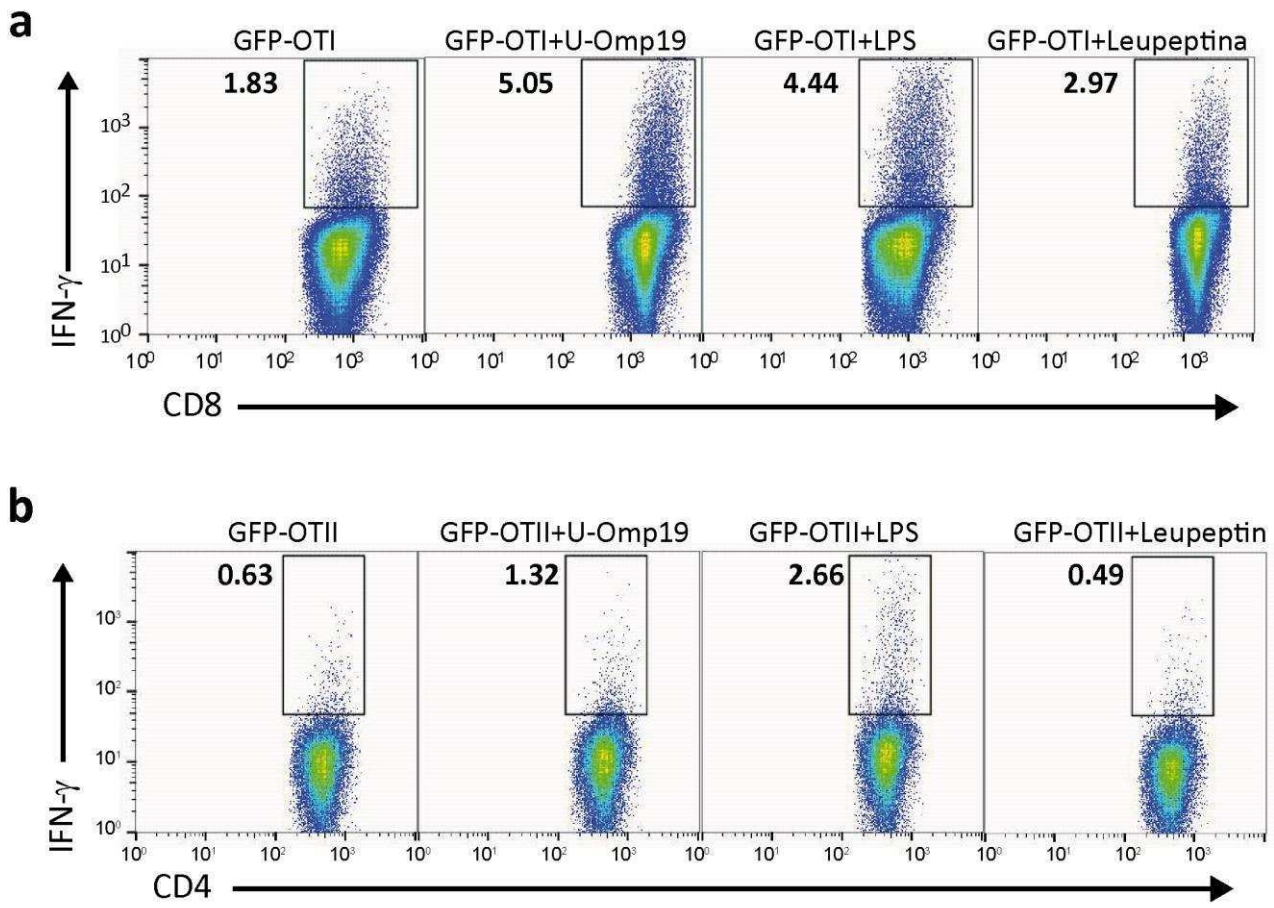

Figura 24. U-Omp19 promueve la activación de células T CD8$^+$ y CD4$^+$ especificas *in vitro*. DCs purificadas mediante selección negativa de ratones C57BL/6 fueron estimuladas con medio completo i) GFP-OTI o GFP-OTII, ii) (GFP OTI o GFP OTII) +U-Omp19, iii) (GFP-OTI o GFP-OTII) +LPS, iv) (GFP-OTI o GFP-OTII) +Leupeptina. Al día siguiente, las DCs se lavaron y se co-incubaron con células OTI u OTII por 18hs. Las células fueron marcadas con anti-CD8, fijadas, permeabilizadas y posteriormente marcadas con anti-IFN-γ o isotipo y se determinó el porcentaje de células CD8$^+$ productoras de IFN- γ. Los valores representan la frecuencia de células T CD8$^+$ (a) o T CD4$^+$ (b) que expresan IFN- γ restado su correspondiente control de isotipo. Los resultados son representativos de dos experimentos con similares resultados.

Asimismo, U-Omp19 fue capaz de inducir un mayor porcentaje de células T $CD4^+$ productoras de IFN-γ (1.32⁄) respecto de la estimulación sólo con GFPOTI (0.63⁄), lo que confirma su habilidad para estimular respuestas de tipo Th1 **(Figura 24b).** Las células $CD4^+$ colaboradoras son importantes para la generación de una eficiente respuesta inmune mediada por células T $CD8^+$. La co-administracion del Ag con Leupeptina induce un porcentaje de células T $CD4^+$ y productoras de IFN-γ similar a la estimulación con GFP-OTII sola, evidenciando la incapacidad de este inhibidor de estimular respuestas inmunes celulares T $CD4^+$.

Estos resultados, en consistencia con los presentados anteriormente nos sugieren que la acción de U-Omp19 sobre las DCs que resulta en la eficiente activación de células T se estaría llevando a cabo por un mecanismo que no solo implica la inhibición de las proteasas sino además por un efecto directo de U-Omp19 sobre las DCs. Este hecho se corrobora al observar que la co-administración del Ag con Leupeptina, que es un potente inhibidor de proteasas no tiene un efecto directo sobre la activacion de la DC (Figura 22 y 23) esto le impediría una apropiada inducción de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ productoras de IFN-γ.

A modo de resumen de los resultados hasta aquí expuestos al respecto de la acción de U-Omp19 sobre la DC realizamos la Ilustración 12.

Modelo de acción de U-Omp19 sobre DCs

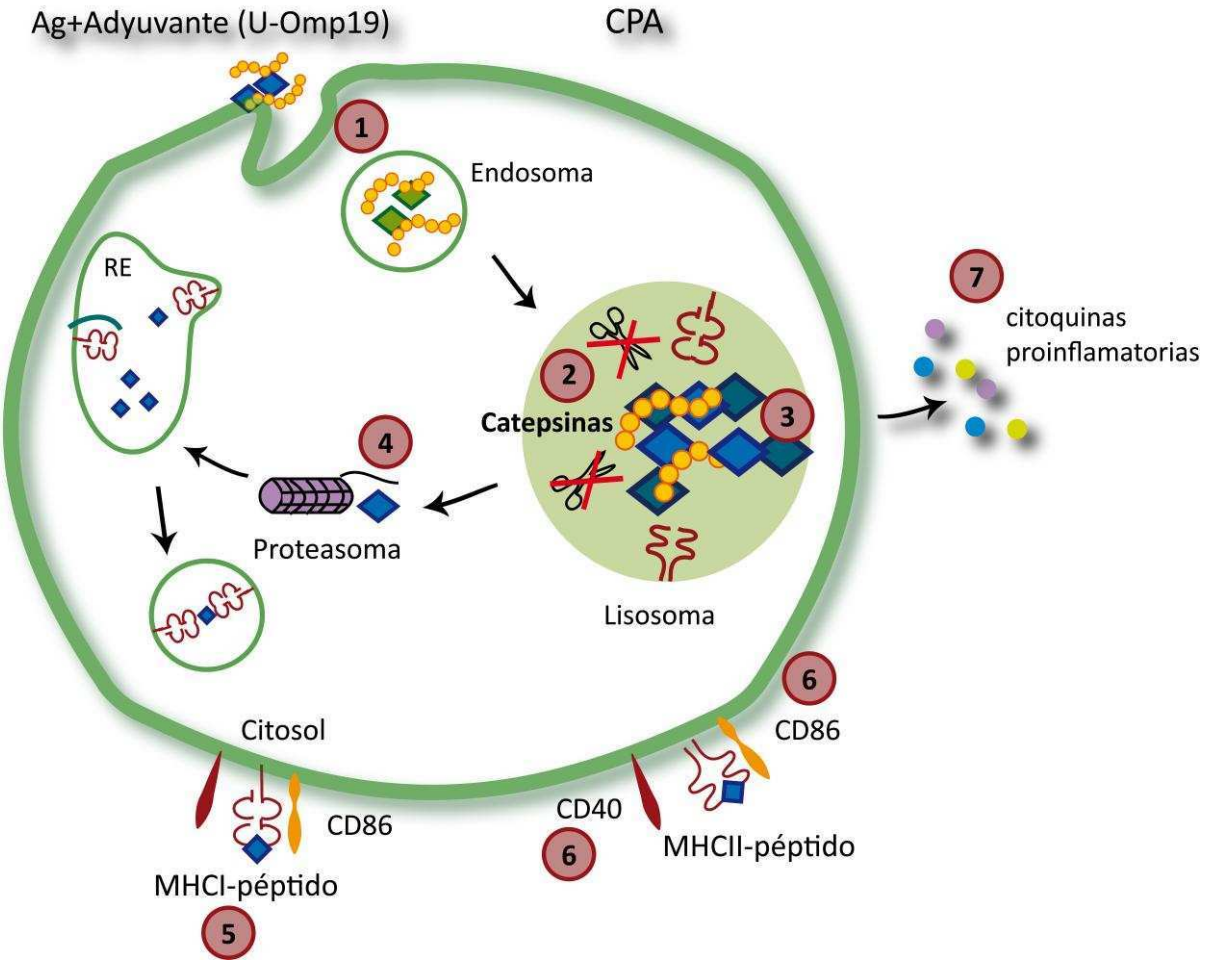

Ilustración 12. Resumen de los resultados obtenidos respecto de la acción de U-Omp19 sobre la DC. La co-administración de OVA con U-Omp19 como adyuvante: 1) no posee un efecto sobre la internalización del Ag, 2) U-Omp19 posee actividad como inhibidor de cistein protesas lisosomales reduciendo la degradación de Ags por la CPA, 3) aumenta la vida media del Ag creando un deposito antigénico dentro de compartimentos endosómicos Lamp-2 positivos, 4 y 5) aumenta la expresión de complejos MHCI-péptido en la superficie de la DC por un mecanismo proteasoma dependiente (afecta la vía citosólica de presentación cruzada de Ags exógenos). Por otro lado U-Omp19 induce la activación de DCs aumentando la expresión de moléculas co-estimulatorias (6) y el nivel de citoquinas pro-inflamatorias secretadas (7). Estos efectos de U-Omp19 sobre la DC explicarían su capacidad adyuvante sobre Ags co-administrados.

III. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DE U-OMP19 EN FORMULACIONES VACUNALES

La administración s.c. de U-Omp19 como adyuvante en una formulación vacunal aumenta la supervivencia de los animales luego del desafío con células tumorales.

En base a los resultados mostrados, U-Omp19 posee la capacidad de promover la presentación cruzada de Ags lo que lleva a la inducción de eficientes respuestas T $CD8^+$ antígeno específicas. Dado que uno de los mecanismos efectores de las células T $CD8^+$ es la citotoxicidad, y que la inducción de una efectiva respuesta CTL es requerida para la erradicación de tumores [191] decidimos evaluar si U-Omp19 tiene la capacidad de inducir respuestas antitumorales *in vivo*.

Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con OVA, OVA+U-Omp19, OVA+U-Omp19PK u OVA+CFA por vía s.c. al día 0, 7 y 14. Tres semanas después de la última inmunización los animales fueron desafiados con células tumorales crecidas en cultivo y se monitoreó la supervivencia de los animales. Las células tumorales utilizadas fueron de una línea celular de melanoma murino que expresa OVA (MO5).

Los ratones inmunizados con OVA en presencia de U-Omp19 presentaron un mayor porcentaje de supervivencia respecto del grupo de animales inmunizados con OVA sola ($P<0.05$ *vs* OVA). Al día 30, un 85% de los animales inmunizados con OVA+U-Omp19 sobrevivieron con respecto al 40% de los ratones inmunizados con OVA sin adyuvante **(Figura 25)**. La inmunización de OVA con CFA también aumentó la supervivencia de los animales ($P<0.05$ *vs* OVA). Mientras que el control inmunizado con U-Omp19PK induce un porcentaje de supervivencia similar al observado con la inmunización de OVA sola.

Estos resultados demuestran que la administración de U-Omp19 con el Ag por vía s.c. es capaz de inducir una respuesta CTL antitumoral duradera *in vivo*. Estos resultados nos permiten

proponer a U-Omp19 como un adyuvante plausible de ser incorporado en formulaciones vacunales contra tumores u otros patógenos que requieran este tipo de respuestas.

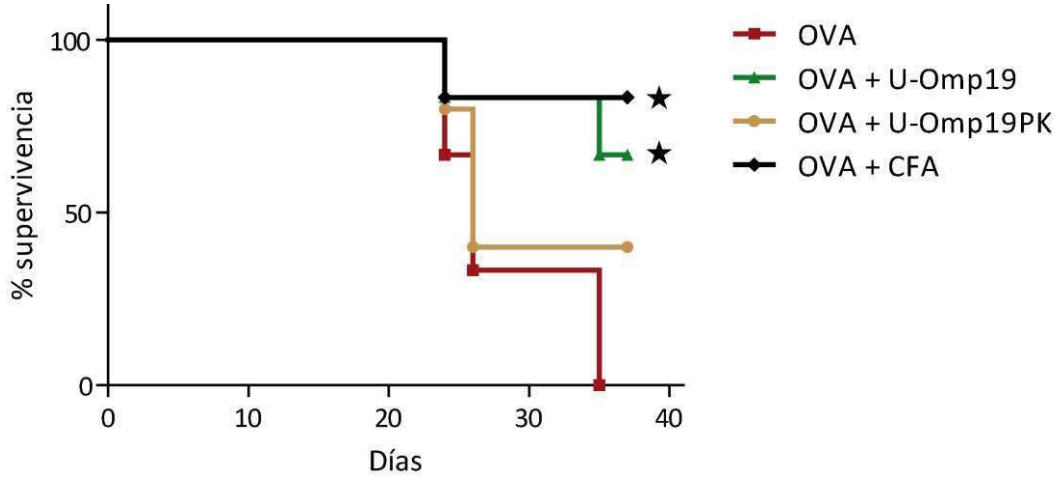

Figura 25. U-Omp19 aumenta la supervivencia de los animales luego del desafío con células tumorales. Ratones C57BL/6 (*n*/grupo=6) fueron inmunizados 3 veces cada 7 días por vía s.c. con i) OVA (60μg), ii) OVA (60μg)+U-Omp19 (100μg) u iii) OVA (60μg)+CFA (100μl). Tres semanas después de la última inmunización los animales fueron desafiados s.c. con $1x10^5$ células de melanoma murino que expresan OVA (MO5). Se monitoreó la supervivencia de los animales hasta el día 40 post inoculación de las células tumorales.*P<0.05 respecto el grupo OVA, log-rank test. Representativo de dos experimentos con resultados similares.

La administración s.c de U-Omp19 como adyuvante de una formulación vacunal induce protección frente al desafío con *Trypanosoma cruzi*

Finalmente, decidimos evaluar la capacidad adyuvante de U-Omp19 utilizando Ags microbianos "reales". *Trypanosoma cruzi* es un parasito protozoario flagelado y es el agente causante de la enfermedad de chagas. Se ha demostrado que la inducción de una respuesta de tipo Th1 es clave en la respuesta inmune protectora frente a la infección por *T. cruzi* [192, 193]. Basados en los resultados obtenidos en mi tesis de licenciatura junto con los mostrados en esta tesis que han demostrado que U-Omp19 es un potente adyuvante inductor de respuestas de

tipo Th1 decidimos evaluar la capacidad de U-Omp19 como adyuvante sobre un extracto crudo de Ags de *T. cruzi* en ratones luego de su co-administración por vía s.c.

Utilizamos un extracto crudo de formas epimastigotes del parásito (F105), este extracto contiene todos los Ags de *T. cruzi*. Ratones BALB/c fueron inmunizados en tres oportunidades por vía s.c con i) F105, ii) F105+U-Omp19 o iii) F105+IFA. Tres semanas luego de la última inmunización se desafió a los animales por vía intradermoplantar con $1x10^3$ parásitos de la cepa RA. Se registró el peso de los animales y la parasitemia en los animales el día 15 post infección y se monitoreo hasta el día 30 post infección la supervivencia de los ratones.

En los ratones inmunizados con F105+U-Omp19 se observa una menor pérdida de peso que los animales inmunizados con el extracto sin adyuvante durante los días 6 a 15 post infección (**Figura 26a,** $P<0.05$ *vs.* F105). Del mismo modo, la co-administración de U-Omp19 disminuye la cantidad de parásitos en sangre a los 15 días post infección (**Figura 26b,** $P<0.05$ *vs.* F105). Este resultado indica que la respuesta inmune inducida con U-Omp19 como adyuvante promueve la eliminación de los parásitos intracelulares.

Además, al analizar la sobrevida luego de la infección en los animales inmunizados observamos que la inmunización con F105+U-Omp19 induce una reducción significativa en la mortalidad de los animales en comparación con los animales inmunizados con F105 sin adyuvante (**Figura 26c**, $P<0.05$ *vs.* F105). Al día 21 todos los animales (*n*/grupo=7) de los grupos F105 y F105+IFA murieron mientras que 4 de 7 animales pertenecientes al grupo F105+U-Omp19 permanecían vivos a ese tiempo (57⁄ de sobrevida al día 21 post-infección).

Estos resultados indican que la co-administración de Ags de *T. cruzi* con U-Omp19 por vía s.c. fue capaz de inducir una respuesta inmune protectora *in vivo* ante el desafío con tripomastigotes virulentos y sugiere que U-Omp19 como adyuvante podría ser incluido en formulaciones vacunales contra agentes infecciosos en línea con los requerimientos actuales.

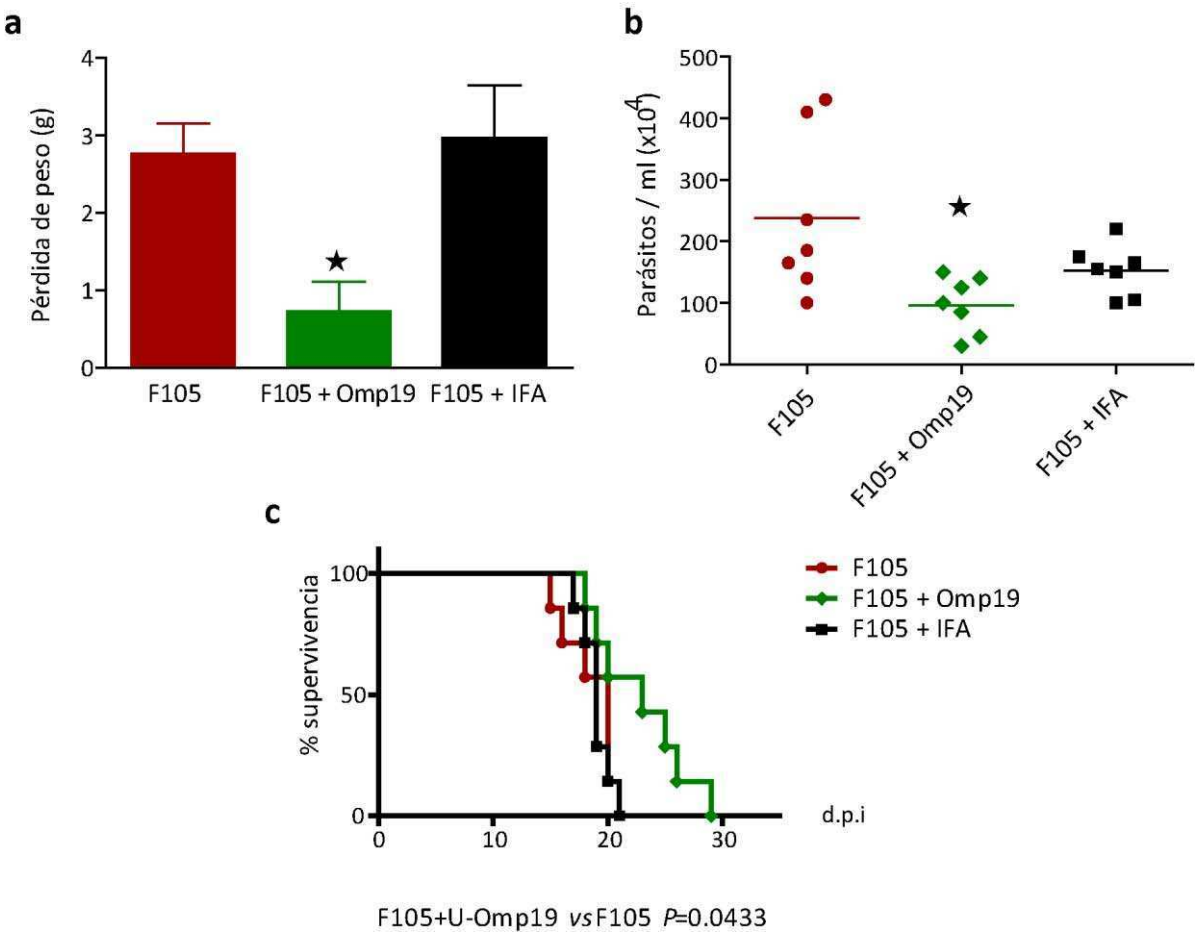

Figura 26. La co-administración s.c. de U-Omp19 con un extracto crudo de *Trypanozoma cruzi* induce protección frente al desafío con parásitos virulentos. Ratones BALB/c (n/grupo=7) fueron inmunizados 3 veces cada 7 días por vía s.c. con i) F150 (50μg), ii) F105 (50μg) +U-Omp19 (100μg) o iii) F105 (50μg) +IFA (100μl). Tres semanas después de la última inmunización los animales fueron desafiados por vía intradermoplantar con $1x10^3$ parásitos de la cepa RA. Se monitoreó la pérdida de peso **(a)**, parasitemia **(b)** y supervivencia **(c)** de los animales hasta el día 30 post infección. $^*P < 0.05$ *vs* grupo F105, ANOVA de una vía seguido del test Bonferroni para los gráficos a y b. P=0.0433, Chi cuadrado para el gráfico de ⁄ de supervivencia.

CONCLUSIONES GENERALES Y DISCUSION

Las nuevas vacunas recombinantes y sintéticas han surgido en el contexto de crear formulaciones de vacunas que sean más seguras que las vacunas tradicionales. Lamentablemente la mayoría de las proteínas o péptidos en ausencia de adyuvantes generan respuestas humorales y celulares muy débiles o inexistentes, por lo que es necesario que sean administradas en combinación con sustancias inmunoadyuvantes que sean capaces de incrementar y/o modular la inmunogenicidad intrínseca de los antígenos [127]. Los cambios en el tipo de componentes y vías de administración de las vacunas están imponiendo la necesidad de nuevos adyuvantes. En el presente, hay una mayor necesidad en el diseño de vacunas capaces de inducir fuertes respuestas inmunes celulares del tipo Th1, T $CD8^+$ y CTLs que puedan prevenir infecciones crónicas virales o infecciones relacionadas con patógenos intracelulares [165].

En mi Tesis de Licenciatura demostramos que U-Omp19 como adyuvante de OVA por vía s.c induce respuestas Th1 OVA-específicas. En esta tesis doctoral, demostramos que la administración de U-Omp19 por vía s.c. en ratones induce respuestas especificas de tipo T $CD8^+$ con producción de IFN-γ y CTLs tanto *in vitro* como *in vivo*. En este sentido, U-Omp19 constituye un promisorio adyuvante a ser incluido en formulaciones vacunales contra patógenos que requieran este tipo de respuestas para su eliminación. Con respecto a la respuesta humoral, resultados obtenidos en mi tesis de grado demostraron que la inmunización con U-Omp19 como adyuvante no parece tener un efecto significativo en la magnitud de la respuesta humoral (titulo de anticuerpos IgG producidos) pero si podría inducir un cambio en la relación del perfil de isotipos específicos inducidos (disminución en la relación de isotipos IgG1/IgG2a producidos) que coincide con la polarización de la respuesta inmune celular hacia el perfil Th1 evidenciada.

Generalmente, dependiendo del compuesto adyuvante utilizado, la respuesta T helper inducida se polarizará hacia un tipo determinado. Por ejemplo, adyuvantes como el MF59 y los ISCOMs, así como los ligandos de TLR5 estimulan respuestas humorales y celulares pero sin alterar el balance Th1/Th2 específico dado por el Ag. Mientras que se observan respuestas polarizadas hacia el perfil Th1 cuando se incorporan como adyuvantes vacunales ligandos de TLR3, TLR4, TLR7-8 y TLR9. En contraste, las sales de aluminio y las emulsiones aceite en agua inducen respuestas celulares de tipo Th2 fallando en la inducción de respuestas de tipo Th1 [194, 195]. Hasta el presente desconocemos si los efectos moduladores de la respuesta adaptativa de U-Omp19 están relacionados con la unión a un receptor de reconocimiento de patrones, lo que sabemos es que la inducción de respuestas Th1 contra ella misma continua observándose en animales TLR4 KO [133] lo que indicaría que su acción adyuvante también es independiente de este receptor. Estudios futuros con ratones KO para distintos RRPs o moléculas adaptadoras de la señal intracelular inducida por estos nos permitirán ahondar en este aspecto.

Indagando en los posibles mecanismos de acción de U-Omp19 y a partir de análisis de homología de secuencias descubrimos que esta proteína poseía alta homología con otros inhibidores de proteasas bacterianos y que pertenece a una familia de proteínas con actividad de inhibidores de proteasas alcalinas y metaloproteasas. Efectivamente, nuestro grupo ha demostrado previamente (Tesis doctoral de Andrés Ibáñez) su acción como inhibidor de serin proteasas presentes en el sistema gastrointestinal como la tripsina, α–quimotripsina, elastasa pancreática y aspartil proteasas como la pepsina y su acción adyuvante para OVA co-administrada por vía oral.

Se ha reportado que dos miembros de la familia de las serpinas (una familia de inhibidores de serin proteasas), los inhibidores SSCA y CrmA, poseen también una potente actividad inhibitoria sobre cistein catepsinas [196, 197]. También hay descriptos inhibidores de

proteasas bacterianos de amplio espectro como el de *Photorhabdus luminescens* [158]. Por ello, en esta Tesis decidimos abordar el estudio del rol de U-Omp19 como inhibidor de proteasas lisosomales. Es sabido que sin procesamiento antigénico no hay presentación a las células T e inducción de respuesta adaptativa pero se ha propuesto que la susceptibilidad de los antígenos proteicos a las proteasas lisosomales determina, en parte, su inmunogenicidad. Efectivamente, se ha demostrado que una limitada proteólisis lisosomal incrementa la inmunogenicidad de los antígenos *in vivo* [150, 154]. En consistencia con estos resultados, se ha observado que las DCs poseen una menor capacidad degradativa de los Ags en los compartimentos endosomales que los macrófagos [150]. Por lo tanto, esta habilidad de las DCs de impedir la degradación rápida de los antígenos internalizados contribuye a su singular capacidad para procesar y presentar Ags eficientemente.

En esta Tesis demostramos que efectivamente U-Omp19 es un inhibidor de cistein proteasas lisosomales y esta actividad le permite reducir la actividad proteolítica de microsomas derivados de CPAs. Del mismo modo, en ensayos de degradación *in vitro* con distintos Ags (OVA y caseína) U-Omp19 fue capaz de limitar parcialmente la proteólisis de los mismos por la CPA. Inclusive, observamos que se inhibe la actividad intracelular de una catepsina específica (catepsina L) en las CPAs luego de la co-administración de U-Omp19. Asimismo, pudimos comprobar que la co-administración de U-Omp19 induce un aumento en la cantidad intracelular del Ag y que este efecto no está relacionado con una mayor internalización del Ag ya que la co-incubación de U-Omp19 fue capaz de incrementar la cantidad de Ags proteicos (OVA, GFP) dentro de DCs pero no lo hace sobre Ags no proteicos (dextran) **(Ilustración 13)**. Estos hechos nos permiten razonar que una mayor disponibilidad de Ag dentro de la CPA como resultado de una limitada capacidad degradativa de las DCs, favorecería la diseminación del Ag a través del sistema inmune optimizando su presentación antigénica lo que se traduciría en el aumento de inmunogenicidad observado (Th1 y CTL) cuando utilizamos U-Omp19 como adyuvante **(Ilustración 13)**.

El hecho de que OVA soluble co-administrada con U-Omp19 sea eficientemente presentada a las células T $CD8^+$ por las DCs (ensayo *in vitro* de presentación antigénica) nos indica que existe un efecto directo de U-Omp19 sobre las DCs que favorece la presentación cruzada del Ag. Se ha reportado que la eficacia en la presentación cruzada de Ags exógenos por parte de las DCs está relacionada con la capacidad de los antígenos a escapar de la degradación lisosomal y ser exportados al citosol donde serán procesados por el proteasoma u otras proteasas citosólicas y de esta forma ser presentados vía MHCI a las células T $CD8^+$ [155, 156]. Efectivamente comprobamos que U-Omp19 incrementa la expresión en membrana de complejos MHCI-péptido que perduran en membrana por más tiempo y este efecto es dependiente del proteasoma. Entonces la co-administración de U-Omp19 prolonga la exposición del Ag al sistema inmune y aumenta la inmunogenicidad del mismo. Se han descripto adyuvantes que actúan estimulando la presentación cruzada de Ags por la DC, por ejemplo, el ISCOMATRIX es capaz de promover la presentación cruzada de Ags exógenos mediante la vía citosólica en las DCs al promover una rápida translocación de Ags al citosol [198]. Hasta el presente no hay trabajos que describan el uso de inhibidores de proteasas bacterianos como adyuvantes inmunes. Entonces, esta proteína es un patrón molecular bacteriano poco convencional no explorado.

Ha sido reportado que cistein proteasas como la papaína o la bromelaína cuando son co-administradas con OVA en animales, inducen la producción de anticuerpos IgE e IgG1 específicos para OVA e inducen respuestas de tipo Th2 anti-OVA con producción de IL-4 [199]. En contraste, U-Omp19 co-administrada con OVA estimula respuestas de tipo $TCD4^+$ productoras de IFN-γ (respuesta Th1 OVA específica). Estos hechos nos permiten hipotetizar que este tipo de proteasas podrían inducir algún tipo de señal que es percibida por el huésped como una señal de peligro que lo lleva a inducir respuestas de tipo Th2. U-Omp19 al inhibir la actividad de las proteasas podría estar inhibiendo esta señal permitiendo la inducción de una respuesta Th1 y de esta forma podría modular el perfil de la respuesta inmune celular. Para

evaluar esta hipótesis, en un futuro realizaremos experimentos *in vivo* inmunizando con OVA y papaína o bromelaína en presencia o ausencia de U-Omp19 y evaluaremos el perfil de la respuesta Th inducida.

Si bien la inhibición de la proteólisis puede favorecer en parte la inmunogenicidad del Ag optimizando su presentación por la CPA, la activación de las células T por parte de las DCs requiere de la percepción de dos señales. La primera, deviene del reconocimiento del péptido antigénico a través del TCR; la segunda, proviene del reconocimiento de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 y CD40) en la superficie de la DC. La percepción de la señal 1 en ausencia de la señal 2 conduce a la anergia de la célula T. Por lo tanto, la maduración de las DCs, evento que aumenta la expresión de moléculas co-estimuladoras y secreción de citoquinas pro-inflamatorias es clave para una apropiada activación de la célula T e inducción de la respuesta adaptativa. En este sentido, U-Omp19 es capaz de promover la maduración de DCs, incrementando la expresión de CD86 y CD40 y los niveles de IL-6, TNF-α e IL-1-β secretadas **(Ilustración 13)**. Asimismo, U-Omp19 es capaz de inducir respuestas inflamatorias promoviendo el reclutamiento de DCs y monocitos/macrófagos *in vivo*.

Por lo tanto, el hecho de que la co-administración con U-Omp19 sea capaz de generar potentes respuestas de tipo T $CD8^+$ Y CTLs puede ser explicada a partir de i) su capacidad inmunoestimulatoria sobre la DC y ii) su actividad inhibitoria sobre proteasas lisosomales que permitiría incrementar la vida media del Ag intracelular promoviendo la presentación cruzada de Ags por la CPA **(Ilustración 13)**.

Los inhibidores de proteasas han emergido como una poderosa clase de drogas terapéuticas [200]. Entre ellos encontramos a los inhibidores de la angiontensina convertasa (ACE), inhibidores de proteasas del HIV e inhibidores del proteasoma (Bortezomib) utilizados para tratar el mieloma múltiple. Las proteasas lisosomales han sido propuestas como blancos terapéuticos dado que juegan importantes roles en la regulación de una variedad de sistemas

biológicos [201]. En estos casos (donde los inhibidores de proteasas son utilizados como drogas) no se han observado respuestas inmunes, justamente la inducción de respuestas inmunes contra la formulación administrada sería muy contraproducente en el caso de una droga. La mayoría de los estudios sobre las propiedades inmunomodulatorias de inhibidores de proteasas se llevaron a cabo utilizando inhibidores eucariotas [199, 202] y algunos de origen viral, como también inhibidores de nemátodos [203], que en la mayoría de los casos presentaron perfiles inmuno-regulatorios y anti-inflamatorios. De hecho, nuestros resultados demostraron que un inhibidor de serin proteasas eucariota como la aprotinina o un inhibidor de cistein proteasas como leupeptina pueden inhibir la degradación de los Ags co-administrados pero no poseen la capacidad de inducir respuestas inmunes Th1 y T $CD8^+$, sugiriendo que la actividad de inhibidor de proteasas no es suficiente para inducir una respuesta adaptativa luego de la administración s.c.

Es importante destacar que en esta Tesis realizamos estudios cinéticos enzimáticos preliminares que demostraron que U-Omp19 es un inhibidor competitivo con actividad inhibitoria moderada sobre cistein proteasas en comparación con otros inhibidores proteicos endógenos (cistatinas) o exógenos específicos (Leupeptina, E-64) los cuales poseen constantes de disociación en el orden nM [204] mientras que U-Omp19 posee una Ki en el orden μM para la catepsina L (Ki=2μM). Sin embargo, se ha observado que estos potentes inhibidores de cistein y serin proteasas con Ki en el orden nM como la leupeptina o la pepstatina A no inducen respuestas inmunes celulares contra determinados Ags [205] por lo cual otra de nuestras hipótesis actuales es que una inhibición muy fuerte sobre el procesamiento antigénico evitaría una eficiente presentación antigénica. Justamente, el hecho de que U-Omp19 posea una Ki mayor a la de la mayoría de los inhibidores de cistein proteasas conocidos podría explicar que la acción inhibitoria de esta se correlacione con un aumento en la inmunogenicidad del Ag ya que permite una degradación sostenida en el tiempo sin que resulte en un freno en la presentación antigénica. A esto hay que sumarle el hecho de que U-Omp19 es un inhibidor de proteasas

bacteriano con propiedades inmunoestimulatorias, estas dos características le permitirían aumentar las respuestas inmunes adaptativas sobre los Ags co-administrados. Actualmente, nos encontramos diseñando proteínas U-Omp19 mutantes que carezcan de actividad como inhibidor de proteasas para poder evaluar el grado de contribución de este mecanismo a la acción adyuvante de la proteína.

El tipo de respuesta que se induce con U-Omp19 como adyuvante (Th1, T $CD8^+$ y CTL) nos llevó a evaluar la capacidad de esta proteína en formulaciones vacunales *in vivo* en modelos de enfermedades en los que se ha descripto la necesidad de este tipo de respuestas en la inducción de una respuesta inmune protectora. Es por esto, que evaluamos el rol de U-Omp19 como adyuvante de OVA en un modelo tumoral murino, en donde U-Omp19 fue capaz de inducir respuestas antitumorales *in vivo* aumentando la supervivencia de los animales ante el desafío con células tumorales de melanoma murino luego de su co-administración s.c. Si bien el CFA, un adyuvante muy potente conocido, también aumentó la supervivencia de los animales es importante mencionar que el CFA no podría ser incluido como adyuvante en una formulación vacunal para uso en humanos por los múltiples efectos adversos que presenta su administración (por ejemplo: inducción de granulomas y daño tisular provocado por una exacerbada respuesta inflamatoria local).

Por otro lado, también probamos la eficacia de U-Omp19 como adyuvante de Ags microbianos reales utilizando un extracto de *Trypanosoma cruzi*. Se ha reportado que los linfocitos T $CD4^+$ Th1 productores de IL-2 e IFN-γ que puedan estimular la expansión de linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos son centrales en la protección sistémica frente a la infección por *T. cruzi* ya que inhiben el desarrollo de las formas intracelulares del parásito. Las células T $CD8^+$ pueden actuar indirectamente secretando IFN-γ que inducirá activación de los macrófagos y directamente mediante su acción citotóxica [206]. Del mismo modo, las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ productoras de IFN-γ del bazo son las responsables de la eliminación de formas tripomastigotes

del parásito en sangre [207]. En este sentido, la co-administración de un extracto antigénico de *T. cruzi* con U-Omp19 como adyuvante fue capaz de disminuir la parasitemia y aumentar la supervivencia de ratones luego del desafío intradérmico con el parásito. Este resultado demuestra la capacidad de U-Omp19 para incrementar la respuesta inmune contra Ags microbianos reales en formulaciones vacunales. Es importante mencionar que la capacidad protectora de la formulación con U-Omp19 fue más efectiva que la formulación con el adyuvante IFA (Sigma-Aldrich).

En todos los estudios *in vivo* e *in vitro* de esta Tesis incluimos compuestos inmunoestimulatorios conocidos y muy potentes como el CFA, IFA y el LPS. Los resultados presentados demuestran que las respuestas inmunes celulares inducidas (Th1 y CTL) por U-Omp19 pueden ser comparables y en algunos casos mejores que las inducidas por estos adyuvantes pero la respuesta humoral (IgG) e inflamatoria observada en el tejido siempre fue mucho menor. Dado que hoy en día se están estudiando y utilizando múltiples combinaciones de adyuvantes en formulaciones vacunales para inducir todos los tipos de respuestas inmunes como es el caso de AS04 (ej: vacuna contra el HPV) que combina hidróxido de aluminio con MPL tenemos pensado en un futuro estudiar el efecto de combinaciones de distintos adyuvantes conocidos con U-Omp19 para tratar de encontrar combinaciones sinérgicas. También es importante destacar que en esta Tesis demostramos que U-Omp19 es capaz de inducir la producción de IFN-γ en las cepas C57BL/6 y BALB/c sugiriendo que U-Omp19 puede inducir una respuesta Th1 independientemente del contexto genético del huésped.

Otras consideraciones importantes que deben ser tenidas en cuenta en el desarrollo de adyuvantes están relacionadas con las caracteristicas que deben cumplir para que puedan ser finalmente incluidos en formulaciones vacunales. Las formulaciones óptimas deben ser seguras, estables, biodegradables, inertes y de bajos costos de producción. Por ello, es necesario que se establezcan procedimientos estandarizados en su manufactura y registro de lotes así como

también procedimientos analíticos para evaluar el producto final. Al mismo tiempo, se deben tener en cuenta los problemas con respecto a la utilización de compuestos derivados de animales, los cuales están ajustados a rigurosas regulaciones. Mejoras en la seguridad, tolerabilidad y potencia de las vacunas han llevado al desarrollo de una nueva generación de vacunas, las cuales si bien representan un avance en ciertos aspectos requieren procesos de producción muy demandantes y costosos [43].

Actualmente, los principales adyuvantes que han probado ser seguros y eficaces y han sido aprobados para su uso en vacunas humanas incluyen: el Alum, el MF59® (emulsión) y MPL® (agonista TLR-4). Sin embargo cada uno de estos compuestos poseen limitaciones, las cuales deben ser tenidas en cuenta en el desarrollo de una nueva generación de compuestos inmunoadyuvantes. El MF59 es una emulsión segura pero que ha demostrado eficacia parcial. Además, uno de sus componentes (escualeno) se obtiene del aceite de tiburón, un recurso no renovable con limitada capacidad de producción. De la misma forma, el MPL® es un efectivo adyuvante pero su producción implica un arduo proceso de fermentación y purificación que dificulta su producción a gran escala. A esto se le añade la compleja mezcla de componentes que posee el MPL lo cual complica y encarece la estandarización del producto. Las sales de aluminio, las cuales han probado ser altamente seguras, se alejan de la idealidad en términos de la inducción de una respuesta inmune restringida a un perfil humoral y Th2, fallando en la inducción de respuestas de tipo Th1 y CTLs necesarias para conferir protección contra muchas enfermedades para las cuales no existen vacunas eficaces [208].

En este sentido, U-Omp19 es una pequeña proteína bacteriana recombinante, soluble, de fácil expresión y purificación que podría ser producida a gran escala sin grandes dificultades. La purificación de la proteína se ha optimizado a la menor cantidad y duración de pasos. Es posible obtener hasta 40mg de proteína/litro de cultivo bacteriano con una alta pureza y reproducibilidad. No posee componentes animales ni aditivos químicos. Además, esta proteína ha demostrado ser estructuralmente estable y mantener su actividad como inhibidor de

proteasas a diferentes pH y temperaturas, lo que le permitirá prescindir de una cadena de refrigeración para su transporte o almacenamiento.

Desafortunadamente, una potente acción adyuvante está frecuentemente relacionada a un aumento en la toxicidad. Uno de los efectos adversos más comunes es la generación de reacciones locales como consecuencia de la formación del depósito en el lugar de inyección, el efecto "depot" es un mecanismo de acción de varios adyuvantes, entre los que se incluyen formulaciones tales como minerales, emulsiones oleosas, liposomas y microesferas de polímeros biodegradables [205]. En el caso de U-Omp19, es de destacar que no se observaron reacciones adversas visibles en el tejido inoculado en ninguno de los experimentos presentados en esta Tesis. Resultados obtenidos durante mi tesis de grado en conjunto con los obtenidos por otro estudiante de doctorado de nuestro grupo de trabajo han demostrado que esta proteína no induce cambios patológicos en el sitio de inyección ni en el tejido adyacente.

En conclusión, en esta tesis hemos demostrado que U-Omp19 de *Brucella* spp. posee dos actividades en una misma molécula: i) inhibe parcialmente la actividad proteolítica de las proteasas lisosomales en las CPAs, aumentando la vida media del Ag co-administrado y ii) tiene un efecto inmunoestimulatoria sobre las DCs promoviendo su activación. En conjunto, estas propiedades se traducen en la inducción de eficientes respuestas inmunes adaptativas de tipo Th1, T $CD8^+$ y CTLs Ag específicas. En base a estos resultados U-Omp19 podría ser utilizada como adyuvante de aquellas vacunas que requieran este tipo de respuestas inmunes en concordancia con los requerimientos actuales.

Nuestro trabajo incorpora un concepto original en el diseño racional de formulaciones vacunales presentando a U-Omp19 como una nueva molécula con características nunca antes descriptas, un inhibidor de proteasas con capacidad inmunoestimulatoria.

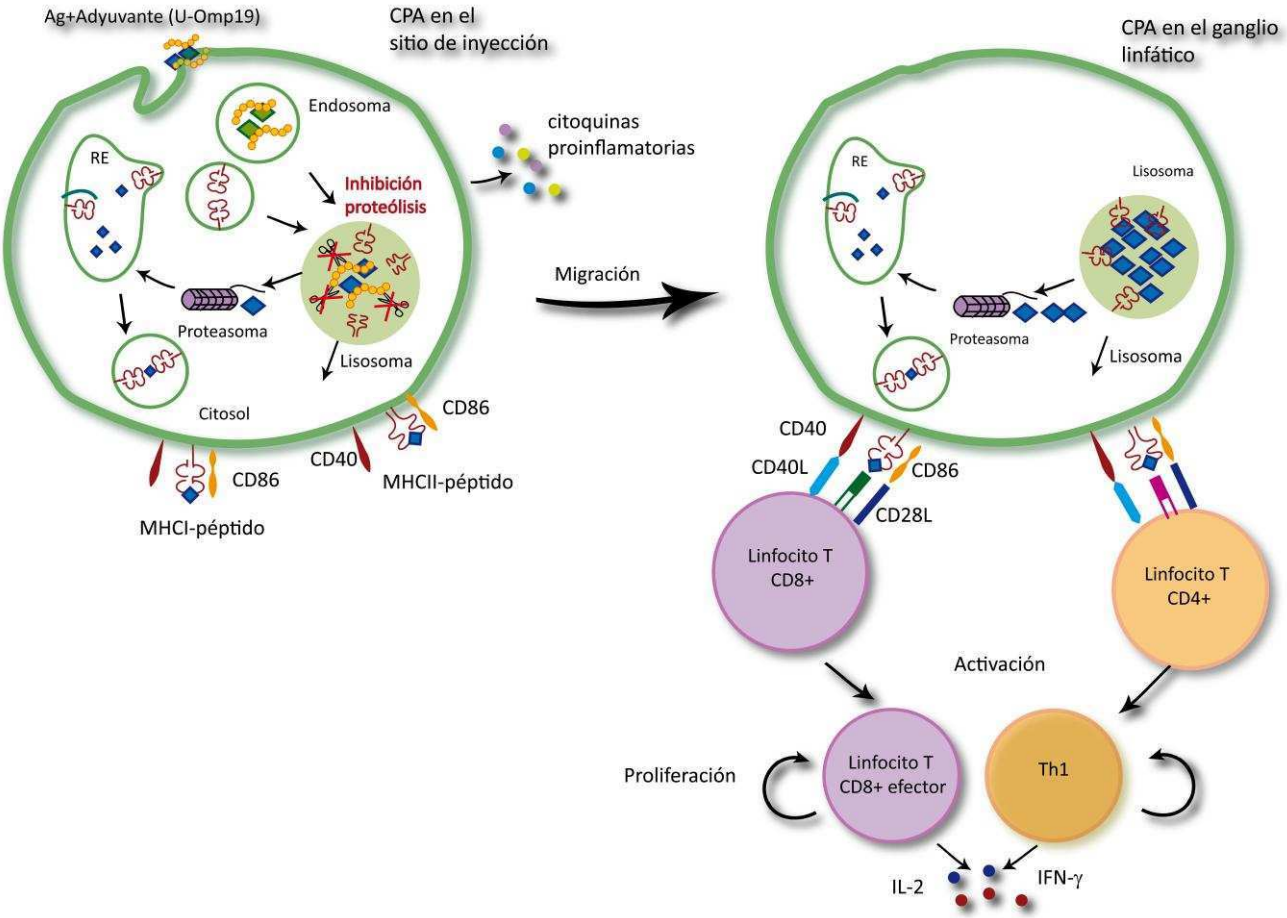

Ilustración 13. Modelo de acción de U-Omp19 como adyuvante. El antígeno con el adyuvante son internalizados en compartimentos endosómicos por la CPA presente en el sitio de inyección, estos compartimentos maduran acidificando su pH y convirtiéndose en lisosomas proteolíticamente activos. En el lisosoma, U-Omp19 inhibe parcialmente la actividad proteolítica de cistein proteasas limitando la degradación del Ag co-administrado y aumentando su vida media dentro de la CPA. De esta forma, se genera un depósito antigénico dentro de la CPA que permite, por un lado, una prolongada y eficiente presentación vía MHCII a las células T $CD4^+$ y por otro lado: aumenta la oportunidad de los Ags de escapar al citosol, ser degradados por el proteasoma y los péptidos resultantes ser translocados al RE donde se unirán a las moléculas MHCI para ser presentados a las células T $CD8^+$. Además, U-Omp19 posee propiedades inmunoestimulatorias que promueven la activación de las DCs, incrementando la expresión de moléculas co-estimulatorias (CD86 y CD40) y el nivel de citoquinas pro-inflamatorias secretadas. En conjunto, el aumento en la presentación antigénica y la activación de las DCs inducida por U-Omp19 como adyuvante permite la generación de potentes repuestas inmunes de tipo Th1 y T $CD8^+$ contra el Ag co-administrado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Anderson, M.R.M., *Infectious diseases of humans: Dynamics and control*, ed. O.U. Press. Vol. 15. 1991: Oxford. 169.
2. Bloom, B.R. and P.H. Lambert, *The vaccine book*. 2003, Amsterdam ; Boston: Academic Press. xxix, 436.
3. Rappuoli, R., *Bridging the knowledge gaps in vaccine design.* Nat Biotechnol, 2007. **25**(12): p. 1361-6.
4. Enserink, M., *Global public health. What's next for disease eradication?* Science, 2010. **330**(6012): p. 1736-9.
5. Ehreth, J., *The global value of vaccination.* Vaccine, 2003. **21**(7-8): p. 596-600.
6. Rappuoli, R., H.I. Miller, and S. Falkow, *Medicine. The intangible value of vaccination.* Science, 2002. **297**(5583): p. 937-9.
7. Nossal, G.J., *Vaccines of the future.* Vaccine, 2011. **29 Suppl 4**: p. D111-5.
8. Rappuoli, R. and A. Aderem, *A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria.* Nature, 2011. **473**(7348): p. 463-9.
9. Schijns, V.E. and W.G. Degen, *Vaccine immunopotentiators of the future.* Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(6): p. 750-5.
10. Rueckert, C. and C.A. Guzman, *Vaccines: from empirical development to rational design.* PLoS Pathog, 2011. **8**(11): p. e1003001.
11. Banchereau, J., et al., *Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2009. **1174**: p. 24-32.
12. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response.* Curr Opin Immunol, 1997. **9**(1): p. 4-9.
13. Foti, M., F. Granucci, and P. Ricciardi-Castagnoli, *A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses.* Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 650-4.
14. Guy, B., *The perfect mix: recent progress in adjuvant research.* Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(7): p. 505-17.
15. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
16. Mosmann, T.R. and S. Sad, *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.* Immunol Today, 1996. **17**(3): p. 138-46.
17. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*).* Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.
18. Belkaid, Y. and B.T. Rouse, *Natural regulatory T cells in infectious disease.* Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 353-60.
19. Jensen, P.E., *Recent advances in antigen processing and presentation.* Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1041-8.

20. Burgdorf, S. and C. Kurts, *Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation.* Current opinion in immunology, 2008. **20**: p. 89-95.
21. Bevan, M.J., *Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay.* J Exp Med, 1976. **143**(5): p. 1283-8.
22. Kurts, C., et al., *Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo.* J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 923-30.
23. Joffre, O.P., et al., *Cross-presentation by dendritic cells.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(8): p. 557-69.
24. Firat, E., et al., *The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation.* J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2241-8.
25. Saveanu, L., et al., *IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation.* Science, 2009. **325**(5937): p. 213-7.
26. Kovacsovics-Bankowski, M. and K.L. Rock, *A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules.* Science, 1995. **267**(5195): p. 243-6.
27. Guermonprez, P., et al., *ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells.* Nature, 2003. **425**(6956): p. 397-402.
28. Burgdorf, S., et al., *Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation.* Nature immunology, 2008. **9**: p. 558-66.
29. Rock, K.L. and L. Shen, *Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance.* Immunol Rev, 2005. **207**: p. 166-83.
30. Shen, L., et al., *Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo.* Immunity, 2004. **21**(2): p. 155-65.
31. den Haan, J.M. and M.J. Bevan, *Antigen presentation to CD8+ T cells: cross-priming in infectious diseases.* Curr Opin Immunol, 2001. **13**(4): p. 437-41.
32. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance.* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 126-34.
33. Jung, S., et al., *In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens.* Immunity, 2002. **17**(2): p. 211-20.
34. den Haan, J.M., S.M. Lehar, and M.J. Bevan, *CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo.* J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1685-96.
35. del Rio, M.L., et al., *CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells.* J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6861-6.
36. Bedoui, S., et al., *Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells.* Nat Immunol, 2009. **10**(5): p. 488-95.
37. Poulin, L.F., et al., *Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells.* J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1261-71.
38. Titball, R.W., *Vaccines against intracellular bacterial pathogens.* Drug Discov Today, 2008. **13**(13-14): p. 596-600.

39. Sutter RW, K.O., and Cochi, SL *Poliovirus Vaccine—Live*. Vaccines ed. O.W. Plotkin SA. Vol. 4th Edition. 2004, Philadelphia: W.B. Saunders Company. Chapter 25.
40. Cell, C.D.T., et al., *Regulatory T Cells Increase the Avidity and Promote Memory.* 2012. **338**: p. 532-536.
41. Moyle, P.M., et al., *Mucosal immunisation: adjuvants and delivery systems.* Curr Drug Deliv, 2004. **1**(4): p. 385-96.
42. Kretsinger, K., et al., *Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adults: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and recommendation of ACIP, supported by the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), for use of Tdap among health-care personnel.* MMWR Recomm Rep, 2006. **55**(RR-17): p. 1-37.
43. Ulmer, J.B., U. Valley, and R. Rappuoli, *Vaccine manufacturing: challenges and solutions.* Nat Biotechnol, 2006. **24**(11): p. 1377-83.
44. Pulendran, B. and R. Ahmed, *Immunological mechanisms of vaccination.* Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 509-17.
45. Demento, S.L., et al., *Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines.* Trends Biotechnol, 2011. **29**(6): p. 294-306.
46. Purcell, A.W., J. McCluskey, and J. Rossjohn, *More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design.* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(5): p. 404-14.
47. Rappuoli, R. and A. Covacci, *Reverse vaccinology and genomics.* Science, 2003. **302**(5645): p. 602.
48. Mora, M., et al., *Reverse vaccinology.* Drug Discov Today, 2003. **8**(10): p. 459-64.
49. Beernink, P.T., et al., *Meningococcal factor H-binding protein variants expressed by epidemic capsular group A, W-135, and X strains from Africa.* J Infect Dis, 2009. **199**(9): p. 1360-8.
50. Bagnoli, F., et al., *Designing the next generation of vaccines for global public health.* Omics, 2011. **15**(9): p. 545-66.
51. Sette, A. and R. Rappuoli, *Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics.* Immunity, 2010. **33**(4): p. 530-41.
52. Brave, A., et al., *Vaccine delivery methods using viral vectors.* Mol Pharm, 2007. **4**(1): p. 18-32.
53. Caminschi, I. and K. Shortman, *Boosting antibody responses by targeting antigens to dendritic cells.* Trends Immunol, 2012. **33**(2): p. 71-7.
54. Flynn, B.J., et al., *Immunization with HIV Gag targeted to dendritic cells followed by recombinant New York vaccinia virus induces robust T-cell immunity in nonhuman primates.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(17): p. 7131-6.
55. Oyston, P. and K. Robinson, *The current challenges for vaccine development.* J Med Microbiol, 2012. **61**(Pt 7): p. 889-94.
56. Nograles, K.E., et al., *IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells.* J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(6): p. 1244-52 e2.

57. Reed, S.G., et al., *New horizons in adjuvants for vaccine development.* Trends Immunol, 2009. **30**(1): p. 23-32.
58. Harandi, A.M., G. Davies, and O.F. Olesen, *Vaccine adjuvants: scientific challenges and strategic initiatives.* Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(3): p. 293-8.
59. O'Hagan, D.T. and E. De Gregorio, *The path to a successful vaccine adjuvant--'the long and winding road'.* Drug Discov Today, 2009. **14**(11-12): p. 541-51.
60. Singh, M. and D. O'Hagan, *Advances in vaccine adjuvants.* Nat Biotechnol, 1999. **17**(11): p. 1075-81.
61. Awate, S., L.a. Babiuk, and G. Mutwiri, *Mechanisms of Action of Adjuvants.* Frontiers in Immunology, 2013. **4**: p. 1-10.
62. Shirodkar, S., et al., *Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines.* Pharm Res, 1990. **7**(12): p. 1282-8.
63. Cox, J.C. and A.R. Coulter, *Adjuvants--a classification and review of their modes of action.* Vaccine, 1997. **15**(3): p. 248-56.
64. Sharp, F.A., et al., *Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(3): p. 870-5.
65. Pulendran, B. and R. Ahmed, *Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development.* Cell, 2006. **124**(4): p. 849-63.
66. Petrovsky, N. and J.C. Aguilar, *Vaccine adjuvants: current state and future trends.* Immunol Cell Biol, 2004. **82**(5): p. 488-96.
67. Brunner, R., E. Jensen-Jarolim, and I. Pali-Scholl, *The ABC of clinical and experimental adjuvants--a brief overview.* Immunol Lett, 2010. **128**(1): p. 29-35.
68. HogenEsch, H., *Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants.* Vaccine, 2002. **20 Suppl 3**: p. S34-9.
69. De Gregorio, E., E. Tritto, and R. Rappuoli, *Alum adjuvanticity: unraveling a century old mystery.* Eur J Immunol, 2008. **38**(8): p. 2068-71.
70. Hutchison, S., et al., *Antigen depot is not required for alum adjuvanticity.* Faseb J, 2012. **26**(3): p. 1272-9.
71. Romero Mendez, I.Z., et al., *Potentiation of the immune response to non-adsorbed antigens by aluminum-containing adjuvants.* Vaccine, 2007. **25**(5): p. 825-33.
72. Kool, M., et al., *Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells.* J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 869-82.
73. Sokolovska, A., S.L. Hem, and H. HogenEsch, *Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants.* Vaccine, 2007. **25**(23): p. 4575-85.
74. Eisenbarth, S.C., et al., *Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants.* Nature, 2008. **453**(7198): p. 1122-6.
75. Franchi, L. and G. Nunez, *The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity.* Eur J Immunol, 2008. **38**(8): p. 2085-9.

76. Marrack, P., A.S. McKee, and M.W. Munks, *Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(4): p. 287-93.
77. McKee, A.S., et al., *Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity.* J Immunol, 2009. **183**(7): p. 4403-14.
78. Spreafico, R., P. Ricciardi-Castagnoli, and A. Mortellaro, *The controversial relationship between NLRP3, alum, danger signals and the next-generation adjuvants.* Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 638-42.
79. Brewer, J.M., *(How) do aluminium adjuvants work?* Immunol Lett, 2006. **102**(1): p. 10-5.
80. Tindle, R.W., et al., *A "public" T-helper epitope of the E7 transforming protein of human papillomavirus 16 provides cognate help for several E7 B-cell epitopes from cervical cancer-associated human papillomavirus genotypes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5887-91.
81. Oscherwitz, J., et al., *Low-dose intraperitoneal Freund's adjuvant: toxicity and immunogenicity in mice using an immunogen targeting amyloid-beta peptide.* Vaccine, 2006. **24**(15): p. 3018-25.
82. Graham, B.S., et al., *Immunization with cocktail of HIV-derived peptides in montanide ISA-51 is immunogenic, but causes sterile abscesses and unacceptable reactogenicity.* PLoS One, 2010. **5**(8): p. e11995.
83. Audran, R., et al., *Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen.* Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8017-26.
84. O'Hagan, D.T., et al., *The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation.* Vaccine, 2012. **30**(29): p. 4341-8.
85. Garcon, N., D.W. Vaughn, and A.M. Didierlaurent, *Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing alpha-tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion.* Expert Rev Vaccines, 2012. **11**(3): p. 349-66.
86. O'Hagan, D.T., A. Wack, and A. Podda, *MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant for flu vaccines in humans: what did we learn during its development?* Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(6): p. 740-4.
87. Roman, F., et al., *Immunogenicity and safety in adults of one dose of influenza A H1N1v 2009 vaccine formulated with and without AS03A-adjuvant: preliminary report of an observer-blind, randomised trial.* Vaccine, 2010. **28**(7): p. 1740-5.
88. Skwarczynski, M. and I. Toth, *Peptide-based subunit nanovaccines.* Curr Drug Deliv, 2012. **8**(3): p. 282-9.
89. Lambert, J.S., et al., *A Phase I safety and immunogenicity trial of UBI microparticulate monovalent HIV-1 MN oral peptide immunogen with parenteral boost in HIV-1 seronegative human subjects.* Vaccine, 2001. **19**(23-24): p. 3033-42.
90. Boas, U. and P.M. Heegaard, *Dendrimers in drug research.* Chem Soc Rev, 2004. **33**(1): p. 43-63.
91. Zaman, M., et al., *Self-adjuvanting polyacrylic nanoparticulate delivery system for group A streptococcus (GAS) vaccine.* Nanomedicine, 2011. **7**(2): p. 168-73.

92. Giddam, A.K., et al., *Liposome-based delivery system for vaccine candidates: constructing an effective formulation.* Nanomedicine (Lond), 2012. **7**(12): p. 1877-93.
93. Lincopan, N., et al., *Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: Preparation, characterization and activity in vivo.* Vaccine, 2009. **27**(42): p. 5760-71.
94. Schwendener, R.A., et al., *Liposome-based vaccines.* Methods Mol Biol, 2010. **605**: p. 163-75.
95. Ohno, S., et al., *Synthetic peptides coupled to the surface of liposomes effectively induce SARS coronavirus-specific cytotoxic T lymphocytes and viral clearance in HLA-A*0201 transgenic mice.* Vaccine, 2009. **27**(29): p. 3912-20.
96. Brgles, M., et al., *Liposome fusogenicity and entrapment efficiency of antigen determine the Th1/Th2 bias of antigen-specific immune response.* Vaccine, 2009. **27**(40): p. 5435-42.
97. Thomann, J.S., et al., *Antitumor activity of liposomal ErbB2/HER2 epitope peptide-based vaccine constructs incorporating TLR agonists and mannose receptor targeting.* Biomaterials, 2011. **32**(20): p. 4574-83.
98. Korsholm, K.S., et al., *T-helper 1 and T-helper 2 adjuvants induce distinct differences in the magnitude, quality and kinetics of the early inflammatory response at the site of injection.* Immunology, 2011. **129**(1): p. 75-86.
99. Toft, L., et al., *Comparison of the Immunogenicity and Reactogenicity of Cervarix(R) and Gardasil(R) Human Papillomavirus Vaccines in HIV-infected Adults: A Randomized, Double-Blind, Clinical Trial.* J Infect Dis, 2013.
100. Liu, T.Y., et al., *Advances in peptide-based human papillomavirus therapeutic vaccines.* Curr Top Med Chem, 2012. **12**(14): p. 1581-92.
101. Roldao, A., et al., *Virus-like particles in vaccine development.* Expert Rev Vaccines, 2010. **9**(10): p. 1149-76.
102. Bungener, L., et al., *Virosome-mediated delivery of protein antigens in vivo: efficient induction of class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte activity.* Vaccine, 2005. **23**(10): p. 1232-41.
103. Azmi, F., et al., *Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines.* Hum Vaccin Immunother, 2013. **10**(3).
104. Kensil, C.R., J.Y. Wu, and S. Soltysik, *Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21.* Pharm Biotechnol, 1995. **6**: p. 525-41.
105. Marciani, D.J., et al., *Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity.* Vaccine, 2000. **18**(27): p. 3141-51.
106. Marciani, D.J., et al., *Altered immunomodulating and toxicological properties of degraded Quillaja saponaria Molina saponins.* Int Immunopharmacol, 2001. **1**(4): p. 813-8.
107. Maraskovsky, E., et al., *Development of prophylactic and therapeutic vaccines using the ISCOMATRIX adjuvant.* Immunol Cell Biol, 2009. **87**(5): p. 371-6.
108. Wilson, N.S., et al., *ISCOMATRIX vaccines mediate CD8+ T-cell cross-priming by a MyD88-dependent signaling pathway.* Immunol Cell Biol, 2012. **90**(5): p. 540-52.

109. Davis, I.D., et al., *Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10697-702.

110. McGuinness, D.H., P.K. Dehal, and R.J. Pleass, *Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites.* Trends Parasitol, 2003. **19**(7): p. 312-9.

111. Agrawal, S., et al., *Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos.* J Immunol, 2003. **171**(10): p. 4984-9.

112. Baldridge, J.R., et al., *Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents.* Expert Opin Biol Ther, 2004. **4**(7): p. 1129-38.

113. Baldridge, J.R. and R.T. Crane, *Monophosphoryl lipid A (MPL) formulations for the next generation of vaccines.* Methods, 1999. **19**(1): p. 103-7.

114. Garcon, N., P. Chomez, and M. Van Mechelen, *GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives.* Expert Rev Vaccines, 2007. **6**(5): p. 723-39.

115. Schwarz, T.F., *Clinical update of the AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 cervical cancer vaccine, Cervarix.* Adv Ther, 2009. **26**(11): p. 983-98.

116. Didierlaurent, A.M., et al., *AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity.* J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6186-97.

117. Baldwin, S.L., et al., *Enhanced humoral and Type 1 cellular immune responses with Fluzone adjuvanted with a synthetic TLR4 agonist formulated in an emulsion.* Vaccine, 2009. **27**(43): p. 5956-63.

118. Mizel, S.B. and J.T. Bates, *Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential.* J Immunol, 2010. **185**(10): p. 5677-82.

119. Nempont, C., et al., *Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity.* J Immunol, 2008. **181**(3): p. 2036-43.

120. Flores-Langarica, A., et al., *Systemic flagellin immunization stimulates mucosal CD103+ dendritic cells and drives Foxp3+ regulatory T cell and IgA responses in the mesenteric lymph node.* J Immunol, 2012. **189**(12): p. 5745-54.

121. Dougan, G. and C. Hormaeche, *How bacteria and their products provide clues to vaccine and adjuvant development.* Vaccine, 2006. **24 Suppl 2**: p. S2-13-9.

122. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptors as adjuvant receptors.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1589**(1): p. 1-13.

123. Brown, L.E. and D.C. Jackson, *Lipid-based self-adjuvanting vaccines.* Curr Drug Deliv, 2005. **2**(4): p. 383-93.

124. Hirschfeld, M., et al., *Cutting edge: inflammatory signaling by Borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2.* J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2382-6.

125. Giambartolomei, G.H., et al., *Induction of pro- and anti-inflammatory cytokines by Borrelia burgdorferi lipoproteins in monocytes is mediated by CD14.* Infect Immun, 1999. **67**(1): p. 140-7.
126. Sieling, P.A. and R.L. Modlin, *Activation of toll-like receptors by microbial lipoproteins.* Scand J Infect Dis, 2001. **33**(2): p. 97-100.
127. Mondino, A., A. Khoruts, and M.K. Jenkins, *The anatomy of T-cell activation and tolerance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2245-52.
128. Jeannin, P., et al., *Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies.* Vaccine, 2002. **20 Suppl 4**: p. A23-7.
129. Massari, P., et al., *The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity.* Trends Microbiol, 2003. **11**(2): p. 87-93.
130. Fusco, P.C., et al., *Preclinical studies on a recombinant group B meningococcal porin as a carrier for a novel Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine.* Vaccine, 1998. **16**(19): p. 1842-9.
131. Livingston, P.O., et al., *GD3/proteosome vaccines induce consistent IgM antibodies against the ganglioside GD3.* Vaccine, 1993. **11**(12): p. 1199-204.
132. Pasquevich, K.A., et al., *Immunization with recombinant Brucella species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against Brucella abortus infection.* Infect Immun, 2009. **77**(1): p. 436-45.
133. Pasquevich, K.A., et al., *An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against B. abortus mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice.* PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16203.
134. Ko, J. and G.A. Splitter, *Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans.* Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(1): p. 65-78.
135. Letoffe, S., P. Delepelaire, and C. Wandersman, *Characterization of a protein inhibitor of extracellular proteases produced by Erwinia chrysanthemi.* Mol Microbiol, 1989. **3**(1): p. 79-86.
136. Baumann, U., et al., *Crystal structure of a complex between Serratia marcescens metallo-protease and an inhibitor from Erwinia chrysanthemi.* J Mol Biol, 1995. **248**(3): p. 653-61.
137. Colbert, J.D., et al., *Diverse regulatory roles for lysosomal proteases in the immune response.* European journal of immunology, 2009. **39**: p. 2955-65.
138. Turk, V., B. Turk, and D. Turk, *Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities.* Embo J, 2001. **20**(17): p. 4629-33.
139. Rossi, A., et al., *Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome.* Biol Chem, 2004. **385**(5): p. 363-72.
140. Villadangos, J.A., et al., *Proteases involved in MHC class II antigen presentation.* Immunol Rev, 1999. **172**: p. 109-20.
141. Nakagawa, T.Y. and A.Y. Rudensky, *The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation.* Immunol Rev, 1999. **172**: p. 121-9.
142. Salvesen, G.S., *A lysosomal protease enters the death scene.* J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 21-2.

143. Reinheckel, T., et al., *Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L.* Biol Chem, 2001. **382**(5): p. 735-41.

144. Twining, S.S., *Regulation of proteolytic activity in tissues.* Crit Rev Biochem Mol Biol, 1994. **29**(5): p. 315-83.

145. Turk, B., D. Turk, and G.S. Salvesen, *Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators.* Curr Pharm Des, 2002. **8**(18): p. 1623-37.

146. Zavasnik-Bergant, T. and B. Turk, *Cysteine proteases: destruction ability versus immunomodulation capacity in immune cells.* Biol Chem, 2007. **388**(11): p. 1141-9.

147. Pierre, P. and I. Mellman, *Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells.* Cell, 1998. **93**(7): p. 1135-45.

148. Chapman, H.a., *Endosomal proteases in antigen presentation.* Current opinion in immunology, 2006. **18**: p. 78-84.

149. Villadangos, J.A., P. Schnorrer, and N.S. Wilson, *Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces.* Immunol Rev, 2005. **207**: p. 191-205.

150. Delamarre, L., et al., *Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate.* Science, 2005. **307**(5715): p. 1630-4.

151. Hotta, C., et al., *The delivery of an antigen from the endocytic compartment into the cytosol for cross-presentation is restricted to early immature dendritic cells.* Immunology, 2006. **117**(1): p. 97-107.

152. Savina, A., et al., *NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells.* Cell, 2006. **126**(1): p. 205-18.

153. Mantegazza, A.R., et al., *NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells.* Blood, 2008. **112**(12): p. 4712-22.

154. Delamarre, L., et al., *Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis.* J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2049-55.

155. Wolkers, M.C., et al., *Antigen bias in T cell cross-priming.* Science, 2004. **304**(5675): p. 1314-7.

156. Norbury, C.C., et al., *CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates.* Science, 2004. **304**(5675): p. 1318-21.

157. Lev, A., et al., *The exception that reinforces the rule: crosspriming by cytosolic peptides that escape degradation.* Immunity, 2008. **28**(6): p. 787-98.

158. Wee, K.E., C.R. Yonan, and F.N. Chang, *A new broad-spectrum protease inhibitor from the entomopathogenic bacterium Photorhabdus luminescens.* Microbiology, 2000. **146 Pt 12**: p. 3141-7.

159. Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity.* Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 17-58.

160. Giambartolomei, G.H., et al., *Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed Brucella abortus.* J Immunol, 2004. **173**(7): p. 4635-42.

161. Malley, R., et al., *Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide.* Infect Immun, 2006. **74**(4): p. 2187-95.

162. Jones, L.J., et al., *Quenched BODIPY dye-labeled casein substrates for the assay of protease activity by direct fluorescence measurement.* Anal Biochem, 1997. **251**(2): p. 144-52.

163. Drutman, S.B. and E.S. Trombetta, *Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo.* J Immunol, 2010. **185**(4): p. 2140-6.

164. Segura, E.L., et al., *Antigens of the subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. II. Flagellar and membrane fraction.* J Protozool, 1977. **24**(4): p. 540-3.

165. Seder, R.A. and A.V. Hill, *Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity.* Nature, 2000. **406**(6797): p. 793-8.

166. Harmala, L.A., et al., *The adjuvant effects of Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 result from the rapid and prolonged activation of antigen-specific CD8+ T cells in vivo.* J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5622-9.

167. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines.* Cell, 2001. **106**(3): p. 255-8.

168. Galkina, E., et al., *L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes.* J Exp Med, 2003. **198**(9): p. 1323-35.

169. Rubio, V., et al., *Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells.* Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1377-82.

170. Betts, M.R. and R.A. Koup, *Detection of T-cell degranulation: CD107a and b.* Methods Cell Biol, 2004. **75**: p. 497-512.

171. Betts, M.R., et al., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation.* J Immunol Methods, 2003. **281**(1-2): p. 65-78.

172. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism.* Biochim Biophys Acta, 2005. **1751**(2): p. 119-39.

173. Rothe, G., et al., *Flow cytometric analysis of protease activities in vital cells.* Biol Chem Hoppe Seyler, 1992. **373**(7): p. 547-54.

174. Mason, R.W., S. Gal, and M.M. Gottesman, *The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L.* Biochem J, 1987. **248**(2): p. 449-54.

175. Robker, R.L., et al., *Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4689-94.

176. Collette, J., et al., *Biosynthesis and alternate targeting of the lysosomal cysteine protease cathepsin L.* Int Rev Cytol, 2004. **241**: p. 1-51.

177. Trombetta, E.S., et al., *Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation.* Science, 2003. **299**(5611): p. 1400-3.

178. Crespo, M.I., et al., *TLR7 triggering with polyuridylic acid promotes cross-presentation in CD8alpha+ conventional dendritic cells by enhancing antigen preservation and MHC class I antigen permanence on the dendritic cell surface.* J Immunol, 2013. **190**(3): p. 948-60.

179. Ghimire, T.R., et al., *Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro.* Immunol Lett, 2012. **147**(1-2): p. 55-62.

180. Burgdorf, S., et al., *Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation.* Science (New York, N.Y.), 2007. **316**: p. 612-6.

181. Porgador, A., et al., *Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody.* Immunity, 1997. **6**(6): p. 715-26.

182. Pooley, J.L., W.R. Heath, and K. Shortman, *Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells.* J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5327-30.

183. Shortman, K. and W.R. Heath, *The CD8+ dendritic cell subset.* Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 18-31.

184. Dresch, C., et al., *Development of antigen cross-presentation capacity in dendritic cells.* Trends Immunol, 2012. **33**(8): p. 381-8.

185. Reis e Sousa, C., *Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity.* Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 21-5.

186. Shah, J.A., et al., *Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against Leishmania major in mice.* J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 281-91.

187. De Smedt, T., et al., *Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo.* J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1413-24.

188. De Becker, G., et al., *The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells.* Int Immunol, 2000. **12**(6): p. 807-15.

189. Pasquevich, K.A., et al., *The protein moiety of Brucella abortus outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis.* J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5200-12.

190. Burgdorf, S., V. Lukacs-Kornek, and C. Kurts, *The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation.* J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6770-6.

191. Yong, X., et al., *Strategies for enhancing vaccine-induced CTL antitumor immune responses.* J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 605045.

192. Gazzinelli, R.T., et al., *The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta.* Eur J Immunol, 1992. **22**(10): p. 2501-6.

193. Munoz-Fernandez, M.A., M.A. Fernandez, and M. Fresno, *Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular*

Trypanosoma cruzi through a nitric oxide-dependent mechanism. Eur J Immunol, 1992. **22**(2): p. 301-7.

194. Coffman, R.L., A. Sher, and R.A. Seder, *Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work.* Immunity, 2010. **33**(4): p. 492-503.
195. Reed, S.G., M.T. Orr, and C.B. Fox, *Key roles of adjuvants in modern vaccines.* Nat Med, 2013. **19**(12): p. 1597-608.
196. Takeda, A., et al., *Squamous cell carcinoma antigen is a potent inhibitor of cysteine proteinase cathepsin L.* FEBS Lett, 1995. **359**(1): p. 78-80.
197. Tesch, L.D., et al., *Specificity and reactive loop length requirements for crmA inhibition of serine proteases.* Protein Sci, 2005. **14**(2): p. 533-42.
198. Schnurr, M., et al., *ISCOMATRIX adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II.* J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1253-9.
199. Bird, P.I., J.A. Trapani, and J.A. Villadangos, *Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(12): p. 871-82.
200. Leung, D., G. Abbenante, and D.P. Fairlie, *Protease inhibitors: current status and future prospects.* J Med Chem, 2000. **43**(3): p. 305-41.
201. Reiser, J., B. Adair, and T. Reinheckel, *Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease.* J Clin Invest, 2010. **120**(10): p. 3421-31.
202. Sallenave, J.M., *Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(6): p. 635-43.
203. Lucas, A., et al., *The serpin saga; development of a new class of virus derived anti-inflammatory protein immunotherapeutics.* Adv Exp Med Biol, 2009. **666**: p. 132-56.
204. Turk, V., et al., *Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1824**(1): p. 68-88.
205. Syme, R.M., et al., *Phagocytosis and protein processing are required for presentation of Cryptococcus neoformans mitogen to T lymphocytes.* Infect Immun, 2000. **68**(11): p. 6147-53.
206. de Alencar, B.C., et al., *Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, Trypanosoma cruzi, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination.* Infect Immun, 2009. **77**(10): p. 4383-95.
207. Sardinha, L.R., et al., *The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypomastigotes in Trypanosoma cruzi chronically infected mice.* PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(1): p. e578.
208. Dubensky, T.W., Jr. and S.G. Reed, *Adjuvants for cancer vaccines.* Semin Immunol 2010. **22**(3): p. 155-61.