

Tesis Doctoral

Optimización de un esquema de inmunización de mucosas frente al HIV basado en la combinación de los vectores ADN y del virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) (ADN/MVA): ADN-IL-12 junto con la subunidad B de la toxina colérica (CTB) cooperan en el incremento de la respuesta celular a nivel sistémico y de la mucosa del tracto genital

Maeto, Cynthia Alejandra

2015-04-20

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:

Maeto, Cynthia Alejandra. (2015-04-20). Optimización de un esquema de inmunización de mucosas frente al HIV basado en la combinación de los vectores ADN y del virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) (ADN/MVA): ADN-IL-12 junto con la subunidad B de la toxina colérica (CTB) cooperan en el incremento de la respuesta celular a nivel sistémico y de la mucosa del tracto genital. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Maeto, Cynthia Alejandra. "Optimización de un esquema de inmunización de mucosas frente al HIV basado en la combinación de los vectores ADN y del virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) (ADN/MVA): ADN-IL-12 junto con la subunidad B de la toxina colérica (CTB) cooperan en el incremento de la respuesta celular a nivel sistémico y de la mucosa del tracto genital". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-04-20.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Optimización de un esquema de inmunización de mucosas frente al HIV basado en la combinación de los vectores ADN y del virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) (ADN/MVA): ADN-IL-12 junto con la subunidad B de la toxina colérica (CTB) cooperan en el incremento de la respuesta celular a nivel sistémico y de la mucosa del tracto genital.

Tesis presentada para optar por el título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Cynthia Alejandra Maeto

Directora de tesis: Dra. María Magdalena Gherardi

Consejera de estudios: Dra. Laura Edith Alché

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2015

Optimización de un esquema de inmunización de mucosas frente al HIV basado en la combinación de los vectores ADN y del virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) (ADN/MVA): ADN-IL-12 junto con la subunidad B de la toxina colérica (CTB) cooperan en el incremento de la respuesta celular a nivel sistémico y de la mucosa del tracto genital.

Un desafío importante para el desarrollo de vacunas frente a infecciones adquiridas por vía de mucosas es poder inducir una respuesta inmune local, con el fin de evitar la diseminación del patógeno al resto del organismo. Actualmente, el esquema de inmunización utilizado ampliamente en ensayos clínicos para HIV, y otros patógenos para los cuales se requiere inducir una respuesta inmune celular específica, es el denominado “*prime-boost*” que consiste en la utilización de distintos vectores vacunales durante la inmunización tales como los vectores de ADN recombinantes y aquellos basados en el virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA).

En este trabajo de tesis doctoral se utilizó un esquema *ADN-prime/MVA-boost* por ruta de mucosas, donde ambos vectores expresan la glicoproteína de envoltura de HIV y se analizó el efecto adyuvante de ADN-IL-12 con la subunidad B de la toxina colérica (CTB) en ratones BALB/c con el fin de potenciar la respuesta inmune específica frente al HIV a nivel sistémico y de la mucosa del tracto genital. Los resultados obtenidos demostraron que esta combinación de adyuvantes mejoró la respuesta inmune celular no sólo a nivel sistémico, sino también en ganglios drenantes de la mucosa genito-rectal, y más importante aún, en el tracto genital, observándose un incremento en la magnitud, amplitud y calidad de la respuesta.

En conclusión, la combinación de los adyuvantes ADN-IL-12 + CTB podría ser potencialmente utilizada como adyuvantes de mucosas en vacunas ADN/MVA, no sólo para antígenos de HIV sino también para otras enfermedades infecciosas con impacto en mucosas.

Palabras claves: Vacunas - Inmunidad de mucosas - HIV - ADN/MVA - Respuesta inmune celular

Mucosal immunization scheme optimization against HIV based on the DNA and Modified Vaccinia Ankara (MVA) virus combination (DNA/MVA): DNA-IL-12 plus cholera toxin B subunit (CTB) contribute to enhancing cellular systemic and mucosal genital tract response.

An important challenge to develop a vaccine against mucosal infections is inducing a local immune response to prevent the pathogen dissemination to the rest of the organism. Nowadays, the immunization scheme used currently in clinical trials for HIV and other pathogens for which the induction of a specific cellular immune response is needed, is the so called “prime-boost”. It consists in the application of different vaccine vectors during the immunization, such as DNA vectors and Modified Vaccinia Ankara (MVA) virus vectors.

In this thesis, we applied a DNA-prime/MVA-boost scheme by mucosal route which both vectors express the HIV envelope glycoprotein. We analyzed the adjuvant effect from DNA-IL-12 with the cholera toxin B (CTB) in BALB/c mice to enhance the systemic and mucosal genital tract specific immune response against HIV. The results showed that this adjuvant combination improved the cellular immune response not only at systemic level, but also in the genito-rectal draining lymph nodes and more important, in the genital tract, enhancing the magnitude, amplitude and quality of HIV-specific response.

In conclusion, the combination of DNA-IL-12 + CTB could be potentially used as mucosal adjuvants in a DNA/MVA vaccine not only for HIV antigen but also for other infectious diseases that impact mucosal tissues.

Keywords: Vaccine - Mucosal immunity - HIV - DNA/MVA - Cellular immune response

Quiero agradecer a todas las personas que me acompañaron durante estos 5 años.

A toda mi familia, que siempre estuvo apoyándome no sólo durante estos últimos años, sino que siempre estuvieron conmigo.

A Magda, quien me tuvo mucha paciencia, me enseñó y formó para que yo pueda terminar mi tesis doctoral.

A mi grupo de investigación: Pía, Juli y Ana. Sin ellas, los largos días de trabajo hubieran sido más largos todavía. Siempre predispuestas a ayudarnos unas a otras y haciendo que de gusto trabajar así.

A las chicas de la oficina, más que compañeras de oficina... Amigas. Acá incluyo al resto de las chicas que, si bien no están en mi oficina, compartimos salidas y cenas.

A todos los del instituto, a quienes me cruzo en los pasillos, oficinas, y laboratorios. Ellos son parte del día a día. Por las charlas, almuerzos, mates...

A Nanu, con quien comparto, no sólo el trabajo de estos últimos 5 años, sino también muchos años en la facultad. Gracias a ella, hoy llegué hasta acá.

Por último, a Adrián, quien siempre está conmigo bancándome diariamente y quien hace que todo sea más fácil.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	- 8 -
ABREVIATURAS	- 10 -
INTRODUCCIÓN	- 14 -
1. El virus del HIV/SIDA	- 15 -
1.1. Inicios del HIV/SIDA	- 15 -
1.2. Epidemiología	- 16 -
1.3. Estructura, genoma y ciclo de replicación del virus	- 17 -
1.4. Variabilidad genética del HIV	- 19 -
1.5. Historia natural de la infección	- 20 -
2. Transmisión del HIV	- 22 -
2.1. Rutas de transmisión	- 22 -
2.2. Transmisión sexual del HIV: Modelo de infección cérvico-vaginal.....	- 24 -
2.3. Métodos para prevenir la transmisión del HIV	- 26 -
3. En búsqueda de una vacuna contra HIV	- 27 -
3.1. Ensayos clínicos: Situación actual en el desarrollo de una vacuna.	- 27 -
3.2. Diseño racional de vacunas para HIV	- 29 -
3.3. Sistema inmune de mucosas: Conceptos generales.....	- 30 -
3.3.1. Inmunidad de mucosas contra HIV	- 32 -
3.4. La importancia de inducir una respuesta celular T-CD8 en vacunas de HIV.....	- 34 -
3.5. Esquema de inmunización “ <i>Prime-boost</i> ”: Sistema de administración del antígeno	- 34 -
3.5.1. Vectores de ADN	- 36 -
3.5.2. Vectores poxvirus	- 37 -
3.5.2.1. MVA (Virus Vaccinia Ankara Modificado).....	- 39 -
3.5.3. Estrategia <i>prime-boost</i> por ruta de mucosas	- 40 -
3.6. Selección de antígenos y rutas de inoculación	- 40 -
3.7. Aplicación de adyuvantes de mucosas	- 42 -
3.7.1. Interleuquina 12	- 43 -
3.7.2. Subunidad B de la toxina colérica	- 43 -

OBJETIVOS	- 45 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 48 -
1. Reactivos Biológicos	- 49 -
1.1. Líneas celulares	- 49 -
1.2. Virus	- 49 -
1.3. Vectores de ADN	- 49 -
2. Preparación de los stocks de vectores	- 50 -
2.1. Vectores ADN	- 50 -
2.1.1. Obtención de ADN plasmídico	- 50 -
2.1.2. Transfección de células con ADN plasmídico	- 50 -
2.1.3. Control de expresión a partir de los vectores ADN	- 51 -
2.1.3.1. Interleuquina IL-12 murina	- 51 -
2.1.3.2. Proteína gp-120 de HIV	- 51 -
2.2. Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA)	- 51 -
2.2.1. Infección de células	- 51 -
2.2.2. Generación de stock viral	- 52 -
2.2.3. Purificación del stock viral para inmunizar	- 52 -
2.2.4. Titulación por inmunotinción	- 52 -
2.2.5. Control de expresión de la proteína recombinante a partir de MVA-EnvB	- 53 -
3. Inmunizaciones y manejo de animales	- 53 -
3.1. Ratones y manejo de animales	- 53 -
3.2. Inmunización intranasal	- 54 -
3.3. Esquema de Inmunización	- 54 -
3.4. Toma de muestras	- 55 -
3.4.1. Suero	- 56 -
3.4.2. Lavados vaginales	- 56 -
3.4.3. Bazos: Obtención de esplenocitos	- 56 -
3.4.4. Ganglios cervicales e ilíacos: Obtención de linfocitos	- 57 -
3.4.5. Tracto genital	- 57 -
4. Técnicas Inmunológicas	- 58 -
4.1. Western Blot	- 58 -
4.2. Estímulos para evaluar respuesta inmune	- 58 -

4.2.1. Péptidos	- 58 -
4.2.2. Proteína	- 59 -
4.3. ELISPOT: Cuantificación de células T específicas secretoras de IFN- γ o IL-2	- 59 -
4.3.1. Ensayo de avidéz	- 60 -
4.4. Titulación de anticuerpos por ELISA.....	- 61 -
4.5. Análisis de la respuesta inmune celular mediante técnicas de citometría de flujo.	- 61 -
4.5.1. Cuantificación de la producción de citoquinas mediante el CBA kit.....	- 61 -
4.5.2. Ensayo simultáneo de marcación intracelular de citoquinas y actividad citotóxica.	- 62 -
4.5.3. Evaluación de proliferación celular específica mediante tinción con CFSE.....	- 63 -
4.5.4. Caracterización de las poblaciones celulares T de memoria	- 63 -
4.5.5. Evaluación de citotoxicidad <i>in vivo</i>	- 64 -
5. Análisis de los Datos.....	- 64 -
RESULTADOS.....	- 66 -
Parte I: Caracterización y control de los vectores de inmunización.....	- 67 -
1. Vectores de ADN	- 67 -
1.1. Descripción de los plásmidos utilizados.....	- 67 -
1.2. Control de la integridad de los vectores de ADN.....	- 68 -
1.3. Verificación de la expresión de IL-12 murina a partir de ADN-IL-12.....	- 69 -
1.4. Verificación de la expresión de la glicoproteína de envoltura gp-120 (EnvB) a partir de ADN-EnvB.....	- 70 -
2. Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA)	- 70 -
2.1. Descripción del vector MVA utilizado.....	- 70 -
2.2. Purificación y titulación del <i>stock</i> viral para inmunizar.....	- 71 -
2.3. Verificación de la correcta expresión de la glicoproteína de envoltura gp-160 a partir de MVA-EnvB.....	- 72 -
Parte II: Inmunización intranasal con ADN/MVA junto con los adyuvantes ADN-IL-12 y CTB: efecto de la dosis y del uso combinado para seleccionar el esquema óptimo de inmunización.....	- 73 -
1. IL-12 administrada desde un vector ADN (ADN-IL-12) posee un efecto adyuvante al ser administrado por ruta de mucosa intranasal	- 73 -
2. ADN-IL-12 junto con CTB cooperan en la inducción de una respuesta inmune celular de mayor magnitud frente a un antígeno de HIV-1, tras la inmunización intranasal.....	- 74 -
3. La incorporación de ADN-IL-12 y CTB también induce mayor respuesta inmune humoral específica en comparación con el grupo inmunizado en ausencia de adyuvantes	- 79 -

Parte III. Caracterización de la respuesta celular inducida mediante la inmunización ADN/MVA con los adyuvantes ADN-IL-12 (50 µg) + CTB: estudio de la amplitud y calidad de la respuesta. - 84 -

1. La co-administración intranasal de ADN-IL-12 y CTB en inmunizaciones ADN/MVA mejora la magnitud de la respuesta inmune celular específica (a nivel de IFN-γ e IL-2) en la mucosa de tracto genital..... - 84 -

2. Las mejoras generadas en la respuesta celular T debido a la administración de ADN-IL-12 junto con CTB fueron mantenidas durante la fase de memoria de la respuesta. - 86 -

3. Análisis del perfil funcional celular T luego de la inmunización ADN/MVA con ADN-IL-12 + CTB: Incrementos en la capacidad citotóxica y en la amplitud de las citoquinas producidas. - 88 -

4. En la fase de memoria, la inmunización con ADN-IL-12 + CTB modula el patrón de secreción de citoquinas. - 95 -

5. Evaluación de la reactividad cruzada: El reconocimiento de péptidos heterólogos es mayor en el grupo inmunizado con los adyuvantes IL-12₅₀+CTB..... - 96 -

6. Mejoras en la avidéz funcional celular T tanto en fase aguda como de memoria en el grupo IL-12₅₀+CTB. - 99 -

7. El potencial proliferativo de las células T es superior en el grupo inmunizado con IL-12 + CTB...- 101 -

8. Sub-poblaciones de linfocitos T de memoria: Aumento de células T con fenotipos de estadios tempranos de diferenciación luego de la inmunización con ADN-IL-12 (50 µg) + CTB..... - 103 -

9. Ensayo de citotoxicidad *in vivo*: La aplicación de ADN-IL-12 + CTB generó un incremento en la actividad citotóxica *in vivo*. - 105 -

DISCUSIÓN..... - 109 -

CONCLUSIONES..... - 130 -

BIBLIOGRAFÍA..... - 132 -

ANEXO..... - 143 -

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Introducción

Figura 1 - Estructura de la partícula viral del HIV

Figura 2 - Genes del HIV-1 y productos génicos

Figura 3 - Historia natural de la infección por HIV

Figura 4 - Modelo de infección cérvico-vaginal de HIV

Figura 5 - Rutas de inmunización de mucosas y compartimentalización de las funciones efectoras

Figura 6 - Ciclo de replicación del virus Vaccinia

Materiales y Métodos

Figura 7 - Esquema de inmunización y toma de muestras

Resultados – Parte I

Figura 8 - Esquema de los vectores de ADN utilizados

Figura 9 - Control de la integridad de los plásmidos por electroforesis en gel de agarosa

Figura 10 - Expresión de IL-12 murina en sobrenadantes de cultivos de células transfectadas con ADN-IL-12

Figura 11 - Expresión de EnvB a partir de ADN-EnvB por Western Blot

Figura 12 - Esquema del gen recombinante *envB* de HIV inserto en el locus viral *tk* (timidina kinasa)

Figura 13 - Foto representativa de una inmunotinción

Figura 14 - Expresión de EnvB a partir de MVA-EnvB por Western Blot

Resultados – Parte II

Figura 15 - Evaluación del efecto adyuvante de ADN-IL-12 luego de la inmunización intranasal ADN/MVA frente al antígeno de HIV

Figura 16 - Respuesta celular inmune inducida por la co-administración de adyuvantes de mucosas en un esquema de inmunización intranasal ADN/MVA frente al antígeno de HIV

Figura 17 - Respuesta inmune humoral específica sistémica frente a la proteína gp-120 de ratones inmunizados con los adyuvantes de mucosas

Figura 18 - Respuesta inmune humoral específica en mucosas frente a la proteína gp-120 de ratones inmunizados con los adyuvantes de mucosas

Resultados – Parte III

Figura 19 - Análisis de la respuesta inmune celular específica en mucosa genital a los 10 días de la inmunización del grupo sin adyuvantes y el grupo ADN-IL-12 (50 µg) + CTB

Figura 20 - Cuantificación de células secretoras de IFN-γ y de IL-2 a los 30 y 53 días de la inmunización con MVA

Figura 21 - Esquema de la estrategia de *gating* utilizada para el estudio de polifuncionalidad por citometría de flujo

Figura 22 - Modulación de la respuesta celular T en su capacidad citotóxica y el patrón de producción de citoquinas en bazo

Figura 23 - Modulación de la respuesta celular T en su capacidad citotóxica y el patrón de producción de citoquinas en mucosa genital

Figura 24 - Patrón de secreción de diferentes citoquinas en la fase de memoria

Figura 25 - Evaluación de la calidad de la respuesta celular T mediante el análisis de la reactividad cruzada frente a péptidos de Env de otros subtipos de HIV

Figura 26 - Estudio de la avidéz funcional de células T en muestras de bazo

Figura 27 - Potencial proliferativo de células de bazo

Figura 28 - Caracterización de las subpoblaciones celulares T de memoria inducida luego de la inmunización

Figura 29 - Actividad citotóxica específica de células T *in vivo*

TABLAS

Introducción

Tabla 1 - Reporte Global ONUSIDA, Julio 2014.

Tabla 2 - Ruta de transmisión y riesgos de infección para HIV

Tabla 3 - Ensayos clínicos de vacunas contra HIV en fase III realizados.

Tabla 4 - Ensayos clínicos de vacunas HIV en fase II que se están llevando a cabo en la actualidad

Resultados – Parte II

Tabla 5 - Esquemas de inmunización intranasal ADN/MVA: Efecto de ADN-IL-12

Tabla 6 - Esquemas de inmunización intranasal

ABREVIATURAS

1fx: Monofuncional

2fx: Bifuncional

3fx: Trifuncional

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AMPr: Resistencia a ampicilina

APC: Aloficocianina (*Allophycocyanin*)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BALT: Tejido linfoide asociado al árbol bronquial (*bronchus-associated lymphoid tissue*)

BCG: Bacillus de Calmette y Guérin

C: Constante

CALT: Tejido linfoide asociado a la conjuntiva (*conjunctiva-associated lymphoid tissue*)

CD: Cluster de Diferenciación (*Cluster of Differentiation*)

CEV: Virus envuelto asociado a células (*cell-associated enveloped virus*)

CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CMV: Citomegalovirus

ConA: Concanavalina A

CPA: Célula presentadora de antígeno

CRF: Formas recombinantes circulantes (*Circulating Recombinant Forms*)

CS IFN- γ /IL2: Células secretoras de IFN- γ /IL-2

CT: Toxina colérica (*cholera toxin*)

CTA: Subunidad A de la toxina colérica

CTB: Subunidad B de la toxina colérica

CTL: Linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (*Cytotoxic CD8+ T Lymphocytes*)

CVA: Chorioallantois vaccinia virus Ankara

DAB: 3.3-diaminobenzidina tetrahydrochloride

DALT: Tejido linfóide asociado al conducto salival (*salivary duct-associated lymphoid tissue*)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DS₅₀: Dosis sensibilizante

EEV: Virus extracelular envuelto (*extracellular enveloped virus*)

ESN: Expuestos seronegativos

ETS: Enfermedad de transmisión sexual

FEPs: Fibroblastos de embrión de pollo

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate*).

GALT: Tejido linfóide asociado al intestino (*gut-associated lymphoid tissue*)

GC Ganglios cervicales

GI: Ganglios ilíacos

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HBV: Virus de la hepatitis B

HIV/VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HLA: Antígenos leucocitarios humanos (*Human Leukocyte Antigen*).

HPV: Virus del papiloma humano

HRP: Peroxidasa de Rabanito (*horseradish peroxidase*)

HSH: Hombres que tienen sexo con hombres

HSV: Virus del herpes simple

HSV: Virus del herpes simple (*Herpes simplex virus*)

HTLV: Virus linfotrópico humano (*Human T Lymphotropic Virus*)

IEV: Virus intracelular envuelto (*intracellular enveloped virus*)

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulinas

IL: Interleuquina

IMV: Virus maduro intracelular (*intracellular mature virus*)

LALT: Tejido linfóide asociado a la laringe (*larynx-associated lymphoid tissue*)

LDALT: Tejido linfóide asociado al conducto lacrimal (*lacrimal duct-associated lymphoid tissue*)

LPS: Lipopolisacárido

MALT: Tejido linfóide asociado a mucosas (*Mucosal associated lymphoid tissue*)

MHC I/II: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y II

MOI: Multiplicidad de infección (*Multiplicity of Infection*)

MVA: Vaccinia Ankara Modificado (*Modified Vaccinia Ankara*)

NALT: Tejido linfóide asociado al tracto nasofaríngeo (*Nasopharynx associated lymphoid tissue*)

NK: *Natural killer*

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS: Solución tamponada de fosfatos (*Phosphate Buffer Saline*)

PBS-T: Solución tamponada de fosfatos (*Phosphate Buffer Saline*) con 0,05% de Tween-20

PE: Ficoeritrina (*Phycoerythrin*).

PerCP: Proteína pteridinclorofila (*Peridinin Chlorophyll Protein*)

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato

PTE: Epítopes celulares T potenciales

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SD: Desvío estándar (*standard deviation*)

SDS: Dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

SICM: Sistema Inmune Común de Mucosas

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SIV: Virus de la inmunodeficiencia de simios (*Simian Immunodeficiency Virus*)

SPF: Libres de patógenos específicos (*Specific pathogen free*)

TBS-T: Solución de Tris (*Tris Buffered Saline*) con 0,05% Tween-20

TCR: Receptor de linfocitos T

TET: Células T efectoras terminales

TMC: Células T de memoria central

TMCS: Células T de memoria "*stem cells*"

TME: Células T de memoria efectora

TNF: Factor de Necrosis Tumoral (*Tumor necrosis factor*)

UFP: Unidades formadoras de placas

URF: Formas recombinantes únicas (*Unique Recombinant Forms*)

V: Variable

INTRODUCCIÓN

1. El virus del HIV/SIDA

1.1. Inicios del HIV/SIDA

En el año 1981 en Estados Unidos de América se encontraron varios casos de hombres que tenían sexo con hombres (HSH) con enfermedades causadas por infecciones oportunistas, principalmente neumonías causadas por el hongo llamado en ese entonces *Pneumocystis carinii* (hoy denominado *Pneumocystis jirovesi*) y enfermedades inusuales en adultos jóvenes tales como el sarcoma de Kaposi o linfadenopatías persistentes (1). Al poco tiempo, estos síntomas también comenzaron a detectarse en otros grupos poblacionales, como los hemofílicos transfundidos, personas heterosexuales, niños y usuarios de drogas inyectables. Todos los afectados presentaban en común una deficiencia en la inmunidad celular, caracterizada principalmente por una disminución de linfocitos T-CD4 circulantes en sangre (2). Este conjunto de manifestaciones clínicas recibió el nombre de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

En 1983, el grupo francés liderado por Luc Montagnier y Françoise Barré-Sinoussi, aislaron un retrovirus a partir de una muestra proveniente de un varón homosexual con SIDA, relacionando por primera vez, un retrovirus y el SIDA (3). Este descubrimiento los llevó en el año 2008 a recibir el Premio Nobel de Medicina. En 1986, el Comité Internacional de Taxonomía Viral nombró al virus de la manera que hoy se lo conoce: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*). En ese mismo año, el descubrimiento de otro retrovirus aislado en África Occidental con características similares causante de inmunodeficiencia (4) dio lugar a la denominación HIV-1 para el primero y HIV-2 para el segundo de manera de poder distinguirlo del virus original. Los individuos infectados con HIV-2 también desarrollan SIDA, aunque con un período de latencia clínica más prolongado y menor morbilidad (5).

Ya han transcurrido 33 años desde la descripción de los primeros casos de esta enfermedad y la problemática HIV/SIDA sigue siendo de gran impacto a nivel mundial. A pesar de la intensa investigación que se ha realizado, aún no se cuenta con una vacuna efectiva que sea capaz de prevenir la infección.

1.2. Epidemiología

Se estima que desde el inicio de la pandemia, más de 60 millones de personas han sido infectadas con HIV-1. Datos provenientes del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el HIV/SIDA (6) indican que, a fines del año 2013, 35 millones de personas vivían con HIV en todo el mundo. Durante ese mismo año, se produjeron 2,1 millones de nuevas infecciones y el número de muertes alcanzó 1,5 millones de personas (Tabla 1). Cabe destacar que el 70% de las personas afectadas por el HIV/SIDA se concentra en África Subsahariana, donde la prevalencia en personas entre 15 y 49 años es del 4,7% (4,4%-4,9%), mientras que en otras regiones geográficas como América Latina la prevalencia es del 0,4% (0,4%-0,6%)

Los últimos datos epidemiológicos globales en relación a las cifras arrojadas por los reportes de años anteriores indicarían una estabilización de la pandemia.

	Total	Adultos	Mujeres	Niños (<15 años)
Personas viviendo con HIV	35 (33,2-37,2)	31,8 (30,1-33,7)	16 (15,2-16,9)	3.2 (2,9-3,5)
Personas que se infectaron con HIV (2013)	2,1 (1,9-2,4)	1,9 (1,7-2,1)		0,24 (0,21-0,28)
Muertes por SIDA (2013)	1,5 (1,4-1,7)	1,3 (1,2-1,5)		0,19 (0,17-0,22)

Tabla 1: Reporte Global ONUSIDA, Julio 2014. (6)

Los números están expresados en millones de personas.

Es así como se observa que año tras año, el número de casos de nuevas infecciones por HIV van disminuyendo en todo el mundo (38% desde el 2001 al 2013), y este descenso es más marcado en el caso de los niños, que del 2002 al 2013, cayó en un 58%. Otro dato muy importante, es que los casos de muertes por SIDA disminuyeron en un 35% desde el 2005 al 2013.

Son varios los factores que contribuyeron a mejorar la situación actual de la epidemia de HIV (6). Por un lado, existe un mayor acceso a los tratamientos con antirretrovirales, que se debe no sólo a la disminución de los costos de la terapia, sino que además la ampliación de su uso se debe a descubrimientos científicos que demostraron las ventajas del inicio de la terapia en etapas

tempranas de la infección y los altos beneficios de su aplicación en embarazadas (reduce la probabilidad de transmisión vertical). Por otro lado, hay un aumento de los recursos y del liderazgo político que ha dado lugar a un incremento de la inversión nacional e internacional en el ámbito de HIV/SIDA.

En nuestro país, según el boletín de VIH-SIDA y ETS de diciembre de 2014 del Ministerio de Salud (7), se calcula que viven alrededor de 110 mil personas con HIV, de los cuales, el 30% desconoce su diagnóstico. Cada año se notifican alrededor de 6.000 nuevos casos, en una relación de 2,1 varones por cada mujer diagnosticada. En cuanto a la transmisión vertical, los porcentajes han disminuido notoriamente pero aún se reporta que el 6% de los niños expuestos, adquieren HIV.

1.3. Estructura, genoma y ciclo de replicación del virus

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, el HIV pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* del género *Lentivirus*. Es un virus complejo, caracterizado por la morfología del virión con núcleo (*core*) cilíndrico o cónico. La partícula viral madura es esférica, envuelta por una membrana lipídica de origen celular, de aproximadamente 100 a 120 nm de diámetro. Su genoma está compuesto por dos moléculas lineales de ácido ribonucleico (ARN) simple cadena de sentido positivo, cada una de 9,5 kb aproximadamente, con secuencias casi idénticas que funcionan como un genoma diploide.

La partícula viral se encuentra conformada por la envoltura, una matriz proteica y la cápside que contiene los ácidos nucleicos en su interior (Figura 1). La envoltura es una bicapa lipídica proveniente de la célula huésped que presenta espículas altamente glicosiladas que consisten en trímeros del complejo formado por la glicoproteína de superficie gp-120 y la glicoproteína transmembrana gp-41. Por debajo se encuentran la matriz, compuesta por la proteína p17, y la cápside, una estructura icosaédrica constituida por la proteína p24. Finalmente, dentro de la cápside, se alojan las dos copias idénticas del ARN viral formando la nucleocápside con la proteína

estructural p7 y las enzimas necesarias para la replicación viral: la transcriptasa reversa, la integrasa y la proteasa.

En la figura 2 se muestra en forma resumida los genes y productos génicos del HIV (8)

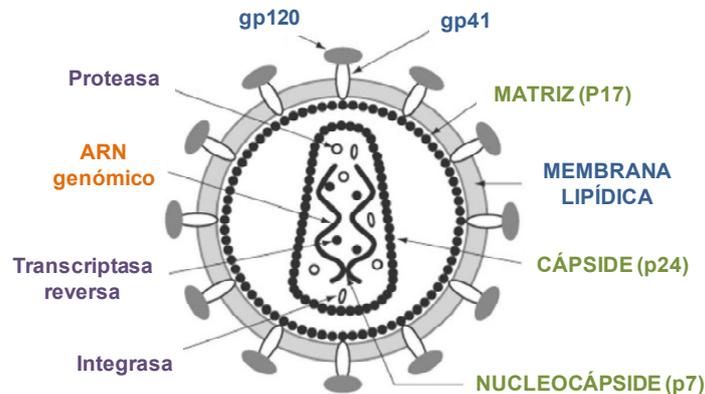


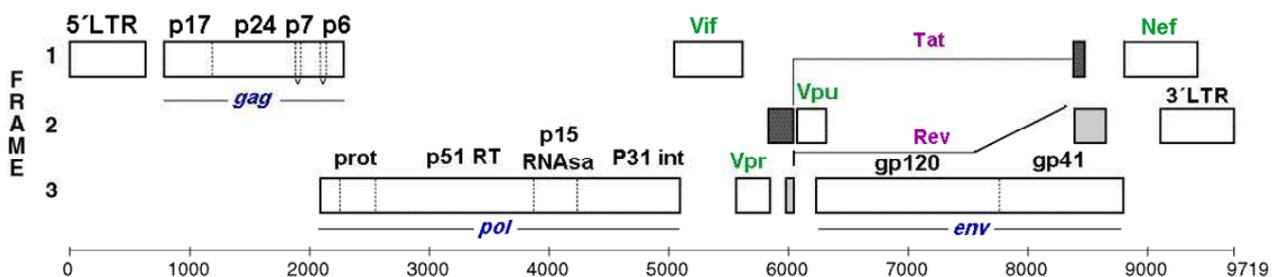
Figura 1: Estructura de la partícula viral del HIV

Esquema del virión. Se indican en azul la membrana lipídica y las proteínas que la componen. En verde, se señalan la matriz, la cápside y nucleocápside. En violeta, se encuentran las enzimas virales, y en naranja el genoma.

gag: Codifica para el precursor p55, que es procesada por la proteasa viral en p17 (Matriz), p24 (cápside), p7 (nucleocápside) y la proteína p6.

pol: Codifica la proteasa, transcriptasa reversa y la integrasa. Estas enzimas son producidas por el procesamiento por parte de la proteasa viral del precursor Gag-Pol.

env: Codifica para la glicoproteína precursora gp160, que es procesada en dos glicoproteínas: la externa gp-120 y la transmembrana gp-41.



Proteínas accesorias

Vif: Factor de infectividad viral.

Vpr: Proteína viral R.

Vpu: Proteína viral U.

Nef: Una de las primera proteínas que se producen en células infectadas, es la más inmunogénica de las proteínas accesorias. Nef interactúan con componentes celulares.

Vpx: Ausente en HIV-1. Homólogo a Vpr de HIV-1. Virus con Vpx, llevan ambos, Vpx y Vpr.

Proteínas Regulatorias (esenciales para la propagación viral)

Tat y Rev: Factores regulatorios virales esenciales.

Figura 2: Genes del HIV-1 y productos génicos. (8)

Esquema que muestra en azul, los genes *gag*, *pol* y *env* que codifican para la proteínas estructurales y enzimas virales que son los componentes esenciales de la partícula viral. En verde se indican las proteínas accesorias y en rosa, las proteínas regulatorias.

El ciclo de replicación del virus inicia típicamente cuando una partícula del HIV, mediante la molécula gp-120, se une a la molécula CD4 de la superficie de una célula CD4⁺. Esta unión induce un cambio conformacional en la molécula gp-120, permitiendo su unión a una segunda molécula en la superficie celular, que pueden ser los correceptores CCR5 (Tropismo R5) o CXCR4 (Tropismo X4), tras lo cual la envoltura del virus se fusiona con la membrana celular, permitiendo la entrada del virus a la célula. La proteína gp-41 de la envoltura viral es crítica para que este proceso ocurra (9).

Aunque las células T-CD4 son el blanco principal del HIV, otras células del sistema inmune, conteniendo o no a la molécula CD4 en su superficie, también pueden ser infectadas. Entre estas, monocitos y macrófagos. El HIV también se puede unir al receptor DC-SIGN (lectina de tipo C) presente en células dendríticas inmaduras. Estas células pueden internalizar al virus sin dañarlo, lo cual contribuye al aumento o retención de la infectividad viral (10).

Una vez que el virus se encuentra en el citoplasma de la célula, la transcriptasa reversa viral convierte el ARN viral a ADN, el cual transloca al núcleo y se integra al cromosoma celular (provirus). Luego, los genes virales se transcriben a ARNm, son transportados al citoplasma y traducidos a proteínas.

Por último, el virus se ensambla y brota de la célula como una partícula viral inmadura, adquiriendo una envoltura que incluye proteínas celulares y del HIV de la membrana celular. Esto permite la liberación del virus y la posterior maduración que resulta una partícula viral infecciosa (9).

1.4. Variabilidad genética del HIV

Los análisis de las secuencias genéticas del virus del HIV han permitido clasificarlos en diferentes grupos y estos a su vez, en subtipos. Según la base de datos de HIV de Los Alamos National Laboratory (11), Los virus se clasifican en:

- HIV-1: Grupo M, N, O y P
- HIV-2
- Virus de la Inmunodeficiencia de Simio (SIVs)

El grupo M de HIV-1, responsable de la pandemia, se ha diferenciado en nueve subtipos y dos sub-subtipos: A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J y K. Cada uno de ellos representa diferentes linajes del HIV que se encuentran asociados geográficamente. La recombinación de genomas entre subtipos es común, pero muchas veces son encontrados en un solo paciente que fue infectado más de una vez. Estos aislamientos son los llamados “formas recombinantes únicas” (URF: *unique recombinant form*). Si un virus recombinante es transmitido a varias personas, pasa a ser una “forma recombinante circulante” (CRF: *circulating recombinant form*) el cual posee una contribución relevante en la epidemia del HIV. Estos CRFs representan genomas recombinantes encontrados en 3 o más personas que no se encuentran relacionados epidemiológicamente. Hasta el momento se han descrito 66 CRFs.

En particular, en nuestro país, numerosos estudios epidemiológicos realizados han indicado que la mayoría de las infecciones con HIV son ocasionadas por el subtipo B y la forma recombinante circulante CRF12_BF que implica a los subtipos B y F con un predominio del subtipo F (11), además de otras recombinantes BF relacionadas (12). El subtipo B se encuentra principalmente en países de Europa y en Estados Unidos.

1.5. Historia natural de la infección

En la infección por HIV se pueden diferenciar tres etapas: la primoinfección o etapa aguda, la fase asintomática o latencia clínica y finalmente la fase clínica o SIDA (13) (Figura 3).

Durante la etapa aguda, hay una pérdida progresiva de los linfocitos T-CD4 en sangre periférica los cuales se recuperan en las semanas posteriores a la infección aunque no alcanzan los niveles iniciales, en parte como consecuencia de la acción protectora de los linfocitos T-CD8 específicos contra el virus (14). En contraste, los niveles de linfocitos T-CD4 en el tracto gastrointestinal disminuyen en forma más dramática y esta pérdida es irreversible. Por otro lado, hay un incremento de los marcadores de activación inmune que incluye el efecto directo de HIV como ligando de receptores tipo *Toll*, llevando a la producción de interferón- α (IFN- α) y a la translocación

microbiana (LPS como potente activador que lleva a la producción de citoquinas proinflamatorias). También hay un aumento en la producción de anticuerpos no neutralizantes, y de células T-CD4 y CD8 específicas para HIV asociadas temporalmente con una disminución de ARN de HIV en sangre (13).

En la fase asintomática de la infección, que suele durar años, la acción del sistema inmune puede mantener los niveles de carga viral estables. Pero en los estadios más avanzados de la infección por HIV y en ausencia de tratamiento antirretroviral, la mayor parte de los individuos infectados desarrollarán SIDA, lo que está asociado a un recuento de células T-CD4 usualmente menor a 200 células/ μ l, y a un progresivo incremento de la viremia (13). En última instancia, la presencia de alguna de las más de 20 infecciones oportunistas o cánceres relacionados con el HIV, suelen conducir a la muerte del paciente.

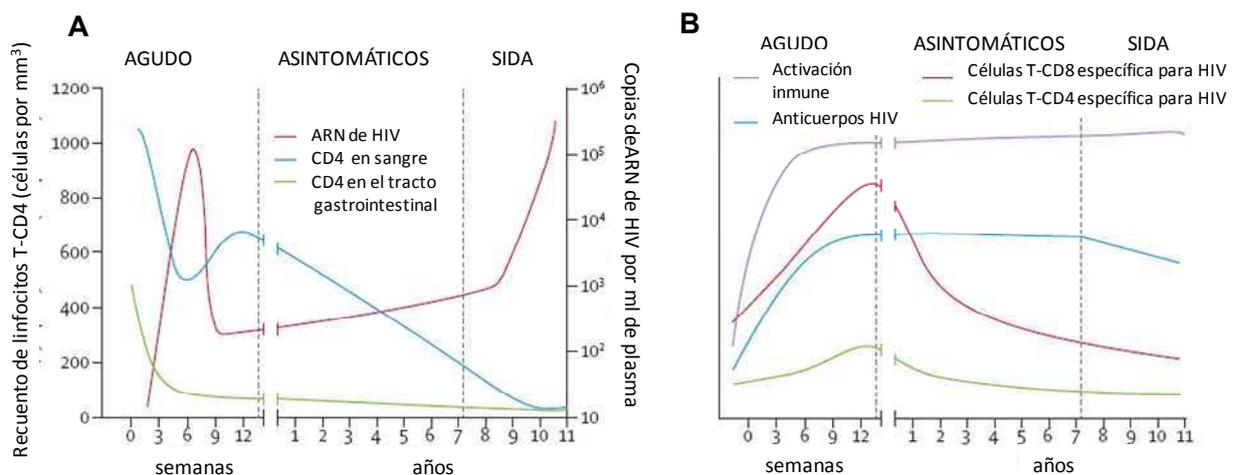


Figura 3: Historia natural de la infección por HIV (13).

(A) En un individuo infectado con HIV, hay una pérdida progresiva de las células T-CD4 en sangre, pero estas células son rápidamente reducidas en el tracto gastrointestinal a tiempos tempranos. (B) La respuesta aguda a la infección incluye un dramático incremento de los marcadores de activación inmune y de la producción de anticuerpos no neutralizantes. El aumento de células T-CD8 específicas para HIV son asociados temporalmente con un descenso del ARN de HIV en sangre.

Se han descrito pacientes infectados que progresan a SIDA rápidamente y otros que permanecen asintomáticos durante largos períodos, por más de una década. Estos últimos son conocidos como progresores lentos o no progresores y han motivado el desarrollo de numerosos estudios dirigidos a caracterizar los mecanismos subyacentes a esta particular condición (15).

Ciertos progresores lentos pueden permanecer asintomáticos a pesar de tener menos de 200 células T-CD4/ μ l sangre (16).

Con los avances en la terapia antirretroviral de alta eficiencia, la carga viral en sangre puede volverse indetectable evitando la progresión clínica a SIDA (13). De todos modos, el HIV-1 nunca es eliminado completamente del organismo, ya que establece infecciones latentes en los linfocitos T-CD4 de memoria y en otros tipos celulares que funcionan como reservorios protegidos de la acción de los fármacos (17).

2. Transmisión del HIV

2.1. Rutas de transmisión

El HIV se transmite por:

✓ Exposición a sangre contaminada: Por transfusiones sanguíneas, compartir agujas entre usuarios de drogas inyectables o por contacto con elementos punzo-cortantes contaminados. La vía de transmisión del virus por transfusiones ha perdido importancia epidemiológica debido al análisis de sangre donada a bancos de sangre y el uso de material descartable (18). Por el contrario, el contagio por el uso compartido de agujas continúa siendo importante en algunos países donde es común el uso de drogas inyectables, como en Europa Oriental (19).

✓ Transmisión vertical (de la madre infectada al hijo): Puede ocurrir a través de la placenta, del pasaje por el canal de parto (20) o a través de la leche materna durante la lactancia (21). Se ha demostrado científicamente que la terapia antirretroviral durante el embarazo en mujeres infectadas con HIV reduce el riesgo de transmitir el virus a su hijo en un porcentaje inferior al 5% (6).

✓ Contacto sexual a través de superficies de mucosas: a través de semen y secreciones cérvico-vaginales o rectales. Es la principal vía de transmisión.

En la tabla 2 se muestran los riesgos de transmisión de HIV-1 asociados con las diferentes rutas de transmisión y su contribución en la prevalencia mundial de HIV. Se estima que la

transmisión heterosexual es la responsable de aproximadamente el 70% de las infecciones por HIV en el mundo y el resto de las infecciones son atribuidas a los hombres que tienen sexo con hombres, infecciones de madre a hijo y usuarios de drogas (22).

Sitio de exposición al virus	Medio de transmisión	Probabilidad de transmisión	Casos estimados de HIV en el mundo
Tracto genital femenino	Semen/ sangre	1:200 a 1:2000	12.6 millones
Tracto genital masculino	Secreciones cérvico-vaginales y rectales, sangre	1:700 a 1:3000	10,2 millones
Tracto Intestinal	Semen/ sangre (Recto)	1:20 a 1:300	3,9 millones
	Semen/ sangre (Tracto GI superior)	1:2500	1,5 millones
	Sangre materna / secreciones genitales (Tracto GI superior, intraparto)	1:5 a 1:10	960.000
	Leche materna	1:5 a 1:10	960.000
Placenta	Sangre materna (intrauterina)	1:10 a 1:20	480.000
Torrente sanguíneo	Productos sanguíneos	95:100 a 1:150	2,6 millones

Tabla 2: Ruta de transmisión y riesgos de infección para HIV (22).

Se indica el sitio de exposición al virus, la probabilidad de transmisión dependiendo del medio y los casos estimados de HIV en el mundo. (GI: gastrointestinal)

En cuanto a la ruta de transmisión, aproximadamente el 90% ocurre por vía de mucosas. Entre las rutas de transmisión mencionadas, el modo más frecuente es la transmisión sexual. La probabilidad aproximada de transmisión de HIV es de 1:200 a 1:2000 en el tracto genital femenino y de 1:700 a 1:3000 en el tracto genital masculino. En cambio, en una relación sexual anal, ha sido estimada entre 1:20 a 1:300. Estas tasas de infección son más elevadas en el caso de que el transmisor se encuentre en la etapa aguda de la infección, ya que la carga viral es muy superior a la encontrada durante la etapa crónica (23). Además, hay que tener en cuenta otros factores, como la presencia de lesiones genitales u otras infecciones (ya sean ulcerativas o no) del tracto genital que pueden incrementar significativamente el riesgo de contagio (24). Por ejemplo, la infección por el virus de herpes simple de tipo 2 (HSV-2) puede aumentar hasta 3 veces la probabilidad de adquisición de HIV-1 (25). Otro factor que se ha visto que puede modificar la tasa de infección, pero

disminuyéndola, es la circuncisión masculina (26). Todo esto sugiere que la transmisión del HIV depende de múltiples variables y no sólo de la exposición al virus.

2.2. Transmisión sexual del HIV: Modelo de infección cérvico-vaginal

En primer lugar, el virus del HIV tiene que cruzar la barrera de la mucosa genital femenina. Esto puede ser a través de micro-abrasiones (rupturas microscópicas del epitelio) o por la presencia de lesiones de mayor magnitud (úlceras). Sin embargo, el virus puede además atravesar la barrera de la mucosa intacta ya que el epitelio estratificado de la vagina contiene células de Langerhans cuyas extensiones podrían alcanzar la superficie luminal. Estas células son susceptibles a la infección por HIV, y esto permitiría el tráfico del virus hacia la submucosa (22).

Estudios de los eventos tempranos que ocurren luego de que el virus atravesó la barrera de la mucosa, sugieren que existiría un período de ventana, en el cual la propagación viral no ha comenzado y el sistema inmune podría potencialmente evitar la expansión del patógeno (14). A las pocas horas, en la submucosa, el virus puede infectar una o unas pocas células en forma productiva. Estas células pueden ser linfocitos T-CD4, macrófagos derivados de monocitos, células de Langerhans o células dendríticas (Figura 4). Una vez que el virus replica dentro de la célula, da lugar a una pequeña población fundadora con relativamente baja diversidad genética (22). Esta propagación local de la infección ocurre a tiempos tempranos (entre 1 y 3 días) y luego se disemina a los ganglios linfáticos y al tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT) dentro del tercer y séptimo día de la infección, cuando ocurre además el establecimiento de los reservorios latentes. Cabe destacar que, una vez que el virus ingresa al organismo, en menos de 7 días puede generar reservorios, y esto ocurre antes de ser detectado a nivel sistémico. En última instancia, linfocitos infectados o viriones migran desde los ganglios linfáticos a diferentes órganos, y en particular, al GALT, donde ocurre una severa y rápida depleción irreversible de linfocitos T-CD4 (27).

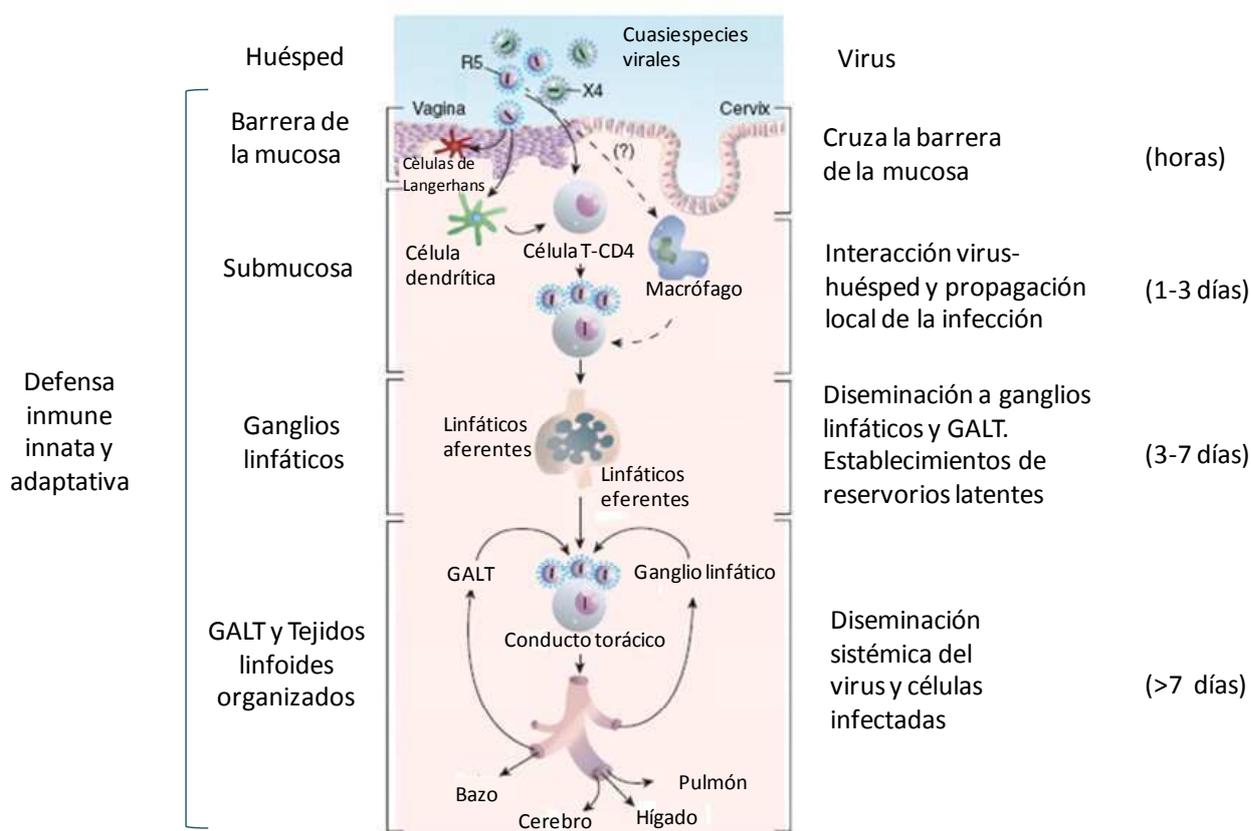


Figura 4: Modelo de infección cervico-vaginal de HIV (22).

Se indican cada una de las etapas de la infección por HIV (lado derecho del gráfico) y el tejido del huésped en donde ocurre (lado izquierdo). La mayoría de los virus transmitidos replican eficientemente en células T-CD4⁺ y no en macrófagos derivados de monocitos. Entre paréntesis: el tiempo estimado en el que sucede cada evento una vez que el virus se encuentra en la mucosa del tracto genital.

La expansión del HIV en el tejido linfoide coincide temporalmente con un pico de viremia. Además, ocurre un descenso en los niveles de linfocitos T-CD4 en circulación y la expresión de los síntomas del síndrome retroviral agudo que incluye fiebre, adenopatías, rash cutáneo, cefalea, faringitis, diarrea y muguet oral. Sin embargo, estos síntomas no siempre se manifiestan (28).

A medida que progresa la infección, la población viral deja de ser relativamente homogénea genéticamente, y se enriquece de cientos de cuasiespecies surgidas por mutaciones y eventos de recombinación, generados por la presión del sistema inmune y la gran capacidad del HIV de generar diversidad genética.

En resumen, las características de la infección por el virus del HIV resaltan el rol que posee el sistema inmune de mucosas del huésped, constituyendo un factor fundamental la necesidad de

generar una inmunidad específica en mucosas frente a este patógeno en el desarrollo de una vacuna preventiva.

2.3. Métodos para prevenir la transmisión del HIV

En la actualidad, no se cuenta con una vacuna capaz de prevenir la infección por HIV y se está realizando intensa investigación con el fin de frenar la epidemia con otro tipo de métodos (13). Uno de ellos es la terapia antirretroviral para personas infectadas, que es la intervención más potente para reducir la transmisión sexual de HIV. Cuanto antes se comienza con el tratamiento, mayor es el beneficio ya que además de disminuir la probabilidad de transmisión, retrasa la progresión a SIDA (29). También se utiliza en mujeres embarazadas para evitar la transmisión vertical ya que se ha demostrado que la administración de antirretrovirales a las mujeres embarazadas HIV+ puede reducir el riesgo de transmisión vertical hasta un porcentaje inferior al 5% (6). En la actualidad, se encuentran disponibles más de 25 drogas licenciadas que bloquean algún paso de la replicación viral y no sólo se ha probado su efectividad en personas infectadas, sino que también, se han realizado estudios de estas drogas como profilácticas pre-exposición, algunas de las cuales han generado resultados alentadores con una eficacia entre 44 y 75% (13) y también al ser utilizadas en formato post-exposición donde hay evidencias de un posible beneficio. Otras estrategias que se están estudiando para prevenir la transmisión del virus son los microbicidas vaginales (1% del gel tenofovir redujo la adquisición de HIV en un 39%) y más recientemente, geles rectales. La circuncisión médica masculina también es una intervención efectiva en la transmisión de HIV, observándose entre 50 y 60% menos de probabilidad de infección en 3 diferentes estudios clínicos, realizados en Kenia, Uganda y Sudáfrica (13).

A pesar de todas las estrategias que han sido estudiadas, ninguna de ellas es totalmente efectiva para prevenir la transmisión del HIV, por lo que se remarca la necesidad de desarrollar vacunas de uso tanto profiláctico como terapéutico.

3. En búsqueda de una vacuna contra HIV

3.1. Ensayos clínicos: Situación actual en el desarrollo de una vacuna.

Una de las bases de datos que contiene los candidatos a vacunas de HIV utilizadas en ensayos clínicos (30) muestra que hasta el día de la fecha (datos actualizados hasta el 5 de septiembre de 2014), se han realizado un total de 257 ensayos clínicos en diferentes partes del mundo.

Los ensayos clínicos, son estudios en humanos que se encuentran clasificados en fases y todas ellas, incluyen voluntarios sanos (HIV-negativos) (31). Brevemente, la fase I consiste en un pequeño número de voluntarios para testear seguridad e inocuidad utilizando por lo general diferentes dosis de la vacuna. Esta fase dura en general, entre 12 y 18 meses. La fase II, involucra a cientos de voluntarios HIV-negativos donde se testea seguridad y respuesta inmune de la vacuna pudiendo durar 2 años. Por último, en la fase III, participan miles de voluntarios y es donde se evalúa principalmente la efectividad de la vacuna en cuanto a la protección que otorga frente a la infección además de estudiar la respuesta inmune generada mediante diferentes ensayos. La duración de estos ensayos puede ser de 3 a 4 años.

En vacunas para HIV, hasta el momento sólo 3 candidatos alcanzaron la fase clínica III (Tabla 3) (30). El ensayo con mayor número de voluntarios fue el RV 144 que utilizó una estrategia de *prime-boost* (32) (Ver más adelante la sección 3.5 de Introducción). En el esquema de inmunización utilizado, se aplicaron cuatro dosis de inmunización con un vector viral atenuado que consistía en un canarypox (ALVAC-HIV) recombinante que expresa varias proteínas de HIV (Gag, Pro, gp-120) por un lado, y de dos dosis que contenían una mezcla de gp-120 recombinantes (AIDSVAX® B/E) por el otro. Hasta el día de la fecha, es el ensayo en el que se obtuvieron los mejores resultados, con una eficacia de 31,2% ($P = 0,04$). Esto significa que se redujo en un 31,2% la proporción de infectados en los vacunados (51 infectados de un total de 7960 personas) en comparación con el grupo placebo (74 infectados de 7988 personas) (32). Si bien el porcentaje no es muy alentador, es el primer ensayo donde se observa algún grado de protección en humanos. En

base a los resultados observados, los autores del estudio sugieren la posibilidad de que los mecanismos inmunológicos que median la protección frente a la infección con HIV serían distintos de aquellos que mediarían el control de la replicación en la infección temprana. Debido al modesto beneficio generado por esta vacuna, se continúa realizando intensa investigación para encontrar correlatos de protección que ayuden a descifrar qué es lo que una vacuna debe generar en el sistema inmune para que sea eficaz frente a este patógeno.

Ensayo	Estrategia	Candidato	Voluntarios	Lugar	Fecha
RV144	Vector viral Pox- proteína	ALVAC-HIV vCP1521/ AIDSVAX gp120 B/E	16402	Tailandia	Oct 2003- Jun 2009
VAX003	Proteína	AIDSVAX B/E	2500	Tailandia	Mar 1999- Ago 2000
VAX004	Proteína	AIDSVAX B/B	5400	Canadá, Países Bajos, Puerto Rico, EEUU	Jun 1998- Oct 1999

Tabla 3: Ensayos clínicos de vacunas contra HIV en fase III realizados.

En la actualidad se encuentran en curso 37 ensayos clínicos pero ninguno de ellos se encuentra en fase III. De ellos, 31 ensayos son de fase I/Ib, 2 corresponden a fase I/II y hay 4 en fase II. Estos últimos, emplean un esquema de inmunización *prime-boost* utilizando diferentes vectores (Tabla 4).

Ensayo	Estrategia	Vectores vacunales	Voluntarios	Lugar de realización	Fecha de inicio
RV 305	Vector Viral - Pox / Protein	ALVAC-HIV vCP1521 / AIDSVAX gp 120 B/E	162	Tailandia	Abr 2012
TaMoVac II	DNA / Vector Viral – Pox	HIVIS-DNA / MVA-CMDR	198	Tanzania, Mozambique	Abr 2013
Tiantan Vaccinia HIV Vaccine and DNA	DNA / Vector Viral – Replicativo	Chinese DNA / Tiantan Vaccinia	150	China	Ago 2012
HVTN 505	DNA / Vector Viral Adeno	VRC-HIVDNA016-00-VP / VRC-HIVADV014-00-VP	2200	EEUU	Jul 2009

Tabla 4: Ensayos clínicos de vacunas HIV en fase II que se están llevando a cabo en la actualidad.

Entre todos los ensayos clínicos de vacunas contra HIV realizados hasta el momento, las estrategias más utilizadas implican la utilización de los vectores de ADN y los vectores virales poxvirus, habiéndose realizado 86 ensayos clínicos que utilizaron ADN como vector vacunal (solo o

en combinación con otra estrategia) y 102 ensayos clínicos que utilizaron un poxvirus. Otras estrategias utilizadas son: Proteínas recombinantes (101 ensayos), vectores de adenovirus (49 ensayos), de alfavirus (2 ensayos), vectores de virus replicativos (7 ensayos) y *virus like particles* (VLP) (2 ensayos).

3.2. Diseño racional de vacunas para HIV

Uno de los principales obstáculos en el diseño racional de vacunas para HIV es que aún no están del todo definidos los correlatos inmunes de protección ni la calidad y magnitud de la respuesta inmune necesaria para conferir protección (33). Estas deficiencias dificultan la selección de una estrategia adecuada y eficaz para generar inmunidad frente al virus y por lo tanto, son muy diversas las estrategias que se investigan.

Una de las áreas de estudio, es la respuesta inmune innata la cual actúa dentro de los pocos minutos u horas de la entrada del patógeno al organismo. Tiene la función de reconocer al patógeno y de desarrollar rápidamente un mecanismo de defensa a través de diferentes tipos celulares, incluyendo células dendríticas, macrófagos, células epiteliales, endoteliales, *natural killer* (o NK), entre otras. Entender el impacto de la inmunidad innata en la regulación de la inmunidad adaptativa es muy importante para poder inducir una óptima inmunidad frente a HIV. Por otro lado, se encuentra el estudio de la inmunidad adaptativa. Los últimos avances en cuanto a vacunas de HIV estuvieron orientados en el descubrimiento de anticuerpos potencialmente protectivos, estudios de prueba de concepto que demostraron que células T-CD8 pueden controlar la infección de HIV, la identificación de correlatos de riesgo de transmisión y el mapeo de la evolución de mutantes Env en individuos infectados que presentan anticuerpos neutralizantes (34).

También hay que tener en cuenta que, en el desarrollo de vacunas frente a HIV-1 un desafío importante a afrontar es la variabilidad genética dentro del grupo M, responsable de la pandemia, que cuenta con diferentes subtipos, sub-subtipos, y CRFs (formas recombinantes circulantes) que generan alta diversidad viral. Para hacer frente a esta variabilidad en el desarrollo de vacunas se

utilizan diversas aproximaciones como la combinación de inmunógenos de diferentes subtipos (32), uso de secuencias consenso entre varios subtipos, o la utilización de inmunógenos mosaico, formados por la optimización de fragmentos de secuencias naturales (35). Otra metodología empleada es la utilización de antígenos de subtipos o variantes circulantes del lugar donde se utilizará la vacuna (32).

En relación a los ensayos clínicos más importantes que alcanzaron la fase III y que por lo tanto resultaban prometedores para la concreción de una vacuna contra HIV, los resultados obtenidos fueron negativos (VAX003 y VAX004) o de parcial eficacia (RV144). Cabe destacar que fueron diseñados para inducir respuestas humorales (VAX003 y VAX004) o para generar ambos tipos de respuestas, humoral y celular (RV144) (36). En estos tres grandes ensayos, tanto la ruta de inoculación como la estrategia utilizada tuvieron la finalidad de generar respuestas inmunes adaptativas a nivel sistémico. Otra estrategia muy prometedora para prevenir o frenar la infección de un patógeno como HIV que se transmite por rutas de mucosas, es desarrollar vacunas capaces de inducir inmunidad antiviral en las superficies de mucosas que funcionan como puerta de entrada del virus (37).

3.3. Sistema inmune de mucosas: Conceptos generales

El sistema inmune de mucosas se encuentra funcional y anatómicamente dividido en dos componentes principales. Por un lado se encuentran los sitios inductivos o también, denominado el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, del inglés: *Mucosal associated lymphoid tissue*), donde se inicia la respuesta inmune frente al antígeno. El otro componente está representado por los sitios efectores que incluyen la lámina propia y tejidos glandulares, donde hay una producción de anticuerpos y respuesta inmune mediada por células. Debido a que los sitios inductivos se encuentran estrechamente relacionados con los sitios efectores se lo denomina “Sistema Inmune Común de Mucosas” (SICM) (38). El estudio y comprensión de los mecanismos que operan en el SICM ha sido muy importante para comprender la protección inmune frente a patógenos de

mucosas. Este sistema se basa en linfocitos T y B que una vez que se activan, migran de los sitios de presentación del antígeno a través del sistema linfático y sangre para selectivamente asentarse en tejidos linfoides en sitios distantes como por ejemplo, la mucosa gastrointestinal, respiratoria, genitourinaria, entre otros (39).

El MALT, contiene aproximadamente el 80% del total de los linfocitos presentes en el organismo adulto (40). Está situado a lo largo de todas las superficies de los tejidos de mucosas y se encuentra altamente compartimentalizado, reconociendo los siguientes sitios (Figura 5):

- ✓ Tejido linfoide asociado al tubo digestivo (GALT)
- ✓ Tejido linfoide asociado al tracto nasofaríngeo (NALT)
- ✓ Tejido linfoide asociado al árbol bronquial (BALT)
- ✓ Tejido linfoide asociado al tracto genital

También se han descrito el tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT), al conducto lacrimal (LDALT), a laringe (LALT) y al conducto salival (DALT) (41, 42).

Un ejemplo de cómo funciona el sistema inmune común de mucosas, es la estimulación de la respuesta inmune en el NALT. Los antígenos son tomados por el epitelio asociado al folículo en el NALT, donde células dendríticas presentan el antígeno a células T-CD4 y CD8 *naïve*. Las células T se diferencian, se generan tanto células T como B de memoria, las cuales migran a los ganglios linfáticos y a tejidos efectores no organizados como por ejemplo, al pulmón y al tracto genital (42). De este modo, una inmunización intranasal, estimula la respuesta inmune, no sólo en el NALT, sino que además, es efectiva para inducir inmunidad sistémica, en la mucosa gástrica, y en el tracto respiratorio y genital.

Si bien, en principio, dentro de la inmunología había mucho desconocimiento sobre el sistema inmune en las mucosas, se le está dando cada vez más importancia debido a que muchas infecciones ocurren por esta vía y por lo tanto, su estudio sería fundamental para poder generar protección frente a estas infecciones mediante la inducción de inmunidad específica en los sitios de entrada del patógeno.

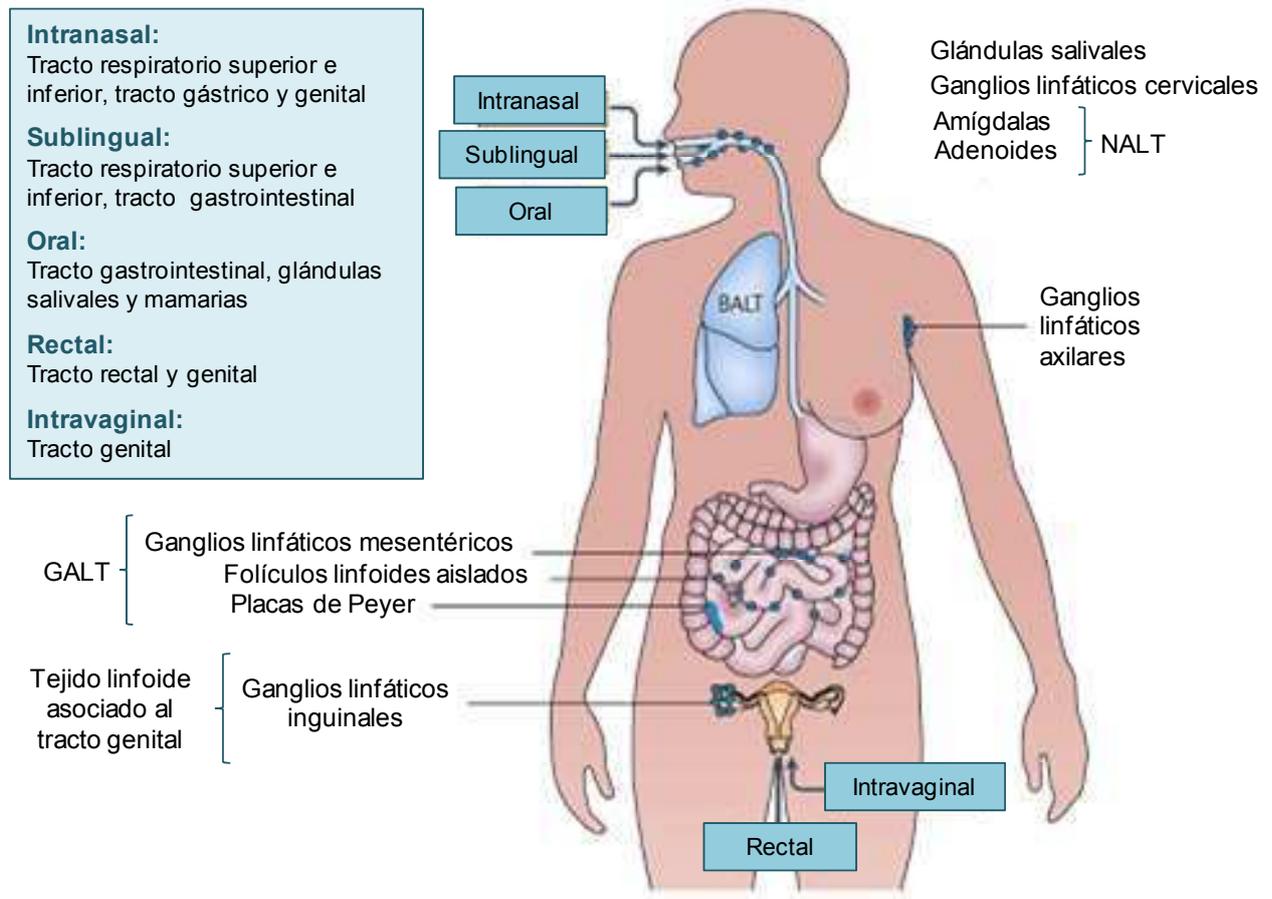


Figura 5: Rutas de inmunización de mucosas y compartimentalización de las funciones efectoras (42).

Las diferentes rutas de inmunización de mucosas se indican con flechas, dentro de los recuadros. Se identifican además los sub-compartimientos del MALT. En el cuadro superior izquierdo, se mencionan las diferentes rutas de inmunización y los sitios de mucosas en los que se detecta inmunidad específica.

3.3.1. Inmunidad de mucosas contra HIV

La transmisión natural de HIV ocurre predominantemente a través de las superficies de mucosas, la cual representa la primera barrera de defensa del hospedador para combatir la infección causada ya sea por virus libre o por células infectadas. Una vez cruzada esta barrera, una pequeña población fundadora de células infectadas es establecida rápidamente (22). Luego, ocurre una expansión viral local durante la primera semana, se establece la infección en los órganos linfoides secundarios y más tarde, la infección se propaga sistémicamente. Por lo tanto, una gran

oportunidad para prevenir la infección por HIV es desarrollar estrategias dirigidas a la pequeña población fundadora infectiva en la mucosa, relativamente homogénea genéticamente, en la primera semana de infección (37, 43).

Las mucosas que juegan un papel fundamental en la infección por HIV son las del tracto gastrointestinal y genital. Diversas evidencias, tanto en el modelo de inmunodeficiencia de simio como en pacientes infectados con HIV, indican que el virus produce la depleción de los linfocitos T-CD4 de los tejidos linfoides asociados a mucosas y establece reservorios virales en los mismos durante la infección primaria (27, 44, 45). Otros estudios donde analizan el mecanismo implicado indican que la destrucción celular se produciría por la infección directa de los linfocitos T-CD4 de memoria predominantemente de las superficies de mucosas y su posterior lisis inducida directamente por el virus o por linfocitos T citotóxicos específicos (46). Esto demuestra la importancia de los tejidos de mucosas en la infección, y más aún, la presencia de inmunidad específica en estos sitios se correlaciona con protección frente a HIV, lo cual es evidenciado en varias cohortes de personas expuestas seronegativas por la presencia de IgA específica (47-50), y también por células T específicas en la mucosa cervical (51). Por otro lado, en un estudio realizado con un grupo de 113 trabajadoras sexuales de Kenia de alto riesgo (52), el análisis estadístico reveló que la presencia de IgA neutralizante en mucosa genital, así como la proliferación sistémica HIV-específica en PBMCs circulantes en el momento del reclutamiento se correlacionaba con el hecho posterior de no contraer la infección. Todos estos antecedentes demuestran la importancia en el desarrollo de estrategias de vacunación capaces de inducir inmunidad local frente al HIV que controlaría la replicación del virus en las mucosas, frenándolo en las primeras etapas de la infección e inhibiendo su posterior diseminación sistémica. Esta hipótesis quedó demostrada en un estudio en el que la presencia de linfocitos T-CD8 específicos en el tracto genital de macacos se correlacionaba con la protección frente al desafío intravaginal con un virus de la Inmunodeficiencia de Simio (SIV) patogénico (53).

3.4. La importancia de inducir una respuesta celular T-CD8 para vacunas contra HIV

Debido a la dificultad de generar anticuerpos neutralizantes con reactividad cruzada frente a la gran variedad de envolturas de HIV y tras el fracaso de los dos primeros grandes ensayos en fase III (VAX003 y VAX004) el foco en cuanto a vacunas, se centró en el desarrollo de esquemas de inmunización capaces de generar una respuesta celular T citotóxica fuerte y amplia. La habilidad de los linfocitos T-CD8 de controlar la replicación viral está sustentada por diversos estudios realizados tanto en el modelo de SIV en primates (54, 55) como por los estudios en humanos (56-59) que presentan control de la infección.

Gran parte de los ensayos clínicos actuales utilizan la inmunización secuencial de vacunas basadas en diferentes vectores (principalmente vectores de ADN y vectores virales atenuados), ya que se la considera actualmente como la estrategia más eficaz para generar respuestas inmunes celulares potentes y de gran avidez (60-63). Sin embargo, una pregunta clave por responder es si las características de la respuesta celular inducida (tales como el tiempo y cinética, magnitud y calidad) en los individuos vacunados será suficiente para tener un impacto en la replicación inicial del virus en mucosas y en los subsecuentes niveles de carga viral en la periferia (64).

3.5. Esquema de inmunización “*Prime-boost*”: Sistema de administración del antígeno

Debido a que las vacunas tradicionales no han sido capaces de contener infecciones tales como *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* o HIV, que resisten la inmunidad humoral (62), se han investigado nuevas estrategias con el fin de generar una respuesta inmune celular. Ente ellas, se han estudiado diferentes sistemas de administración del antígeno, incluyendo vacunas de ADN, vectores virales y bacterianos recombinantes, formulaciones de proteínas unidas a adyuvantes y partículas “*virus like*” recombinantes.

A mediados de los 90, las vacunas de ADN parecían prometedoras como vacunas preventivas y terapéuticas frente a diferentes enfermedades ocasionadas por patógenos

intracelulares incluyendo HIV (65). En paralelo, se comenzaron a estudiar vectores virales recombinantes para ser usados como vectores vacunales, como aquellos basados en poxvirus y adenovirus. Sin embargo tras los primeros estudios se observó que estos vectores tampoco producían los niveles de respuesta celular T-CD8 requeridos para generar protección contra infecciones, incluso cuando se utilizaba más de una dosis del vector, estrategia denominada “*boost* homólogo” (65). Esto se debe a que este tipo de inmunizaciones repetidas en las que se emplea el mismo tipo de vector, genera un incremento de los anticuerpos y células T específicas no sólo frente al antígeno si no además, frente al vector, lo cual no permite una eficiente expresión y presentación de los antígenos recombinantes en las subsiguientes inmunizaciones. De este modo, no se genera un incremento de la respuesta inmune celular ni tampoco la humoral frente a los antígenos recombinantes que deben expresarse correctamente tras la inmunización (66).

Para mejorar la eficacia de los vectores basados tanto en ADN como en los virus recombinantes, se combinaron ambas estrategias, lo cual se denominó “*prime-boost*” en inglés, y se refiere a la inmunización por aplicación de dosis seriadas y heterólogas (combinación de diferentes vectores de inmunización). Un primer reporte importante que funcionó como prueba de concepto de la inmunización *prime-boost* heteróloga fue la obtención de protección en ratones frente a un desafío con *Plasmodium Yoelii* la cual fue mediada por células T-CD8. Estos ratones habían sido previamente inmunizados con un *prime* de virus influenza recombinante seguido de un *boost* con virus Vaccinia. Esta secuencia de inmunización fue crucial, ya que en el orden opuesto no inducía protección (67). Luego, múltiples ensayos experimentales en diversos modelos animales también han demostrado la eficacia de este tipo de estrategia para generar respuestas celulares específicas no sólo de gran magnitud sino también de una calidad superior, reportando un incremento en la inducción de células T-CD4 y CD8 en diferentes modelos, incluyendo tuberculosis (68), HIV (69), virus del papiloma humano (HPV) (70) y el virus del Ébola (71). La eficacia de esta estrategia de inmunización se basa en que la dosis del *prime* genera células T de memoria frente al antígeno específico que son luego amplificadas con el *boost* aplicado desde otro vector vacunal. De este

modo, se evita la respuesta celular inmune dirigida contra el vector vacunal utilizado en la primer inmunización y así se optimiza la amplificación de la respuesta.

3.5.1. Vectores de ADN

Una de las estrategias muy utilizadas en ensayos de vacunas, es el uso de ADN recombinante que consiste en la introducción en un tejido apropiado de ADN que expresa un antígeno específico frente al cual el sistema inmune genera una respuesta. Las ventajas de este tipo de vectores vacunales frente a las vacunas tradicionales, se mencionan a continuación (72):

- ✓ Son baratas, fácil de desarrollar y producir
- ✓ Son seguras (sin riesgo de infección), estables y fácil de manipular
- ✓ Respuesta inmune enfocada en el antígeno de interés
- ✓ Inducción de respuesta inmune humoral y celular
- ✓ La expresión *in vivo* permite que la proteína resultante se ensamble en su estructura normal (o aproximada) con las modificaciones post-traduccionales correspondientes
- ✓ Una combinación de plásmidos podría ser usado como vacuna de amplio espectro.

Por otro lado, entre las desventajas, podemos mencionar:

- ✓ Limitado a inmunógenos proteicos.
- ✓ Inducción de anticuerpos frente al ADN.
- ✓ Podría haber inducción de tolerancia inmunológica.
- ✓ Vacunas de ADN podrían tener baja inmunogenicidad
- ✓ Riesgo de integración al ADN genómico

El vector de ADN puede ser empleado, no sólo como vector vacunal para generar una respuesta inmune específica frente a un antígeno en particular, sino que además, puede ser utilizado para expresar moléculas capaces de modular la respuesta inmune, cumpliendo la función

de adyuvante. Por ejemplo, los vectores de ADN recombinante que expresan citoquinas (73) (IL-12, IL-15, GM-CSF, IL-18), quemoquinas (CCL19, CCL28) (74), o determinadas proteínas bacterianas, o virales, con conocida función adyuvante.

3.5.2. Vectores poxvirus

El miembro prototipo de la familia *Poxviridae* es el virus *Vaccinia*, el cual fue utilizado como vacuna a virus vivo para erradicar la viruela humana (*smallpox*). Este virus, ha sido muy estudiado como posible vector vacunal debido a las propiedades que posee (66), las cuales se mencionan a continuación:

- ✓ Amplio rango de huésped
- ✓ Facilidad para generar virus recombinantes que expresan una amplia variedad de antígenos foráneos (permite la inserción de grandes fragmentos de ADN)
- ✓ Altos niveles de expresión de proteínas a partir del virus recombinante
- ✓ Confiere protección a animales inmunizados con el virus recombinante

El genoma de los poxvirus está compuesto por ADN doble cadena con una longitud de 130 a 300 kb. El ciclo de replicación inicia con la unión del virus a glicosaminoglicanos presentes en la superficie de la célula para luego fusionarse con la membrana (Figura 6) (75). Existen dos tipos de partículas capaces de infectar una célula: virus maduro intracelular (IMV, *intracellular mature virus*) y virus extracelular envuelto (EEV, *extracellular enveloped virus*). La diferencia entre ambas radica en el número de membranas que la envuelven y las glicoproteínas presentes en ellas, generando que utilicen distintos mecanismos para entrar a la célula (75). Luego de la fusión a la membrana celular, ingresa el *core* viral al citoplasma manteniendo la integridad de la estructura. La ARN polimerasa y factores de transcripción del virus permiten la expresión de genes tempranos dentro del *core* viral. A continuación, mediante un mecanismo poco conocido, el genoma se desnuda, se libera al citoplasma y funciona como templado para la replicación del ADN y subsecuente expresión de

genes intermedios y tardíos. A medida que se obtiene el producto de los genes tardíos, las partículas virales se van ensamblando, en principio como IMV pero luego son envueltos con membrana derivada del aparato de Golgi para formar virus intracelular envuelto (IEV, *intracellular enveloped virus*). Esta última partícula pierde una membrana al fusionarse con la membrana celular y forma el virus asociado a la membrana celular (CEV, *cell-associated enveloped virus*), el cual se disemina a células vecinas o se libera como EEV. Las IMV son liberadas al ambiente extracelular cuando la célula se lisa.

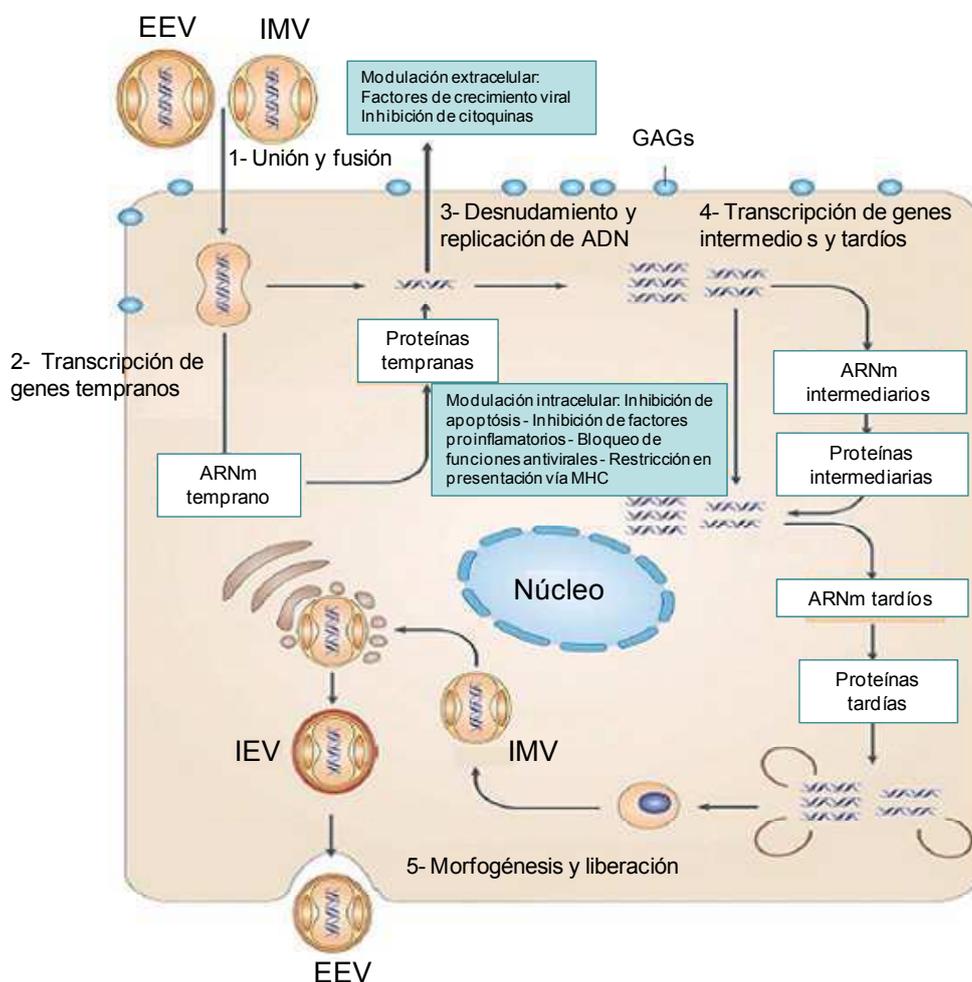


Figura 6: Ciclo de replicación del virus Vaccinia (75).

IMV: Virus maduro intracelular, EEV: Virus extracelular envuelto, IEV: Virus intracelular envuelto, GAGs: Glicosaminoglicanos

Los poxvirus son capaces de modificar tanto el entorno intracelular como el extracelular de la célula infectada debido a la expresión de ciertas proteínas virales que modulan una amplia gama de respuestas de defensa antiviral. Algunas de las respuestas del huésped en las que el virus interviene modificándolas son: la apoptosis, la inducción de la respuesta a interferón, el estrés inducido por cascadas de señalización, la presentación de antígeno por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y la modulación de factores proinflamatorios en respuesta a la infección (75).

3.5.2.1. MVA (Virus Vaccinia Ankara Modificado)

El virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) es una cepa atenuada del virus Vaccinia, que se aisló luego de 570 pasajes de la cepa CVA (*Chorioallantois vaccinia virus Ankara*) por fibroblastos de embrión de pollo (FEPs) perdiendo una gran cantidad de ADN de su genoma. El análisis de la secuencia completa del genoma de MVA reveló que posee grandes deleciones (aproximadamente 30 kb), que incluyen varios genes relacionados con la virulencia y el rango de huésped (76). Además de la pérdida de estos genes de Vaccinia con funciones inmunomoduladoras, MVA perdió la capacidad de replicar productivamente en la mayoría de las células de mamífero sin comprometer la síntesis de proteína viral (66). Estas propiedades permiten que MVA sea más seguro que el virus Vaccinia como vector vacunal ya que el virus no puede diseminarse por el organismo y además, puede expresar genes foráneos que van a ser mejor reconocidos por el sistema inmune debido a la pérdida de los genes que le permiten evadirlo. Un importante antecedente de este virus, es que fue administrado como vacuna para la viruela sin mostrar complicaciones a más de 120.000 individuos, incluyendo a personas consideradas de riesgo a la vacuna de la viruela convencional (77).

El MVA se transforma de este modo, en un potencial vector vacunal que es ampliamente utilizado tanto en ensayos preclínicos como clínicos ya que estimula la respuesta inmune celular, necesaria para generar vacunas frente a patógenos donde la respuesta inmune humoral no es suficiente para generar protección (78, 79).

3.5.3. Estrategia *prime-boost* por ruta de mucosas

Debido a la necesidad de desarrollar vacunas de mucosas óptimas para diversos patógenos que ingresan al organismo por esta vía y en donde la generación de inmunidad celular T es muy importante para evitar la infección, una estrategia para combinar ambas características es el uso de inmunizaciones *prime-boost* por vía de mucosas. En cuanto al estudio en HIV, en algunos trabajos se combinaron cada uno de los vectores por rutas diferentes, como por ejemplo, inmunización intranasal/intramuscular (80, 81), generando altos niveles de respuestas inmunes tanto sistémica como en mucosas. Sin embargo, se ha visto que la inmunización por vía de mucosas (intranasal/intranasal) también puede generar ambos tipos de respuesta (82). Un antecedente importante, fue un trabajo realizado por la directora del presente trabajo de tesis, donde se utilizó una estrategia ADN-*prime*/MVA-*boost* por ruta intranasal junto con la toxina colérica (CT) como adyuvante (ver sección 3.7 de Introducción). El resultado obtenido fue la inducción de una potente respuesta inmune celular específica para el antígeno Env de HIV, tanto en el bazo como en el sitio efector del tracto genital y en ganglios linfáticos drenantes de la mucosa genito-rectal. Además, generó anticuerpos específicos en mucosa de tracto genital (39). Así mismo, en otro trabajo de los mismos autores se utilizó el mismo MVA recombinante en combinación con un vector de influenza atenuado (Flu-*prime*/MVA-*boost*) también por ruta intranasal (intranasal/intranasal), resultando efectiva la estrategia en la inducción de respuesta específica sistémica y en ganglios drenantes de mucosa genito-rectal (83). Esto demuestra que la inmunización ADN/MVA por ruta intranasal podría ser una estrategia adecuada para generar inmunidad frente a HIV.

3.6. Selección de antígenos y rutas de inoculación

Para generar respuestas inmunes tanto celulares como humorales de gran amplitud, magnitud, calidad y suficiente durabilidad en estrategias de inmunización contra HIV, es necesario estudiar diferentes estrategias de inmunización, seleccionando el antígeno y la ruta de inoculación.

En el momento de seleccionar el antígeno frente al cual se va a inducir la respuesta inmune, hay que tener en cuenta diversos factores, como por ejemplo: la antigenicidad, inmunogenicidad, función, variabilidad genética, nivel y tiempo de expresión viral. El virus del HIV, posee diversas proteínas con diferentes funciones que podrían ser utilizadas como antígeno de una vacuna: las estructurales, las que poseen función enzimática y las accesorias. Una de las estrategias utilizadas, es inducir una respuesta inmune dirigida a la glicoproteína de envoltura de HIV (Env). Esta proteína es estructural, y se encuentra inserta en la envoltura del virus teniendo como función principal, servir de receptor para unirse al CD4 de linfocitos T y así poder infectar a la célula. La generación de inmunidad frente a Env posee la ventaja de que, al encontrarse expuesta en la superficie viral, el sistema inmune puede reaccionar frente al virus apenas ingresa al organismo, lo cual evitaría que el virus pueda interaccionar con las células para infectarlas. Además, se sabe que esta proteína posee epítopes que son altamente inmunogénicos. Una de las desventajas de Env, en cambio, es que las regiones conservadas se encuentran altamente glicosiladas, y por lo tanto, el reconocimiento antigénico es menos eficiente y además, las zonas expuestas son muy variables (84). Estas dificultades son muy importantes en el intento por desarrollar una vacuna capaz de generar anticuerpos neutralizantes, y es por eso también, que se busca generar inmunidad celular y no humoral.

Cabe destacar que la mayoría de los estudios clínicos que se están llevando a cabo actualmente, utilizan como antígeno a Env sólo o en combinación con otros antígenos de HIV para poder obtener una respuesta más amplia.

En cuanto a la ruta de inoculación, casi todos los ensayos clínicos que se han realizado para vacunas de HIV, han sido por ruta sistémica y se han centrado en el estudio de la respuesta inmune sistémica. Sin embargo, para obtener respuestas inmunes significativas en mucosas, por lo general se requiere la inmunización local de las mismas (85). Llamativamente, estudios comparativos entre rutas de inoculación sistémicas y de mucosas realizados en macacos mostraron que la vacuna al ser administrada en sitios inductores de mucosas resultaba mucho más efectiva para generar respuestas celulares protectoras de alta avidéz en comparación con la misma vacuna administrada

por ruta sistémica (86, 87). De todas las rutas de inoculación que se han ensayado con antígenos de HIV en forma experimental: oral, rectal, intravaginal, intranasal, etc, una de las más adecuadas y prometedoras es la intranasal. Esta ruta funciona como un buen sitio inductor para generar respuestas en la mucosa del tracto genital femenino (entre otras mucosas) debido a la particularidad del sistema común de mucosas (88), por lo que en ensayos clínicos para HIV, la están utilizando (89-91) (Ver figura 5). Cabe destacar, que se encuentran actualmente aprobadas dos vacunas comerciales para uso humano de administración intranasal (FluMist y NASOVAC), ambas para influenza. Otras vacunas aprobadas por ruta de mucosas, corresponden a aquellas de aplicación oral (42).

3.7. Aplicación de adyuvantes de mucosas

La respuesta inmune innata y adaptativa se encuentran relacionadas entre sí de manera que señales de la inmunidad innata modulan la calidad de la respuesta específica inducida. Justamente, una forma de modificar la respuesta adaptativa es mediante el uso de moléculas adyuvantes.

La eficacia de una vacuna al ser administrada por ruta de mucosas puede ser incrementada agregando adyuvantes de mucosas como aquellos basados en toxinas o en citoquinas, las cuales activan células del sistema inmune innato y adquirido. Uno de los adyuvantes de mucosas más estudiado (en forma experimental) hasta el momento es la toxina colérica (CT, cholera toxin) (92) (ver sección 3.7.2 de Introducción). Sin embargo, la CT no se encuentra aprobada para uso humano por lo que se están buscando actualmente moléculas capaces de reemplazarla (93). El estudio de las citoquinas y señales co-estimuladoras que influyen los programas de transcripción y que regulan la diferenciación celular T de memoria, va a ser crucial para poder manipular las respuestas generadas por vacunación (94). De hecho, hasta ahora las estrategias utilizadas respecto a la inclusión de diferentes citoquinas, quimioquinas y moléculas inmunomoduladoras para potenciar respuestas de memoria han sido en su mayoría empíricas.

En cuanto al uso de adyuvantes con antígenos de HIV, se han reportado resultados positivos administrando citoquinas (como GM-CSF, IL-12, IL-2, IL-18) junto con antígenos por ruta de mucosas y evaluando la respuesta en sitios de mucosas distantes (95, 96).

3.7.1. Interleuquina 12

La interleuquina 12 (IL-12) es una citoquina producida principalmente por monocitos, macrófagos, células dendríticas y células B. Está compuesta de dos subunidades, p35 y p40, unidas covalentemente. Entre las funciones principales de IL-12, se encuentran la inducción de la producción de IFN- γ por parte de las células *natural killer* (NK) y células T, y la diferenciación de células T *naïve* en Th1. También se ha visto que favorece las respuestas CTL, sugiriendo un rol clave para IL-12 en el desarrollo de inmunidad mediada por células (97).

Existen muchos antecedentes que demuestran los beneficios de IL-12 para ser utilizado en inmunoterapias contra el cáncer y además, como adyuvantes de vacunas tanto contra el cáncer (98) así como también para enfermedades infecciosas, entre las cuales se incluye HIV (99). Esta citoquina ha sido administrada en ensayos clínicos en forma de proteína recombinante (100), o a través de un vector de ADN (99, 101). La rutas de inmunización utilizadas para este adyuvante es por vía intravenosa y subcutánea. En relación al uso de IL-12 como adyuvante de mucosas, ha sido utilizado en numerosos estudios, y más específicamente su administración por ruta intranasal ha dado buenos resultados para diferentes infecciones en ratones (102-104). En humanos, en cambio, no hay reportes de su uso por ruta intranasal.

3.7.2. Subunidad B de la toxina colérica

La toxina colérica (CT *del inglés*) es una enterotoxina de *Vibrio Cholerae* que está compuesta de una subunidad A (CTA) enzimáticamente activa, con actividad ADP-ribosiltransferasa, la cual es responsable de su efecto tóxico, y un pentámero de subunidades B

(CTB), que es necesaria para la endocitosis de CTA luego de la unión al receptor gangliósido GM1. La CT es capaz de activar células dendríticas debido al incremento de los niveles de AMPc celular, induciendo su maduración fenotípica y funcional (105).

La CT ha sido ampliamente utilizada como adyuvante oral experimental debido a su capacidad para incrementar la respuesta inmune de vacunas para infecciones entéricas, pero también para infecciones respiratorias y del tracto urogenital. Sin embargo, CT es tóxica y puede ser acumulada en el nervio y bulbo olfatorio cuando es administrada por ruta intranasal, un mecanismo que es dependiente de la unión con el receptor de GM1 (presente en todas las células nucleadas de mamífero) (105). Debido a ello, se comenzó a utilizar otra alternativa, que fue la de utilizar sólo CTB como adyuvante de mucosas. Si bien, su actividad adyuvante es limitada ya que en ausencia de la subunidad A pierde su actividad ADP-ribosiltransferasa, numerosos estudios han demostrado su actividad adyuvante en vacunas de mucosas. Debido a los buenos resultados en estudios preclínicos, se realizaron también ensayos clínicos, que dieron como resultado una vacuna oral llamada Dukoral, que se utiliza en Suecia desde 1991 (y en toda la Unión Europea desde el 2004) (106). La vacuna es de administración oral, la cual contiene bacterias inactivadas de *V. cholerae* de diferentes cepas con el agregado de CTB recombinante como adyuvante. Fueron 3 los ensayos clínicos que avalaron los beneficios de CTB. El primero de ellos, contó con más de 63.000 personas en Bangladesh y comparó Dukoral con la misma vacuna en ausencia de CTB, donde se observó mayor grado de protección en presencia del adyuvante (107).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

En base a lo expuesto en los antecedentes la **HIPÓTESIS GENERAL** del presente trabajo de tesis se basa en considerar que el desarrollo de estrategias de inmunización que induzcan respuestas inmunes específicas, tanto en mucosas como a nivel sistémico, contra patógenos que se transmiten por vía de mucosas como HIV, son aspectos fundamentales a investigar en el desarrollo de vacunas. Por lo tanto, el **objetivo general** de este trabajo de tesis doctoral fue:

Desarrollar esquemas de inmunización eficientes en la generación de inmunidad de mucosas y a nivel sistémico, mediante el empleo de vectores génicos (ADN) y vectores virales atenuados (MVA) que expresan la glicoproteína de envoltura de HIV del subtipo B (EnvB) (ADN-EnvB-*prime*/MVA-EnvB-*boost*) aplicados en un esquema de inmunización intranasal.

Para poder cumplir el objetivo general planteado y en base a lo descrito en los antecedentes, se propuso analizar la interacción de la citoquina IL-12 expresada a partir de un vector de ADN (ADN-IL-12) con la subunidad B de la toxina colérica (CTB), cuando son aplicadas en un esquema de inmunización por ruta intranasal ADN-*prime*/MVA-*boost*, donde ambos vectores vacunales expresan la glicoproteína de envoltura de HIV del subtipo B (EnvB), estudiando la modulación de la respuesta inmune HIV-específica sistémica y en mucosas.

Los **objetivos específicos** fueron los siguientes:

- ✓ Corroborar la correcta expresión de las proteínas a partir de los vectores de ADN y MVA (ADN-EnvB, ADN-IL-12 y MVA-EnvB).
- ✓ Analizar el efecto de ADN-IL-12 en diferentes dosis aplicado sólo durante el *prime*, en forma individual o en combinación con CTB, en este caso administrado tanto en el *prime* como en el *boost* para potenciar la respuesta inmune celular y humoral en mucosas y sistémica frente a la proteína EnvB de HIV.

Una vez identificado el esquema de inmunización que generó la mejor respuesta inmune, los objetivos específicos fueron:

- ✓ Caracterizar *in vitro* la funcionalidad/calidad de la respuesta celular T inducida a nivel sistémico y en mucosas.
- ✓ Analizar la respuesta celular inmune en fase de memoria y caracterizar las distintas subpoblaciones T-CD8 específicas.
- ✓ Evaluar *in vivo* la calidad de la respuesta celular T inducida.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos Biológicos

1.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron: BHK-21, 293T y 3T3. Las células BHK-21 (ATCC Cat No CCL-10) son fibroblastos de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*). Las células 293T (ATCC Cat No CRL-3216) derivan de riñón de feto humano con morfología epitelial y se caracterizan por presentar una alta eficiencia de transfección. Las células 3T3 (ATCC Cat No CL-173) derivan de fibroblastos de embrión de ratón (*Mus musculus*). Todas las líneas celulares utilizadas son adherentes, y fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco BRL, USA) suplementado con 2 mM de L-glutamina (Gibco BRL), 100 U/ml de penicilina (Gibco BRL) y 0,1 mg/ml estreptomina (Gibco BRL) y 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor) (DMEMc 10%). Para su mantenimiento, se realizaron pasajes en medio de cultivo.

1.2. Virus

El virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) recombinante que codifica la proteína gp-160 completa de HIV-1 IIIB (MVA-EnvB) utilizado en este estudio fue previamente descrito (108) y gentilmente cedido por el Dr. Mariano Esteban (Madrid, España).

1.3. Vectores de ADN

Se utilizaron dos plásmidos como vectores de expresión eucariota. El plásmido de ADN (pCR3) que expresa la proteína gp-120 modificada para el uso optimizado de codones (syngp120 mn V3 LAI) de HIV-1 (ADN-EnvB) descrito previamente (109) y cedido gentilmente por Jürgen Haas (Munich, Alemania). El vector ADN (PI19) conteniendo la secuencia codificante para interleuquina 12 (IL-12) murina (genes p35 y p40, ADN-IL-12) (110, 111) fue amablemente provisto

por el Dr. Mariano Esteban (Madrid, España). Los esquemas de los plásmidos son descriptos en la figura 8 (Resultados, Parte I).

2. Preparación de los stocks de vectores

2.1. Vectores ADN

2.1.1. Obtención de ADN plasmídico

Bacterias DH5- α transformadas con ADN plasmídico fueron conservadas en 15% glicerol a un temperatura de -80 °C. Se realizaron estrías en placas de Petri con agar-LB + ampicilina (0,1 mg/ml) y se dejó toda la noche a 37 °C para la obtención de colonias individuales. A partir de una de ellas, se realizó un cultivo líquido de LB + ampicilina de 5 ml y se crecieron a 37 °C durante toda la noche en agitación. A partir de este cultivo, se generó otro de mayor volumen para realizar la extracción del plásmido.

Los plásmidos fueron purificados mediante el kit de purificación Maxi-prep libre de endotoxinas (NucleoBond Xtra Maxi Plus EF, Macherey-Nalgen, Alemania) utilizando material libre de pirógenos. El ADN fue resuspendido en una solución salina de TE (5 μ g/ μ l aproximadamente), libre de endotoxinas y luego se cuantificó por espectrometría (BIORAD) midiendo la absorbancia a 260 nm. Luego de cada purificación se corroboró la identidad y calidad del producto obtenido por digestión del ADN con las enzimas de restricción apropiadas (Hind III + Not I para ADN-EnvB y Eco RI + BamHI para ADN-IL-12) y posterior visualización del patrón de corte mediante la corrida electroforética en un gel de agarosa.

2.1.2. Transfección de células con ADN plasmídico

Células 293T y 3T3 crecidas en placas de 6 pocillos hasta un 80-90% de confluencia fueron transfectadas con 10 μ l de lipofectamina (Lipofectamine 2000, Invitrogen) en 250 μ l de medio Optimem (Gibco) utilizando 5 μ g de ADN plasmídico durante 5 h a 37 °C en una atmósfera húmeda

con 5% de CO₂. Luego, se retiró el medio de transfección y se agregó 2 ml de DMEM con 2% SFB en cada pocillo. Tras luego de 48 h, en el caso de ADN-IL-12, se recogió el sobrenadante del cultivo, el cual se centrifugó para retirar los restos celulares, y se guardó a -80 °C. En cambio, para ADN-EnvB, se obtuvieron las células que fueron centrifugadas y guardadas en seco a -20 °C.

2.1.3. Control de expresión a partir de los vectores ADN

2.1.3.1. Interleuquina IL-12 murina

Para corroborar la correcta expresión de la citoquina IL-12 murina se utilizó un kit comercial (OptEIA, BD PharMingen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se cuantificó la concentración de IL-12 en sobrenadante de cultivos de células 293T y 3T3 previamente transfectadas con el vector ADN-IL-12.

2.1.3.2. Proteína gp-120 de HIV

Para corroborar la correcta expresión de gp-120 a partir del vector ADN-EnvB, células 293T fueron transfectadas como previamente descrito y luego se realizó un Western Blot (ver sección 4.1 de Materiales y Métodos).

2.2. Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA)

2.2.1. Infección de células

Células BHK-21 crecidas y adheridas en placa con 90% de confluencia, fueron infectadas con MVA-EnvB diluido en DMEM sin suero e incubadas durante una hora a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ para permitir la adsorción del virus. Luego se retiró el inóculo viral y posteriormente, se agregó DMEM con 2% de SFB y se dejó durante 48 h para luego recoger las células infectadas en el caso de la generación de un *stock* viral o fijar las células en la placa en el caso de realizar la titulación por inmunotinción.

2.2.2. Generación de stock viral

El virus MVA-EnvB se creció a gran escala infectando células BHK-21 en 25 placas de 150 mm de diámetro a baja MOI (multiplicidad de infección) de aproximadamente 0,1 según lo descrito en el punto anterior (ver sección 2.2.1 de Materiales y Métodos). Se recogieron las células infectadas luego de 48 h cuando se evidenció un efecto citopático casi completo y se resuspendieron en 9 ml de buffer Tris, (pH 9, 10 mM) para luego guardarlos a -80 °C hasta su posterior purificación.

2.2.3. Purificación del stock viral para inmunizar

El virus fue liberado de las células BHK-21 por sonicación. Para ello, las células mantenidas en hielo sufrieron un primer ciclo de sonicación que consistió en 3 pulsos de 10 s de sonicación y 10 s de descanso. Luego, se centrifugó a 1500 rpm, a 4 °C durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante. Al *pellet*, se agregó 4 ml de buffer Tris, (pH 9, 10 mM) para realizar 2 ciclos más de sonicación. Una vez terminados los 3 ciclos y juntados todos los sobrenadantes, se sembró en tubos de ultracentrífuga un colchón con 10 ml de sacarosa 45% y se agregó 3,5 ml del sobrenadante. Luego de sellar los tubos, se procedió a ultracentrifugar a 30.000 rpm, a 4 °C durante 1 h. Finalizado esto, se retiró la sacarosa, y el *pellet* se resuspendió en 2 ml de buffer Tris (pH 9, 10 mM) para luego alicuotar y guardar a -80 °C.

2.2.4. Titulación por inmunotinción.

La titulación del *stock* viral se realizó por inmunotinción (112). Para esto, células BHK-21 fueron infectadas como se describió anteriormente (ver sección 2.2.1 de Materiales y Métodos) en placas de 6 pocillos, con diferentes diluciones, seriadas al décimo. A las 48 h se lavaron y fijaron con metanol-acetona (1:1). Luego de un lavado con PBS se incubó con un anticuerpo policlonal anti-virus Vaccinia hecho en conejo (USBiological) a una dilución 1:1000 en PBS 3% SFB (1,5 h a

temperatura ambiente). Luego de 3 lavados con PBS, se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa hecho en cabra (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:1000 en PBS 3% SFB, 1,5 h a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS se revelaron los puntos con una solución 0,85 µg/ml de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich) conteniendo 0,03% de H₂O₂ y 0,03% sulfato de níquel (3%). Los focos de infección se evidenciaron por un precipitado color negro sobre la monocapa celular.

Se contaron las unidades infecciosas por pocillo que equivalen a las unidades formadoras de placas (UFP) y se calculó la cantidad por ml. El cálculo del título se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/ml} = \frac{\text{Volumen de infección}}{\text{Número de placas de lisis}} \times \text{factor de dilución}$$

Siendo el volumen de infección 0,4 ml y el factor de dilución (10, 100, 1000...) según la dilución en la cual se contaron las placas.

2.2.5. Control de expresión de la proteína recombinante a partir de MVA-EnvB

Células BHK-21 infectadas con MVA-EnvB en una placa p60 (ver sección 2.2.1 de Materiales y Métodos) fueron recogidas a las 48 h para verificar la expresión de gp-160 mediante la técnica de Western Blot (ver sección 4.1 de Materiales y Métodos).

3. Inmunizaciones y manejo de animales

3.1. Ratones y manejo de animales

Ratones hembras BALB/c (H-2d), libres de patógenos específicos (SPF) de 6 a 8 semanas de edad fueron provistos por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata, Buenos Aires. Los animales, fueron mantenidos en el bioterio del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Todos los experimentos fueron llevados

a cabo siguiendo las normas de buenas prácticas del manejo de animales de laboratorio del Instituto de Investigaciones de Animales de Laboratorio, Consejo Nacional de Investigaciones de Estados Unidos (Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council). El protocolo fue aprobado por el comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (Número de permiso: 508/2009).

3.2. Inmunización intranasal

Los vectores vacunales junto con los adyuvantes, fueron diluidos en PBS estéril de manera que cada dosis tenga un volumen final de 20 μ l. Los ratones fueron pesados previamente a la inyección de la anestesia por ruta intraperitoneal que consistió en una mezcla de xilacina/ketamina (100 mg de ketamina y 10 mg de xilacina/kg ratón). Una vez anestesiados, se ubicaron a los ratones boca arriba y se procedió a inmunizarlos por ruta intranasal. Para ello, se utilizó una pipeta y se les aplicó gota a gota 20 μ l de la dosis vacunal a cada uno (10 μ l por cada nostril).

3.3. Esquema de Inmunización

Todos los grupos de ratones fueron inmunizados con una primera dosis (*prime*) de 50 μ g de ADN-EnvB y 14 días más tarde se administró una dosis de refuerzo (*boost*) con 10^7 UFP de MVA-EnvB por ratón. La dosis y combinación de adyuvantes aplicados en el *prime* y/o en el *boost* se describen en la tabla 6 (Resultados, Parte II). Brevemente, en los grupos IL-12₅₀ y en IL-12₁₀₀, el ADN-IL-12 fue administrado durante el *prime* en la dosis indicada (50 o 100 μ g). Los grupos CTB y CT corresponden a la subunidad B de la toxina colérica (CTB, Sigma-Aldrich) y la toxina colérica completa (CT, Sigma-Aldrich) respectivamente. Cada una fue resuspendida en agua tridestilada estéril y luego diluida en PBS de manera que la dosis tuviese 10 μ g tanto en el *prime* como en el *boost*. Por último, los grupos IL-12₅₀+CTB e IL-12₁₀₀+CTB, son la combinación de ambos adyuvantes: IL-12 en la dosis indicadas junto con 10 μ g de CTB administrado en el *prime* y

nuevamente 10 µg de CTB en el *boost*. El número de animales de cada grupo experimental varía de 3 a 6, dependiendo del experimento y es indicado en cada uno de ellos.

3.4. Toma de muestras

Diez, 30 o 53 días luego de la última inmunización (*boost*), se procedió a la toma de muestras. Para ello, previamente se anestesió a los animales con una mezcla de xilacina/ketamina. Primero se obtuvo la muestra de sangre por punción cardíaca y, luego del sacrificio por dislocación cervical, se obtuvieron muestras de lavados vaginales. A continuación, se extirparon los bazo y se extrajeron las muestras de ganglios linfáticos y del tracto genital (Figura 7).

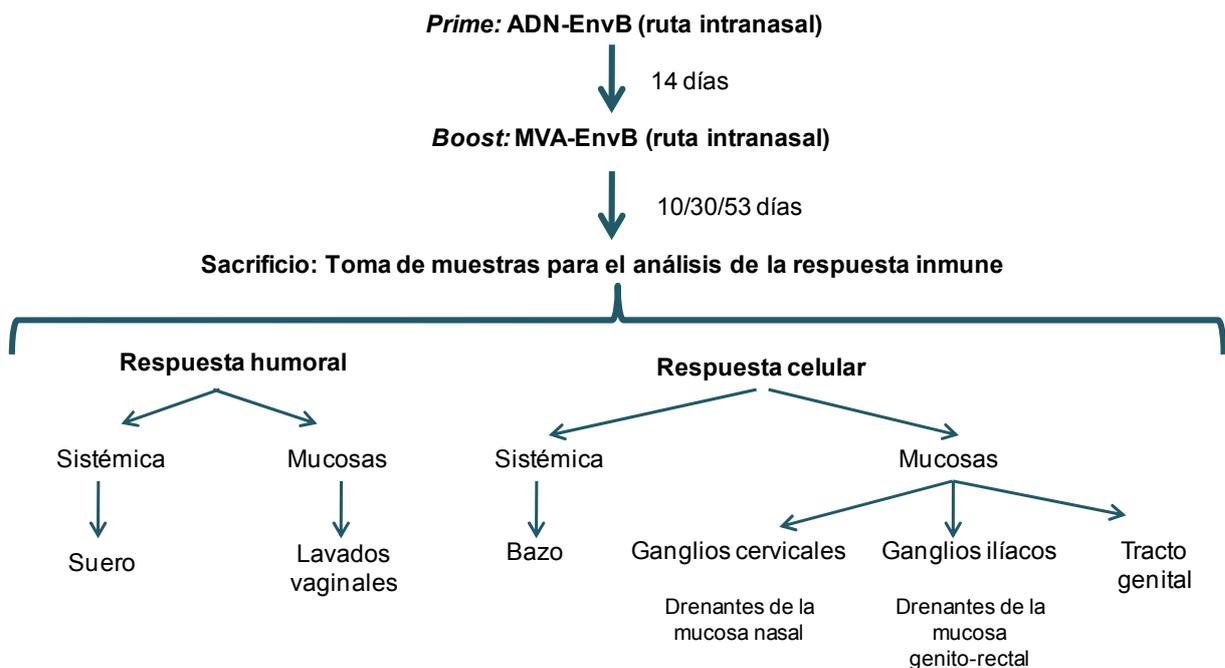


Figura 7. Esquema de inmunización y toma de muestras.

En la parte superior de la figura, se muestra el esquema de inmunización aplicado (*prime-boost*), detallando la ruta y la cantidad de días hasta la toma de muestras. En la parte inferior, se indican las muestras obtenidas para el análisis de la respuesta inmune humoral y celular, a nivel sistémico y en mucosas.

3.4.1. Suero

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción cardíaca de ratones previamente anestesiados. La sangre de cada uno de los ratones en forma individual se dejó durante 4 h a temperatura ambiente para que se forme el coágulo y luego se mantuvo a 4 °C toda la noche. Posteriormente, se separó el suero y tras centrifugar durante 10 minutos a 4.000 rpm para asegurarse que no quedaran eritrocitos. Las muestras de suero de los ratones individuales fueron guardados a -20 °C.

3.4.2. Lavados vaginales

Las muestras de lavados vaginales fueron obtenidas introduciendo 50 µl de PBS conteniendo inhibidores de proteasa en el canal vaginal con una pipeta, y luego, pipeteando 10 veces a modo de lavado tratando de recuperar el mayor volumen posible (39). Este proceso fue repetido 2 veces en cada ratón. Las muestras obtenidas fueron recogidas en un mismo tubo por grupo de ratones y luego se centrifugaron para remover restos celulares. Los lavados vaginales se conservaron a -20 °C.

3.4.3. Bazos: Obtención de esplenocitos

Se aislaron los esplenocitos en condiciones estériles usando tamices descartables (*cell strainers*, BD). Se lisaron los glóbulos rojos con una solución de NH₄Cl 0,1 M en agua destilada, utilizando 4 ml por bazo, durante 4 minutos en hielo. Luego de 2 lavados con medio RPMI 1640 (RPMI, Gibco BRL) conteniendo 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (Gibco BRL), 2 mM L-glutamina (Gibco BRL), HEPES y β-Mercaptoetanol (RPMIc), con 5% SFB (Natocor) (RPMIc 5% SFB) se resuspendieron las células en RPMIc con 10% de SFB (RPMIc 10% SFB) y se procedió a contar las células en una cámara de Neubauer con azul de tripán.

3.4.4. Ganglios cervicales e ilíacos: Obtención de linfocitos

Linfocitos del tejido linfoide asociado a la mucosa nasal (ganglios cervicales) y tejido linfoide asociado a la mucosa genito-rectal (ganglios ilíacos) fueron aislados con métodos de rutina. Brevemente, se aislaron los linfocitos en condiciones estériles utilizando tamices descartables (*cell strainers*, BD). Luego de 2 lavados con medio RPMIc 5% SFB se resuspendieron las células en RPMIc 10% SFB y se procedió a contar las células en una cámara de Neubauer con azul de tripán. El rendimiento obtenido en ganglios cervicales fue entre 11,5 y 30 millones de células por ratón. En el caso de ganglios ilíacos, el rendimiento fue mucho menor, obteniendo entre 2 y 10 millones de células por ratón.

3.4.5. Tracto genital

Linfocitos del tracto urogenital fueron obtenidos como se describió previamente (39, 113). Brevemente, el tracto urogenital (vagina, cérvix y cuello uterino) fueron asépticamente removidos y el tejido fue abierto longitudinalmente, luego cortado en pequeños trozos y lavados con RPMIc 5% SFB. Los segmentos de tejido fueron disociados enzimáticamente con una mezcla de colagenasa tipo VIII (Sigma-Aldrich) y dispasa I (Roche Diagnostics, Alemania) diluidos en RPMIc 5% SFB e incubados durante 30 minutos a 37 °C con agitación. Se realizaron 3 ciclos de digestión y luego, los linfocitos obtenidos (por cada grupo de ratones) fueron enriquecidos poniendo la suspensión celular en un gradiente discontinuo de 75% y 40% de Percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, U.K.). Luego de la centrifugación realizada a 1700 rpm durante 20 minutos, la interfase fue extraída, lavada y finalmente, las células obtenidas fueron resuspendidas en RPMIc 10% SFB para luego contarlas en cámara de Neubauer con azul de tripán. El rendimiento final obtenido en el tracto genital fue de aproximadamente 7 millones de células por ratón como máximo.

4. Técnicas Inmunológicas

4.1. Western Blot

El *pellet* celular se lisó en buffer RIPA (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, EDTA 5 mM, SDS 1%, Triton X-100 1%, Desoxicolato de sodio 1%) en presencia de inhibidores de proteasas (PIERCE), durante 40 minutos a 4 °C. Luego se centrifugó 20 minutos a 14.000 rpm para separar la fase soluble de la insoluble, conservándose el sobrenadante. Se determinó la concentración de proteínas totales en el sobrenadante de los lisados mediante el kit Micro BSA Protein Assay (PIERCE) y se sembró en un gel de 10% de poliacrilamida con SDS (condiciones desnaturalizantes). Se realizó la corrida electroforética (entre 75 y 100 mV, voltaje constante) y luego la transferencia a membrana de nitrocelulosa (250 mA, amperaje constante) (Amersham). Se bloqueó la membrana con una solución de bloqueo: TBS (10 mM Tris·Cl, 150 mM NaCl, pH 7.5) con 0,05% Tween-20 (TBS-T) y 2% de BSA (albumina bovina sérica, Sigma-Aldrich). La presencia de EnvB se evidenció incubando la membrana con un anticuerpo anti-Gp-120 policlonal hecho en conejo, diluido 1:1000, en solución de bloqueo. Luego de 3 lavados con TBS-T, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (HRP) hecho en cabra (Sigma-Aldrich) diluido 1:2000 durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Al finalizar esta última incubación, se lavó 3 veces y se procedió con la detección de la expresión de las proteínas revelando las membranas con el reactivo ECL Western blotting (Amersham)

4.2. Estímulos para evaluar respuesta inmune

4.2.1. Péptidos

Se utilizó el péptido inmunodominante en la cepa de ratones BALB/c (H-2d) denominado V3, correspondiente a la proteína gp-160 y restringido a MHC clase I (p18IIIB-I10 RGPGRAFVTI) previamente caracterizado (114, 115). Además, se utilizaron los péptidos PTE (del inglés: *Potential T-cell epitopes*) que fueron obtenidos del programa de provisión de reactivos del Instituto Nacional

de Salud de Estados Unidos (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program). El set de péptidos PTE consta de 480 péptidos individuales con una longitud de 15 aminoácidos. Estos representan las secuencias más frecuentes de cepas de HIV-1 circulantes en el mundo y abarcan todos los potenciales epítopes celulares T de la proteína Env con una frecuencia igual o mayor que el 15% de los subtipos A, B, C y no ABC. En este trabajo, los péptidos PTE fueron agrupados en 5 *pooles* que representan la proteína completa: Gp120₁ (73 péptidos, aa 1 a 154), Gp120₂ (73 péptidos, aa 155 a 284), Gp120₃ (105 péptidos, aa 285 a 511), Gp41₁ (114 péptidos, aa 512 a 689) y Gp41₂ (115 péptidos, aa 690 a 842). En todos los casos, los péptidos PTE liofilizados fueron resuspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) a una concentración de 40 µg/µl y conservados a -20 °C.

4.2.2. Proteína

La proteína recombinante gp-120 HIV-1 BaL (subtipo B) fue obtenida del programa de provisión de reactivos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program).

4.3. ELISPOT: Cuantificación de células T específicas secretoras de IFN-γ o IL-2

El ensayo de ELISPOT fue realizado con linfocitos aislados en fresco y cultivados en RPMIc 10% SFB como fue descrito previamente (39). Brevemente, placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (MultiScreen IP plates, Millipore, USA) se incubaron con el anticuerpo de captura anti-IFN-γ o anti-IL-2 de ratón diluido en PBS, como indica el fabricante (BD ELISPOT mouse IFN-γ ELISPOT pair y BD ELISPOT mouse IL-2 ELISPOT pair respectivamente), toda la noche a 4 °C. Las células fueron sembradas en los pocillos por duplicado o triplicado, entre $0,125 \times 10^6$ a 10^6 células por pocillo, junto con el péptido V3 o los péptidos PTE a una concentración final de 2 µg/ml para cada péptido en RPMIc 10% SFB. Como control negativo se utilizó RPMIc 10% SFB con el

agregado de 0,08% de DMSO para el V3 y la proporción necesaria para los péptidos PTE (diluyente de las soluciones *stock* de los péptidos). Como control positivo se usó el estímulo inespecífico concanavalina A (ConA) en una concentración de 1 µg/ml (Sigma-Aldrich). Las placas fueron incubadas durante 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂ y luego se lavaron 2 veces con agua tridestilada incubando de 3 a 5 minutos, seguidos por 3 lavados con PBS con 0,05 % de Tween-20 (PBS-T). Posteriormente se incubaron las placas durante 16 h a 4 °C con el anticuerpo de detección conjugado a biotina (BD ELISPOT mouse IFN-γ/IL-2 ELISPOT pair) diluido en PBS 10% SFB. Al día siguiente se lavó e incubó la placa durante 1 h con estreptavidina conjugada a peroxidasa (HRP, BD) diluida 1/800 en PBS 10% SFB. Luego de 6 lavados, 4 con PBS-T y 2 con PBS, se revelaron los puntos (*spots*) con una solución de 1 mg/ml del sustrato DAB (Sigma-Aldrich) conteniendo 0,03% de H₂O₂. La reacción se detuvo por lavados con agua. Se adquirió la imagen de cada pocillo con un lector de placas de ELISPOT (Cellular Technology Ltd.) mediante el programa *ImmunoSpot Acquisition*. El análisis de los datos se realizó con el programa ImmunoSpot (Cellular Technology Ltd.). Los resultados se expresan como células secretoras de IFN-γ o IL-2 por millón de células (CS IFN-γ o IL-2/10⁶ células). Se restaron los valores de los controles negativos. Se consideró una respuesta positiva cuando el valor promedio con el estímulo específico superaba al obtenido en el control negativo + 3 veces el desvío estándar.

4.3.1. Ensayo de avidéz

El ensayo de avidéz funcional definido como el umbral de activación en respuesta a concentraciones definidas de péptido exógeno, se realizó mediante la técnica de ELISPOT siguiendo protocolos previamente descritos (116). Se utilizó una única cantidad de células de bazo por pocillo (por grupo) estimuladas con diluciones seriadas del péptido V3 (de 20 µg/ml a 0,00002 µg/ml). El número de células por pocillo fue seleccionado de manera de obtener aproximadamente 200 CS IFN-γ/pocillo cuando el péptido está en altas concentraciones (en exceso). Se calculó la concentración de péptido requerida para inducir el 50% de la respuesta máxima de células

secretoras de IFN- γ (DS_{50} , dosis sensibilizante) a través de una curva sigmoidea de dosis-respuesta (programa GraphPad).

4.4. Titulación de anticuerpos por ELISA

Se cuantificaron anticuerpos específicos para gp-120 utilizando la proteína purificada gp-120 LAV (Protein Sciences Corp) en muestras de suero y lavados vaginales siguiendo procedimientos descritos anteriormente (117). Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) con la proteína purificada en una concentración de 1 μ g/ml diluida en buffer carbonato (0,84 g $NaHCO_3$ + 0,356 g Na_2CO_3 + 100 ml agua destilada, pH: 9,6). Se recubrieron las placas con 50 μ l/pocillo y se incubó a 4 °C durante una noche. Las placas se bloquearon 1,5 h a 37 °C, con PBS-T + 10% SFB. Luego de 3 lavados con PBS-T se agregó 50 μ l de los sueros de los ratones individuales diluidos en PBS-T + 10% SFB en una dilución de 1/50, o con las muestras de lavados vaginales en una dilución 1/5 durante 1 h a 37 °C. Luego, se lavó la placa y se incubó con 100 μ l por pocillo del anticuerpo de detección, anti-IgG, IgG1, IgG2a (dilución: 1/5000) para las muestras de suero o anti-IgA (dilución: 1/2500) para lavados vaginales durante 1 h a 37 °C. En todos los casos, los anticuerpos de detección eran anti-ratón hecho en cabra (Invitrogen) y estaban conjugados a biotina. Luego se lavo e incubó con 100ul por pocillo de estreptavidina conjugada a peroxidasa (HRP, BD) diluida 1/1000 en PBS-T 10% SFB durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de realizar 6 lavados con PBS-T se reveló el ensayo con el sustrato TMB (Sigma-Aldrich) agregando 50 μ l por pocillo. Se detuvo la reacción con el agregado de 50 μ l por pocillo de H_2SO_4 2 N y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA (Labsystems, Chicago, Ill.).

4.5. Análisis de la respuesta inmune celular mediante técnicas de citometría de flujo.

4.5.1. Cuantificación de la producción de citoquinas mediante el CBA kit

Las células de ratón (células de bazo o de ganglio ilíacos) fueron estimuladas en RPMIc 10% SFB en placa de 96 pocillos fondo en U por triplicado (10^6 células/pocillo) con el péptido V3 (2

µg/ml) o con la proteína recombinante gp120 HIV-1 BaL (1 µg/ml). Para los controles positivos y negativos, se utilizaron células estimuladas con ConA (1 µg/ml), y medio RPMc con el porcentaje de DMSO equivalente, respectivamente. Luego de 72 h de incubación a 37 °C en 5% CO₂, los sobrenadantes de los cultivos fueron guardados a -80 °C. Para cuantificar la producción de citoquinas se utilizó el kit de CBA (Cytometric Bead Array, BD) que cuantifica citoquinas Th1/Th2 (IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-5) de ratón según las indicaciones del producto. La adquisición de datos se realizó en el citómetro de flujo (FACS Canto, BD). Los valores fueron considerados una respuesta positiva cuando la cantidad de citoquina cuantificada superaba el valor promedio encontrado en el control negativo de cada grupo más 3 veces el desvío estándar.

4.5.2. Ensayo simultáneo de marcación intracelular de citoquinas y actividad citotóxica.

Células de ratón provenientes de bazo o tracto genital fueron estimuladas con el péptido V3 en una concentración de 2 µg/ml durante 5 h en una placa de 96 pocillos fondo en U (10⁶ células/pocillo) a 37 °C en 5% de CO₂ en presencia de anticuerpo coestimulador anti-CD28 (1 ng/ml; BD Pharmingen), los inhibidores del tráfico intravesicular brefeldina A (1 µl/ml BD, GolgiPlug) y monensina (0,7 µl/ml; BD, GolgiStop) y además, con los anticuerpos monoclonales anti-CD107a y anti-CD107b, ambos marcadores conjugados a FITC (CD107a/b-FITC; BD Pharmingen), fueron agregados en algunos experimentos. Los controles negativos y positivos, consistieron en células estimuladas con RPMlc + 0,08% DMSO, o PMA/ionomicina (10 ng/ml PMA + 250 ng/ml ionomicina (Sigma-Aldrich) respectivamente. Luego, las células fueron lavadas e incubadas durante 30 minutos a 4 °C con los anticuerpos de superficie: CD3-APC y CD8-PerCP (BD Pharmingen) y aquellas viables fueron identificadas con el kit de tinción fija de células muertas (LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit, Invitrogen). Posteriormente, las células fueron permeabilizadas y fijadas usando el kit de fijación/permeabilización (Cytofix/Cytoperm, BD). Para la tinción intracelular se utilizaron los anticuerpos anti-IFN-γ-PE, anti-TNF-α-PE-Cy7 y anti-IL-2-FITC en caso de que correspondiera (BD, Pharmingen) incubando durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Finalmente, las células fueron

lavadas 2 veces, y mantenidas a 4°C hasta la adquisición de datos en el citómetro de flujo (FACS Canto, BD). El análisis de los datos fue hecho con el programa BD FACSDiva. El ajuste de los valores de voltaje del instrumento y la compensación de fluorescencia fueron realizados cada vez que se realizaba un experimento usando células sin marcar y con marcas simples de superficie. Controles de isotipo fueron también incluidos en cada experimento.

4.5.3. Evaluación de proliferación celular específica mediante tinción con CFSE

Se siguió la metodología descrita anteriormente (118). Esplenocitos fueron resuspendidos (40×10^6 células/ml) en PBS + 1% SFB y teñidas con 1,25 μ M de carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE) (Invitrogen, USA) a 37 °C durante 8 minutos. La reacción fue detenida con SFB y las células fueron lavadas con RPMIc. Luego, las células fueron resuspendidas en RPMIc 10% SFB a una densidad de 5×10^6 /ml. Las células se cultivaron en una placa de 12 pocillos (10^7 células por pocillo) durante 4 días a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y estimuladas con 2 μ g/ml de péptido V3, o en ausencia de estímulo (RPMIc 10%, control negativo). Células estimuladas con ConA fueron utilizadas como control positivo. Luego de los 4 días, los linfocitos fueron recogidos de la placa, contados y lavados con RPMIc para posteriormente marcarlas con anticuerpos de superficie (CD3-APC y CD8-PerCP) y las viables fueron identificadas con el kit de tinción fija de células muertas (LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit, Invitrogen). Las células fueron adquiridas en el citómetro de flujo (FACSCanto, BD).

4.5.4. Caracterización de las poblaciones celulares T de memoria

Las células previamente marcada con CFSE y luego de 4 días de estimulación (ver sección 4.5.3 de Materiales y Métodos) fueron recogidas de la placa, contadas y lavadas con RPMIc. Luego, se separaron 10^6 células para marcar con anticuerpos de superficie anti-CD3-APC, CD8-PerCP, CD44-PE-Cy7 y CD62L-APC (BD, Pharmingen). Además, se agregó el marcador de viabilidad de tinción fija de células muertas (LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit, Invitrogen). Las células

fueron incubadas con los anticuerpos durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente, las células fueron lavadas 2 veces, y mantenidas a 4 °C hasta la adquisición de datos en el citómetro de flujo (FACS Canto, BD). El análisis de los datos fue hecho con el programa BD FACSDiva.

4.5.5. Evaluación de citotoxicidad *in vivo*

El ensayo de citotoxicidad *in vivo* fue realizado como previamente descrito con algunas modificaciones (119, 120). Esplenocitos de ratones *naïve* fueron mezclados y resuspendidos a una concentración de 40×10^6 células/ml en PBS 1% SFB. Luego se separaron en dos poblaciones para marcar con dos diferentes concentraciones de CFSE (Invitrogen): 1 μ M (CFSE_{bajo}) y con 8 μ M (CFSE_{alto}). La marcación se realizó a 37 °C durante 8 minutos en oscuridad y fue detenida con un volumen de SFB igual al que se llevó a cabo la reacción, pero a temperatura ambiente. Luego de lavar con RPMIc 10% SFB, las células CFSE_{alto} fueron pulsadas con el péptido V3 en una concentración final de 5 μ g/ml durante 30 minutos a 37 °C. Una vez realizados 3 lavados, las células de cada población fueron mezcladas juntas y 20×10^6 células fueron inyectadas por ruta intravenosa en los diferentes grupos de ratones. A las 4 y 16 h luego de la inyección, los ratones fueron sacrificados. Se extrajeron los bazos y fueron analizados por citometría de flujo de forma individual. La citólisis *in vivo* fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\text{Citólisis } in vivo = 1 - \frac{\text{Relación } naïve}{\text{Relación inmune}} \times 100$$

donde la relación = porcentaje CFSE_{bajo}/CFSE_{alto}.

5. Análisis de los Datos

Los análisis estadísticos para comparar la respuesta entre grupos fueron realizados usando el programa GraphPad Prism 5. Se emplearon pruebas estadísticas paramétricas (ANOVA de una

vía con la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones múltiples y la prueba T de student para la comparación de dos grupos entre sí) y por otro lado, pruebas no paramétricas (Prueba de Mann-Whitney). Para todas las pruebas, se consideró una significancia estadística con un valor de p menor a 0,05.

RESULTADOS

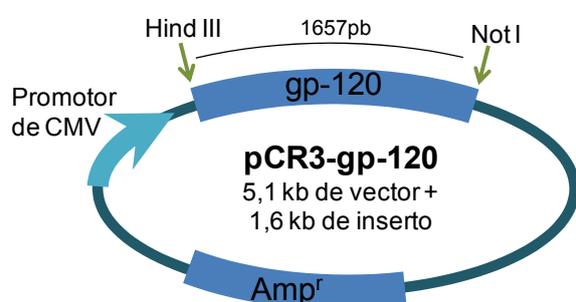
Parte I: Caracterización y control de los vectores de inmunización.

1. Vectores de ADN

1.1. Descripción de los plásmidos utilizados.

En este trabajo se utilizaron 2 plásmidos recombinantes: uno que expresa la glicoproteína de envoltura *syn* gp-120 de HIV-1 IIIB (ADN-EnvB) y otro que expresa la interleuquina 12 murina (ADN-IL-12). A continuación, en la figura 8, se muestran los esquemas de cada uno de ellos.

A. ADN-EnvB



B. ADN-IL-12

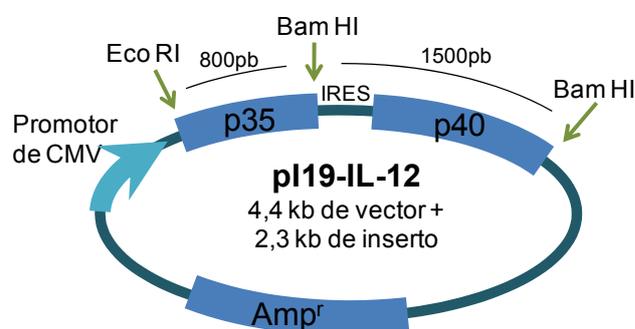


Figura 8: Esquema de los vectores de ADN utilizados.

Esquema del plásmido ADN-EnvB (A) y ADN-IL-12 (B). En ambos casos se muestran los vectores con los insertos y los sitios de corte para las enzimas de restricción indicadas con el número de pares de bases (pb) de los fragmentos de ADN que se obtienen luego de la digestión con dichas enzimas. Se muestra también el promotor, y el gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina.

En ambos vectores, las proteínas recombinantes son expresadas bajo el promotor de citomegalovirus (CMV) y además contienen la resistencia al antibiótico ampicilina (para poder seleccionar el plásmido).

El vector ADN-EnvB, posee un único sitio de corte para las enzimas de restricción Hind III y Not I. Como resultado de la reacción de digestión utilizando ambas enzimas simultáneamente se obtienen 2 fragmentos: El correspondiente a gp-120 de 1657 pb y la del vector de 5,1 kb. En el caso del vector ADN-IL-12, posee 2 sitios de corte para la enzima Bam HI y un único sitio de corte para Eco RI. Luego de la digestión se generan 3 fragmentos: El correspondiente a p35 de 800 pb, p40 de 1500 pb y el fragmento del vector de 4,4 kb.

1.2. Control de la integridad de los vectores de ADN.

Para chequear la integridad de los vectores de ADN y la presencia del inserto, una vez realizada cada purificación del plásmido, se tomó una muestra para llevar a cabo la digestión con las enzimas de restricción que liberan el inserto en cuestión y luego realizar la corrida electroforética en un gel de agarosa para determinar los tamaños de los fragmentos.

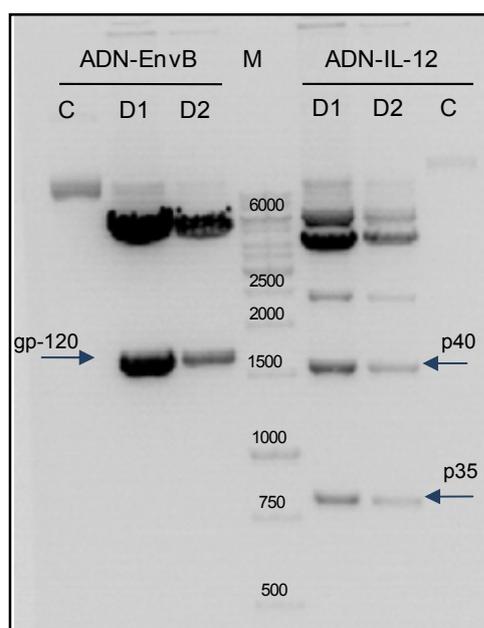


Figura 9: Control de la integridad de los plásmidos por electroforesis en gel de agarosa.

Los plásmidos recombinantes fueron cortados con las enzimas de restricción adecuadas y luego, se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa 1% para verificar su integridad.

ADN-EnvB: Plásmido recombinante para EnvB.

ADN-IL-12: Plásmido recombinante para IL-12.

C: Plásmido sin cortar.

D1: Plásmido digerido, 15 μ l.

D2: Plásmido digerido, 5 μ l.

M: Marcador de pares de base. En esta misma calle, los números representan los pares de base (pb) de la banda inferior.

En la figura 9 se puede observar que tras la digestión de ADN-EnvB (con las enzimas de restricción Hind III y Not I) se libera el fragmento correspondiente a gp-120 de 1657 pb (el otro fragmento corresponde al vector). En el caso de ADN-IL-12, se observan los dos fragmentos (digerido con las enzimas Eco RI y Bam HI), que corresponden a los insertos de 800 y 1500 pb aproximadamente que codifican para las subunidades p35 y p40 de IL-12. Se observa además, una tenue banda entre 2000 y 2500 pb debido a que la eficiencia del corte con las 2 enzimas de restricción simultáneamente no es del 100% (800 pb + 1500 pb = 2300 pb). Debido a ello, además se observa una doble banda correspondiente al vector luego de la digestión (a la altura de 4000 y 5000 pb aproximadamente).

1.3. Verificación de la expresión de IL-12 murina a partir de ADN-IL-12.

Si bien, nos aseguramos anteriormente de que el plásmido ADN-IL-12 contiene el inserto, lo importante es que además, pueda expresarse correctamente. Para verificar esto, dos líneas celulares de diferentes especies, las 3T3 de origen murino y 293T de origen humano, fueron transfectadas en pocillos de placas M6 con el plásmido ADN-IL-12 o con el plásmido vacío, sin inserto (ADN-vacío) siguiendo la metodología descrita en la sección 2.1.2 de Materiales y Métodos. Se dejaron además, células sometidas al mismo tratamiento pero que no recibieron ADN (sin ADN). A las 48 h post-transfección se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos y se procedió a la cuantificación de IL-12 murina mediante un ELISA comercial. La concentración de IL-12 secretada en los sobrenadantes fue de $1,8 \times 10^5$ pg/ml en células 3T3 y $2,29 \times 10^6$ pg/ml en las células 293T transfectadas con ADN-IL-12 (Figura 10). En cambio, con ADN vacío, solo se encontró $1,4 \times 10^3$ pg/ml y 7×10^2 pg/ml en las células 3T3 y 293T respectivamente. La diferencia encontrada en la cuantificación de IL-12 en las diferentes líneas celulares seguramente se debe a que las células 293T poseen más alta eficiencia de transfección que las células 3T3.

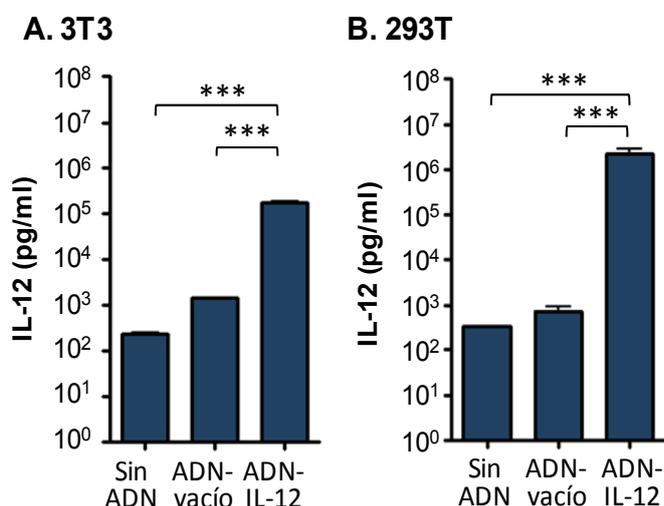


Figura 10: Expresión de IL-12 murina en sobrenadantes de cultivos de células transfectadas con ADN-IL-12.

Células 3T3 (A) y 293T (B) fueron transfectadas con ADN-IL-12 o ADN-vacío. Además se realizó un control de células en el que se le aplicó el protocolo de transfección pero no se le puso ADN (Sin ADN). Luego de 48 hs de cultivo, se recogió el sobrenadante para cuantificar IL-12 murina mediante un kit de ELISA. Se indican las diferencias estadísticas con ANOVA de una vía con la corrección de Bonferroni entre los grupos señalados: *** $p < 0,001$.

Estos experimentos demuestran que IL-12 murina es correctamente expresada a partir del vector de ADN-IL-12, tanto en líneas celulares de origen murino como de origen humano.

1.4. Verificación de la expresión de la glicoproteína de envoltura gp-120 (EnvB) a partir de ADN-EnvB.

Con el fin de corroborar la correcta expresión de la glicoproteína de envoltura gp-120 de HIV a partir del vector recombinante ADN-EnvB, células 293T fueron transfectadas con este plásmido, como se describió en la sección 2.1.2 de Materiales y Métodos, y luego fueron utilizadas para realizar un ensayo de Western Blot. Se utilizaron como control, células sin transfectar.

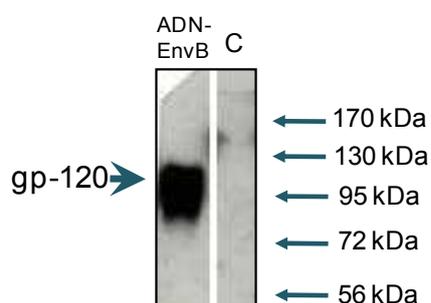


Figura 11: Expresión de EnvB a partir de ADN-EnvB por Western Blot.

Detección de gp-120 por Western Blot a partir de células 293T transfectadas con ADN-EnvB y células sin transfectar como control (C). A las 48 h, las células se recogieron del cultivo, se centrifugaron y los *pellet* se conservaron para su posterior procesamiento para Western Blot. A la izquierda de la figura se muestra la proteína que corresponde a la banda y a la derecha, el marcador de peso molecular.

Como se esperaba para las células transfectadas con ADN-EnvB, se observó una banda perteneciente a Env de 120 kDa, mientras que en aquellas células sin transfectar, la banda está ausente, evidenciando la especificidad del anticuerpo (Figura 11).

2. Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA)

2.1. Descripción del vector MVA utilizado

El vector viral utilizado en este trabajo fue un MVA recombinante que expresa la proteína gp-160 de HIV-1 IIIIB completa bajo el promotor p7,5 de Vaccinia con temporalidad de expresión temprana-tardía (39). El gen viral en donde está insertada la proteína gp-160 corresponde al de la timidina kinasa. En la figura 12 se muestra un esquema en el que se detalla la posición de los genes mencionados en el vector viral MVA-EnvB.

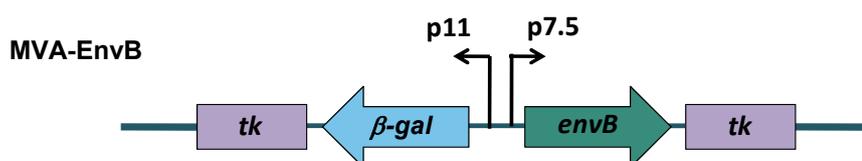


Figura 12: Esquema del gen recombinante *envB* de HIV inserto en el locus viral *tk* (timidina kinasa).

Se muestran los promotores p7,5 (de expresión temprano-tardía) y p11 (tardío) a partir de los cuales expresan *EnvB* y *β-Gal* respectivamente. Esta construcción se encuentra inserta en el locus viral de timidina kinasa.

2.2. Purificación y titulación del stock viral para inmunizar

El stock viral MVA-EnvB fue generado y purificado como se describió en la sección 2.2 de Materiales y Métodos. Una vez obtenido, se procedió a titular el stock viral por inmunotinción siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.4 de Materiales y Métodos.

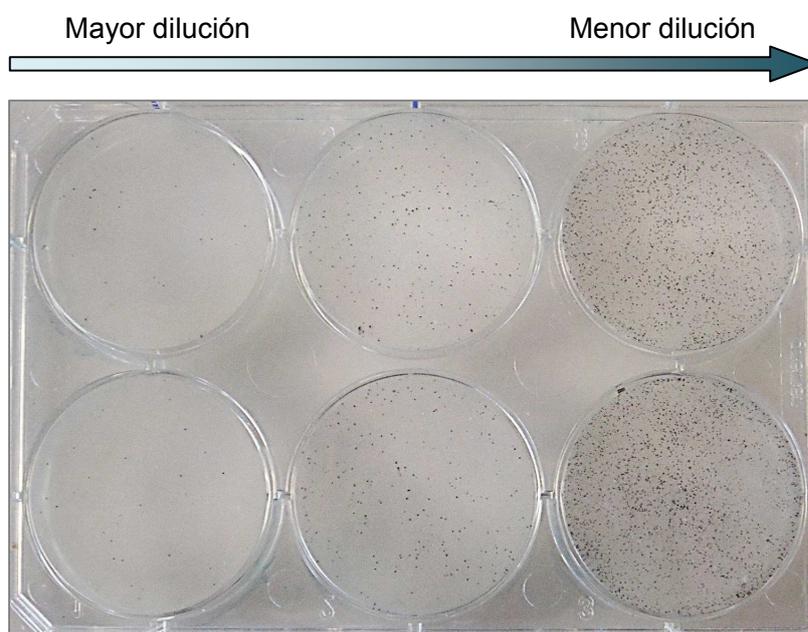


Figura 13: Foto representativa de la inmunotinción.

La placa M6 con una monocapa de células BHK-21 fue infectada con diluciones seriadas del stock viral de MVA-EnvB. Luego de 48 h, se procedió a fijar las células y realizar la inmunotinción para detectar las unidades infecciosas y poder calcular el título viral según se indica en la sección 2.2.4 de Materiales y Métodos.

En la figura 13, se muestra una foto de una placa M6 de BHK-21 empleada en una titulación viral revelada por inmunotinción. Como resultado de esto, se obtuvo un título del *stock* de MVA-EnvB de 8×10^9 UFP/ml. Este mismo *stock* fue utilizado para desarrollar todos los experimentos.

2.3. Verificación de la correcta expresión de la glicoproteína de envoltura gp-160 a partir de MVA-EnvB.

Una vez obtenido el *stock* viral, se realizaron los experimentos correspondientes para llevar a cabo la verificación de la correcta expresión de la proteína gp-160 a partir del MVA-EnvB. Para ello, monocapas de células BHK-21 fueron infectadas a una MOI de 5 con MVA-EnvB. A las 24 h post-infección se procedió a cosechar las células que fueron utilizadas para realizar un ensayo de Western Blot (Figura 14). Para este ensayo se utilizaron además, células sin infectar como control. Los resultados obtenidos muestran una banda específica de 160 kDa, correspondiente a la proteína Env (gp-160).

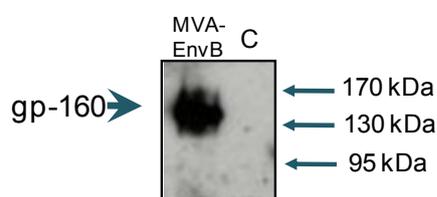


Figura 14: Expresión de EnvB a partir de MVA-EnvB por Western Blot.

Se realizó la detección de EnvB por Western Blot a partir de células BHK-21 infectadas con MVA-EnvB. También se utilizaron células sin infectar como control (C). A la derecha de la figura se muestra el marcador de peso molecular, y a la izquierda, la proteína que corresponde a la banda.

Estos resultados previos a la realización de los experimentos de inmunización muestran que efectivamente los vectores que se utilizaron a lo largo de este trabajo, tanto los vectores vacunales (ADN-EnvB y MVA-EnvB) como el que se utilizó como adyuvante (ADN-IL-12), se encuentran íntegros y que expresan correctamente la proteína recombinante.

Parte II: Inmunización intranasal con ADN/MVA junto con los adyuvantes ADN-IL-12 y CTB: efecto de la dosis y del uso combinado para seleccionar el esquema óptimo de inmunización.

1. IL-12 administrada desde un vector ADN (ADN-IL-12) posee un efecto adyuvante al ser administrado por ruta de mucosa intranasal

Estudios previos han demostrado la eficacia de la ruta de inoculación intranasal para inducir una respuesta inmune de mucosas en esquemas de vacunación en los cuales se emplearon vectores MVA (66). Sin embargo, el efecto de ADN-IL-12 como adyuvante intranasal de mucosas durante un esquema de inmunización ADN/MVA no había sido descrito en forma tan exhaustiva en bibliografía. Con tal finalidad, ratones hembras BALB/c fueron inmunizados de acuerdo a como se describe en la tabla 5, donde se muestra que todos los grupos fueron inmunizados por ruta intranasal en base a un esquema de inmunización ADN/MVA. En el día 0, un grupo de ratones recibió una primera dosis o *prime* de 50 µg de ADN-EnvB y al día 14 recibieron un refuerzo o *boost* de MVA-EnvB en una dosis de 10⁷ UFP (grupo sin adyuvante). Un segundo grupo recibió además en el *prime*, 50 µg de ADN plasmídico sin inserto (ADN-vacío) y un tercer grupo, 50 µg de ADN recombinante para IL-12 (ADN-IL-12).



Grupos	<i>Prime</i> : Día 0 (Ruta intranasal)	<i>Boost</i> : Día 14 (Ruta intranasal)
Sin adyuvante	ADN-EnvB	MVA-EnvB
ADN-vacío	ADN-EnvB + ADN-vacío (50 µg)	MVA-EnvB
ADN-IL-12	ADN-EnvB + ADN-IL-12 (50 µg)	MVA-EnvB

Tabla 5. Esquema de inmunización intranasal ADN/MVA: Efecto de ADN-IL-12

Grupos de ratones fueron inmunizados con un esquema de inmunización ADN/MVA por ruta intranasal. En el día 0, todos los grupos de ratones fueron inmunizados con el *prime* de ADN-EnvB en una dosis de 50 µg y al día 14, recibieron el *boost* de MVA-EnvB en una dosis de 10⁷ UFP. El tipo de vector de ADN y cantidad aplicada en el *prime* como adyuvante están indicados en la tabla.

A los diez días de la última inmunización, se analizó mediante ELISPOT el número de células secretoras de IFN- γ por millón de células (CS IFN- γ /10⁶ células) específicas para Env (anti-péptido V3, p18IIIB-110, restringido a MHC clase I) en células de bazo. Los resultados obtenidos son mostrados en la figura 15, donde se puede observar que la magnitud de la respuesta generada en el grupo inmunizado con ADN-IL-12 fue significativamente mayor ($p < 0,01$) en comparación al grupo inmunizado en ausencia de adyuvantes o al grupo ADN-vacío. Este incremento fue de 1,7 veces.

La respuesta obtenida en el grupo sin adyuvante (sin ADN) y en el inmunizado con ADN-vacío fue de igual magnitud, con un promedio de 134 y 129 CS IFN- γ /10⁶ células respectivamente. Esto demuestra que en el modelo murino utilizado, ADN-IL-12 posee un efecto adyuvante cuando es aplicado con la dosis del *prime* y que esto se debe a la acción de IL-12, descartando la posibilidad de un efecto adyuvante inespecífico debido a las posibles secuencias CpG que estuviesen presentes en el vector ADN desde el cual se expresa la citoquina.

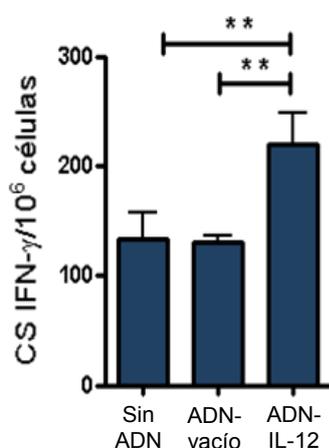


Figura 15. Evaluación del efecto adyuvante de ADN-IL-12 luego de la inmunización intranasal ADN/MVA frente al antígeno de HIV.

Grupos de 4 ratones BALB/c fueron inoculados como se describe en la tabla 5. A los diez días del *boost*, se cuantificó la respuesta celular inmune específica frente al péptido de Env mediante el ensayo de ELISPOT en mezclas de células de bazo. Las barras representan el número promedio de células secretoras de IFN- γ por millón de células (CS IFN- γ /10⁶ células) + el desvío estándar. Cada determinación fue evaluada en pocillos por triplicado. Valores obtenidos en los pocillos de los controles negativos fueron sustraídos (sin estímulo). Se indican las diferencias estadísticas con ANOVA de una vía con la corrección de Bonferroni entre los grupos señalados: ** $p < 0,01$.

2. ADN-IL-12 junto con CTB cooperan en la inducción de una respuesta inmune celular de mayor magnitud frente a un antígeno de HIV-1, tras la inmunización intranasal.

Una vez demostrada la correcta expresión de IL-12 como así también su efecto adyuvante tras ser administrada en los esquemas ADN/MVA, el próximo objetivo consistió en analizar la acción adyuvante de ADN-IL-12 en combinación con CTB.

Se diseñaron diferentes esquemas de inmunización ADN/MVA aplicados por ruta intranasal, sumando una totalidad de 7 grupos los cuales se muestran en la tabla 6. Todos los grupos de ratones recibieron la misma dosis de ADN-EnvB (50 µg) en el *prime* y de MVA-EnvB (10⁷ UFP) en el *boost*. Sumado a este esquema de inmunización basal, cada grupo difería entre sí en la administración de los adyuvantes, la dosis aplicada, o la ausencia del mismo (Grupo sin adyuvante: control).

Grupo	Primera dosis (Prime): Día 0 Ruta intranasal	Refuerzo (Boost): Día 14 Ruta intranasal
Sin adyuvante	ADN-EnvB	MVA-EnvB
CT	ADN-EnvB + CT (10 µg)	MVA-EnvB + CT (10 µg)
IL-12₅₀	ADN-EnvB + ADN-IL-12 (50 µg)	MVA-EnvB
IL-12₅₀+CTB	ADN-EnvB + ADN-IL-12 (50 µg) + CTB (10 µg)	MVA-EnvB + CTB (10µg)
IL-12₁₀₀	ADN-EnvB + ADN-IL-12 (100 µg)	MVA-EnvB
IL-12₁₀₀+CTB	ADN-EnvB + ADN-IL-12(100 µg)+ CTB (10 µg)	MVA-EnvB + CTB (10 µg)
CTB	ADN-EnvB + CTB (10 µg)	MVA-EnvB + CTB (10 µg)

Tabla 6. Esquemas de inmunización intranasal

Todos los grupos fueron inmunizados con un esquema de inmunización ADN/MVA por ruta intranasal. En el día cero, los grupos de ratones fueron inmunizados con el *prime* de ADN-EnvB, en una dosis de 50 µg. Al día 14, recibieron el *boost* de MVA-EnvB en una dosis de 10⁷ UFP (unidades formadoras de placa). Los adyuvantes utilizados y la dosis administrada en cada uno de los grupos se detallan en cada caso.

Diferentes reportes previos han demostrado que la dosis de IL-12 inclusive cuando es administrada desde una vector de ADN como en este caso, puede tener un efecto significativo en la respuesta adyuvante final ejercida sobre la respuesta inmune adaptativa frente al antígeno de interés (101, 110, 121).

En base a estos antecedentes se decidió evaluar si la dosis del vector ADN que expresaba IL-12 tenía algún efecto sobre la respuesta inmune generada, para lo cual se compararon dos grupos de ratones que recibieron ADN-IL-12 en el *prime* en las siguientes dosis: 50 µg (Grupo IL-12₅₀) y 100 µg (Grupo IL-12₁₀₀). Por otro lado, se analizó el grupo inmunizado con CTB que recibió este adyuvante tanto en el *prime* como en el *boost* en una dosis de 10 µg (Grupo CTB) y se lo comparó con el esquema de inmunización aplicado en el grupo control para evaluar si CTB funciona

como adyuvante de mucosas en esquemas de inmunización ADN/MVA. Otros dos grupos fueron inmunizados con la combinación de ADN-IL-12 en las 2 dosis utilizadas acompañada de CTB durante el *prime* y la aplicación nuevamente de CTB en el *boost* (Grupo IL-12₅₀+CTB y el Grupo IL-12₁₀₀+CTB) con el fin de estudiar si la combinación de ambos adyuvantes generaba una respuesta inmune mayor en comparación a los esquema de inmunización en donde fueron aplicados los adyuvantes en forma individual. Como control positivo se utilizó al grupo inmunizado con CT tanto en el *prime* como en el *boost*, ya que está reportado que es un potente adyuvante de mucosas (39, 105).

A los diez días de la última inmunización, se analizó la respuesta celular inmune específica generada a nivel sistémico en células de bazo y también, en ganglios linfáticos drenantes de la mucosa nasal (ganglios cervicales, sitio inductor) y de la mucosa genito-rectal (ganglios ilíacos, sitio efector). En la figura 16 se muestran los datos obtenidos en un experimento representativo, en el cual se evaluó la respuesta inmune específica frente a Env con un ensayo de ELISPOT.

En el bazo (Figura 16A, panel superior) se puede observar que las dos dosis de ADN-IL-12 aplicadas en forma individual con el antígeno generaron una respuesta similar, representando un incremento de aproximadamente 2 veces con respecto a la magnitud encontrada en el grupo sin adyuvantes (aunque estas diferencias no alcanzaron la significancia estadística). Lo mismo sucede cuando CTB es aplicada: hay un incremento de la respuesta inmune de 2 veces con respecto del grupo sin adyuvantes (que tampoco llega a ser estadísticamente significativo). En cambio, en los grupos en los que se administró CTB durante la dosis del *prime* junto con ADN-IL-12 y luego CTB en el *boost*, se observó un incremento significativo en el número de células secretoras de IFN- γ con respecto al grupo que recibió la misma dosis de ADN-IL-12, pero en ausencia de CTB (grupo IL-12₅₀ frente al grupo IL-12₅₀+CTB, $p < 0,001$ e IL-12₁₀₀ en comparación con IL-12₁₀₀+CTB, $p < 0,01$). Cabe destacar que la menor dosis de ADN-IL-12 + CTB (IL-12₅₀+CTB) es la que generó la mayor respuesta (Figura 16A).

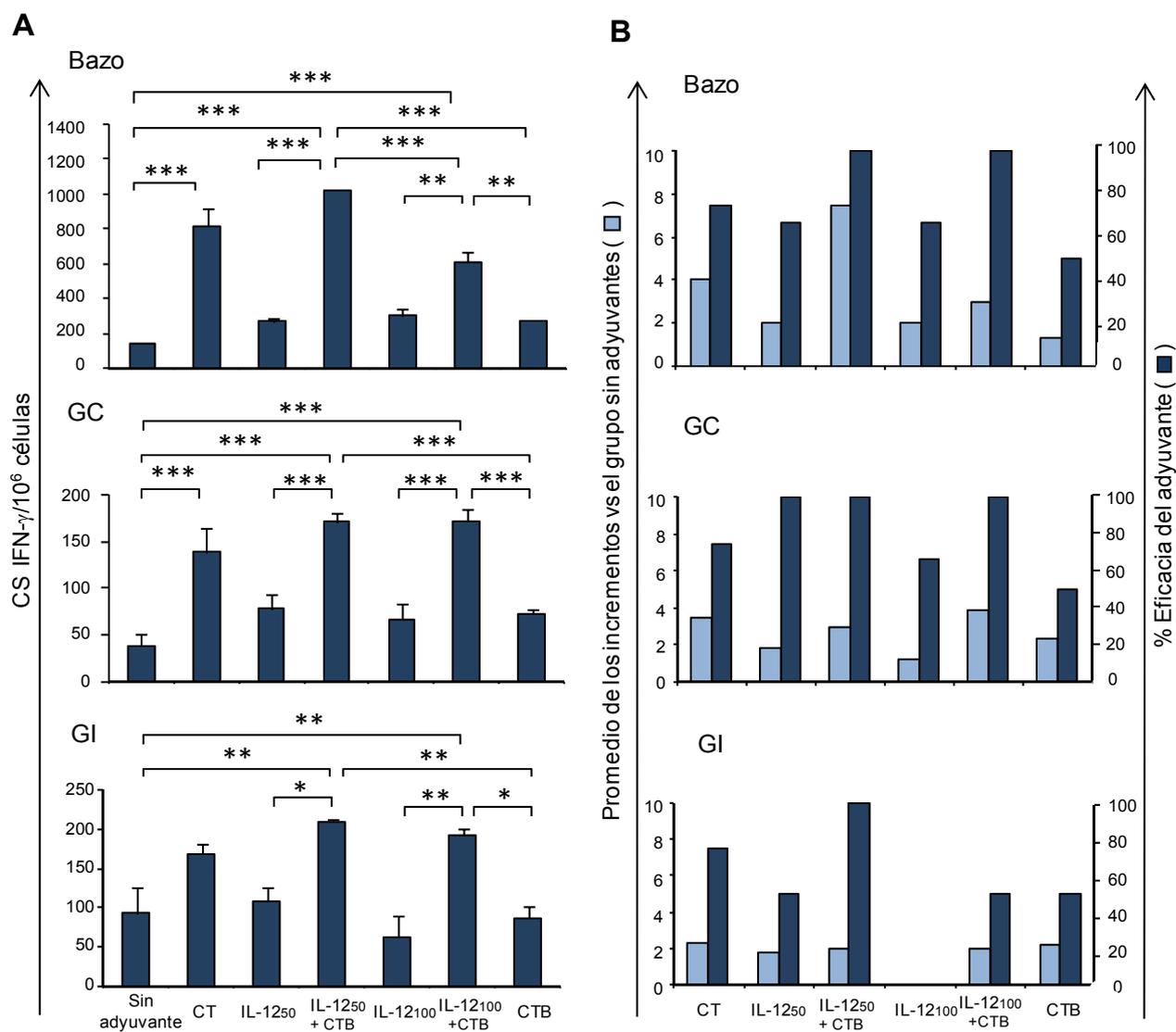


Figura 16. Respuesta celular inmune inducida por la co-administración de adyuvantes de mucosas en un esquema de inmunización intranasal ADN/MVA frente al antígeno de HIV.

Grupos de 4 ratones BALB/c fueron inoculados como descrito anteriormente en el esquema de inmunización mostrado en la tabla 6. (A) 10 días luego de la inmunización con MVA, se cuantificó la respuesta celular inmune específica frente a Env mediante el ensayo de ELISPOT, en mezclas de células de bazo, ganglios cervicales (GC) y ganglios ilíacos (GI). Las barras representan el número promedio de células secretoras de interferón- γ por millón de células (CS IFN- γ /10⁶ células) + el desvío estándar de un experimento representativo de 2 a 6 realizados. Cada determinación fue evaluada en pocillos por duplicado o triplicado. Valores obtenidos en los pocillos de los controles negativos fueron sustraídos. Se indican las diferencias estadísticas con ANOVA de una vía con la corrección de Bonferroni entre los grupos señalados: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. (B) Resumen de los resultados obtenidos en todos los experimentos desarrollados. Las barras claras representan el promedio de los incrementos en la magnitud de la respuesta inmune celular específica en comparación al grupo sin adyuvante. Las barras oscuras, representan el porcentaje de experimentos donde la aplicación de los adyuvantes generó una respuesta inmune celular específica significativamente incrementada en comparación con el grupo sin adyuvantes. Para este análisis, se utilizó la prueba T de Student donde se compararon cada uno de los grupos con adyuvante de cada experimento con su respectivo control sin adyuvante (comparación entre dos grupos).

Cuando la respuesta se estudió en ganglios cervicales e ilíacos, al igual que lo observado en bazo, la aplicación individual de los adyuvantes, ya sea ADN-IL-12 en cualquiera de las dos dosis como así también CTB, no generaron un incremento significativo de la respuesta inmune celular en comparación al grupo que no recibió los adyuvantes. Sin embargo, ambos esquemas en donde se utilizaron ADN-IL-12 junto con CTB (las dos dosis) generaron las respuestas de mayor magnitud en ganglios cervicales y ganglios ilíacos (Figura 16A, panel medio e inferior) sin observar diferencias significativas entre las dosis de 50 y 100 µg de ADN-IL-12.

En la figura 16A se graficaron valores representativos de varios experimentos realizados. Sin embargo, pudimos observar que la respuesta obtenida en cada uno de los experimentos en forma individual era variable. Por este motivo, se analizó también el promedio de incrementos en CS IFN- γ /10⁶ de células observados en los grupos inmunizados con los adyuvantes en relación al grupo control (sin adyuvantes) y el porcentaje de experimentos en los cuales la aplicación de los adyuvantes generaron un incremento significativo en la respuesta celular inmune (% eficacia de adyuvante). En la figura 16B se muestra que en general, la aplicación de los adyuvantes generó un incremento de los dos parámetros. Un análisis más detallado de este estudio nos permitió ver que al aplicar ADN-IL-12 en dos diferentes dosis, los resultados obtenidos no son los mismos ya que en ganglios cervicales e ilíacos, el porcentaje de eficiencia del adyuvante es mayor con la dosis de 50 µg de ADN-IL-12 en comparación con la dosis de 100 µg. Además, en los ganglios ilíacos no hay un incremento de la respuesta celular inmune en el grupo IL-12₁₀₀ en comparación al control. Todo esto demuestra que la menor dosis de ADN-IL-12 induce una mejor respuesta celular inmune en ganglios drenantes de mucosas (a nivel sistémico, la respuesta es similar en ambos grupos)

Al combinar ADN-IL-12 (en las dos dosis) con CTB, los resultados en bazo muestran que hay un 100% de eficiencia del adyuvante para ambas dosis. Sin embargo, el promedio de incrementos en la respuesta celular en el grupo IL-12₅₀+CTB en relación al grupo sin adyuvantes es de 7,5 veces (un promedio de 1257 frente a 185 CS IFN- γ /10⁶ células) mientras que en el grupo IL-12₁₀₀+CTB es de sólo 3 veces. Por otro lado, en ganglios ilíacos, el porcentaje de eficiencia del adyuvante es de 100% en el grupo IL-12₅₀+CTB y de 50% en IL-12₁₀₀+CTB. Por lo tanto, cuando ambos adyuvantes

se combinan, los mejores resultados se obtienen al emplear la dosis de ADN-IL-12 de 50 µg tanto a nivel sistémico como en mucosas. Lo más destacable de este análisis es que el único grupo de inmunización donde el porcentaje de eficacia del adyuvante fue del 100% de los experimentos realizados en cada uno de los tejidos analizados fue en donde se aplicó ADN-IL-12 en una dosis de 50 µg junto con CTB, y en este grupo es donde se observó el mayor promedio de incrementos de la respuesta celular en bazo.

En conjunto, estos resultados demuestran que el esquema de inmunización aplicado en el grupo IL-12₅₀+CTB generó los mejores resultados en términos de incrementos en el número de células T-CD8 específicas secretoras de IFN-γ y también en el porcentaje de la eficacia de adyuvantes (100% de los experimentos para todos los tejidos estudiados). Estos resultados demuestran que, al menos en el bazo, la dosis de 50 µg de ADN-IL-12 generó un efecto del tipo sinérgico con CTB.

3. La incorporación de ADN-IL-12 y CTB también induce mayor respuesta inmune humoral específica en comparación con el grupo inmunizado en ausencia de adyuvantes

El estudio de los niveles de anticuerpos en un esquema de inmunización intranasal frente a gp-120 de HIV con la combinación de IL-12 y CTB ya se ha estudiado previamente en un trabajo publicado hace unos años, donde se demostró que ambos adyuvantes actuaron sinérgicamente incrementando la respuesta inmune humoral específica a nivel sistémico y en mucosas (122). Sin embargo, en el modelo que se utilizó, tanto el antígeno como la citoquina fueron administrados como proteínas recombinantes. Si bien en este trabajo de tesis se ha utilizado una combinación de vectores vacunales que se caracteriza por incrementar predominantemente la rama celular de la respuesta inmune específica, se ha reportado la generación de anticuerpos específicos luego de la inmunización con ADN/MVA por ruta de mucosas (39).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el próximo objetivo consistió en el análisis de la respuesta inmune humoral específica inducida tras los diferentes esquemas de inmunización

mostrados en la tabla 6. Para ello, a los diez días de la última inmunización se extrajo la sangre de los ratones (4 por grupo), se procesó para obtener el suero de cada uno de ellos y luego se cuantificaron los niveles de anticuerpos inducidos a nivel sistémico mediante un ensayo de ELISA diseñado en el laboratorio (Ver la sección 4.4 de Materiales y Métodos). Se analizaron los niveles de IgG totales y de diferentes subclases (IgG1 e IgG2a) específicos para gp-120 en los sueros de cada uno de los animales en forma individual.

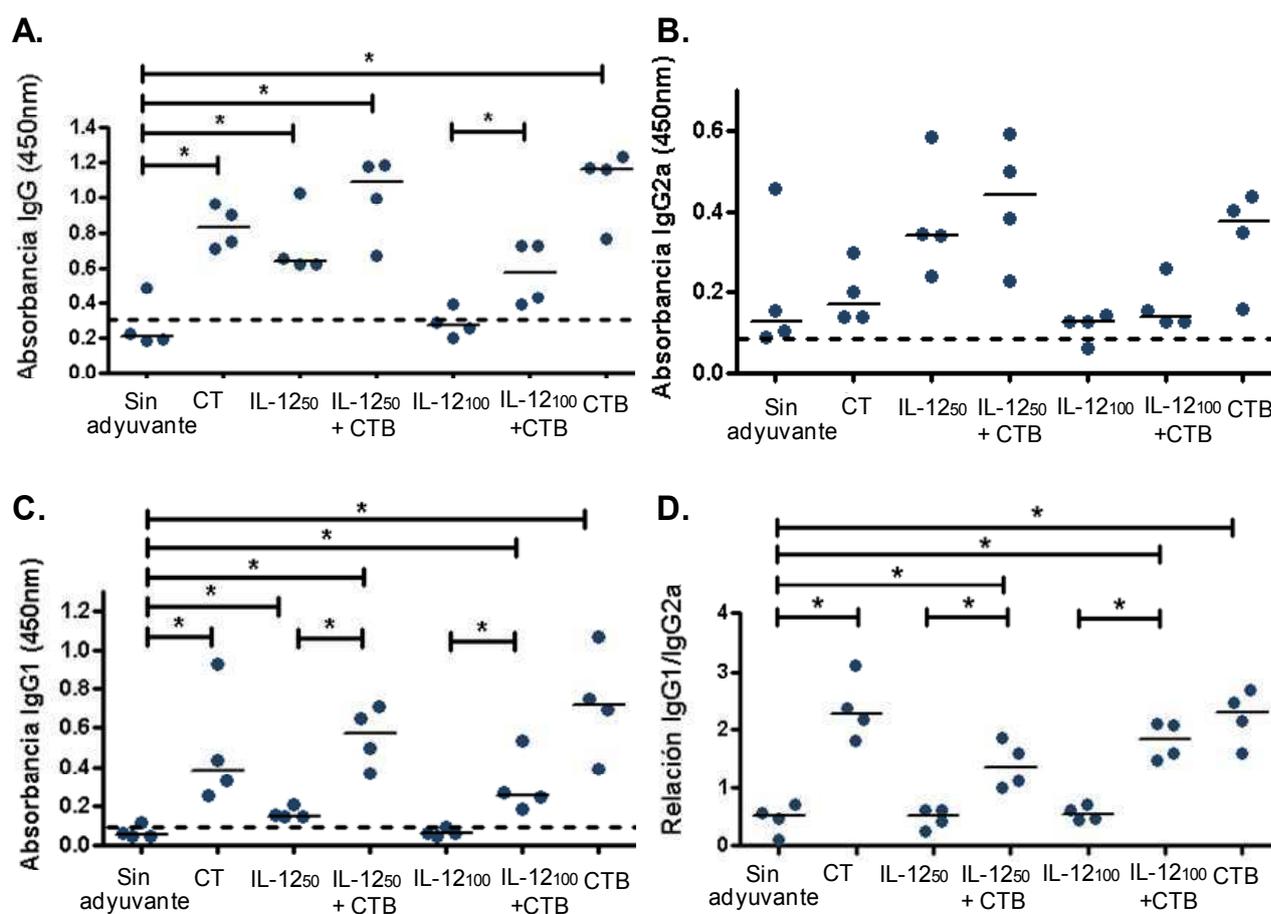


Figura 17. Respuesta inmune humoral específica sistémica frente a la proteína gp-120 de ratones inmunizados con los adyuvantes de mucosas.

Diez días del *boost* con MVA, se cuantificaron los niveles de anticuerpos específicos para gp-120 mediante el ensayo de ELISA. Se cuantificaron los niveles de IgG (A), IgG2a (B) y de IgG1 (C) en sueros de ratones individuales diluidos 1/50. Cada punto representa el valor promedio de absorbancia medido a 450 nm de determinaciones por duplicado. Las líneas representan las medianas y la línea de puntos es el corte para una respuesta positiva. Se consideró una respuesta positiva cuando el valor promedio de la muestra superaba el promedio de muestras de ratones sin inmunizar (*naïve*) + 3 veces el desvío estándar. La relación IgG1/IgG2a para cada uno de los ratones se muestra en (D). Se indican las diferencias estadísticas con la prueba de Mann Whitney entre los grupos señalados: * $p < 0,05$

En la figura 17A se puede observar que en el grupo inmunizado sin adyuvantes, solo 1 de 4 ratones generó una respuesta positiva para IgG. Cuando se compararon los niveles de anticuerpos entre este grupo y aquellos inmunizados con adyuvantes, se puede observar un incremento significativo de la respuesta humoral en el grupo inmunizado con la dosis de 50 μg de ADN-IL-12, con CTB, y con la combinación de ambos (IL-12₅₀+CTB) ($p < 0,05$). En cambio, no se observó un incremento con la dosis de 100 μg de ADN-IL-12, y al combinarlo con CTB los niveles de anticuerpos aumentaron levemente ($p > 0,05$).

Al evaluar más en detalle las subclases de anticuerpos IgG sistémicos inducidos, se pudo observar en el análisis de IgG2a, que los niveles observados en los grupos inmunizados con adyuvantes no tuvieron un incremento significativo en comparación al grupo control ($p > 0,05$). Sin embargo, IL-12₅₀+CTB fue el grupo con la mayor mediana de absorbancia encontrada (Figura 17B).

Para el caso de IgG1 (Figura 17C), el patrón encontrado en cuanto a los niveles de anticuerpos de cada uno de los grupos es muy similar al observado para IgG total: Solo 1 de los 3 ratones mostraron una respuesta positiva en el grupo control, y al compararlo con los grupos inmunizados en presencia de adyuvantes, los que poseen incrementos significativos de la respuesta en comparación al control ($p < 0,05$) son los mismos que en IgG total. Además se observaron diferencias en el grupo IL-12₁₀₀+CTB.

Luego de analizadas las subclases de IgG por separado, evaluamos la relación IgG1/IgG2a para conocer el perfil de la respuesta inmune humoral. En la figura 17D se graficaron los resultados obtenidos. La aplicación de CTB sola o su combinación con cualquiera de las dos dosis de ADN-IL-12, incrementaron significativamente la relación IgG1/IgG2a en comparación a los que se observó en el grupo sin adyuvantes. En cambio, cuando se aplicó ADN-IL-12 en forma individual, ya sea en la dosis de 50 o 100 μg , no se observaron cambios en comparación con el grupo control.

El próximo objetivo consistió en el análisis de la respuesta humoral específica en mucosa de tracto genital, para lo cual se determinaron los anticuerpos IgA específicos en muestras de lavados vaginales. En la figura 18 se muestran las medianas de los incrementos en la absorbancia de IgA con respecto a los niveles encontrados en ratones sin inmunizar (*naïve*). Como se puede observar

en la figura, los valores obtenidos en cada uno de los grupos mostraron una gran dispersión. Los grupos en los cuales se detectó una menor variabilidad fueron el grupo sin adyuvantes, el de CTB sola y el de IL-12₅₀+CTB. En este último, se encontró un incremento estadísticamente significativo con respecto al grupo sin adyuvantes, siendo la respuesta generada 4,1 veces mayor que el encontrado con el grupo control. Los otros grupos que también generaron una mayor respuesta estadísticamente significativa fueron IL-12₅₀, IL-12₁₀₀+CTB y CT.

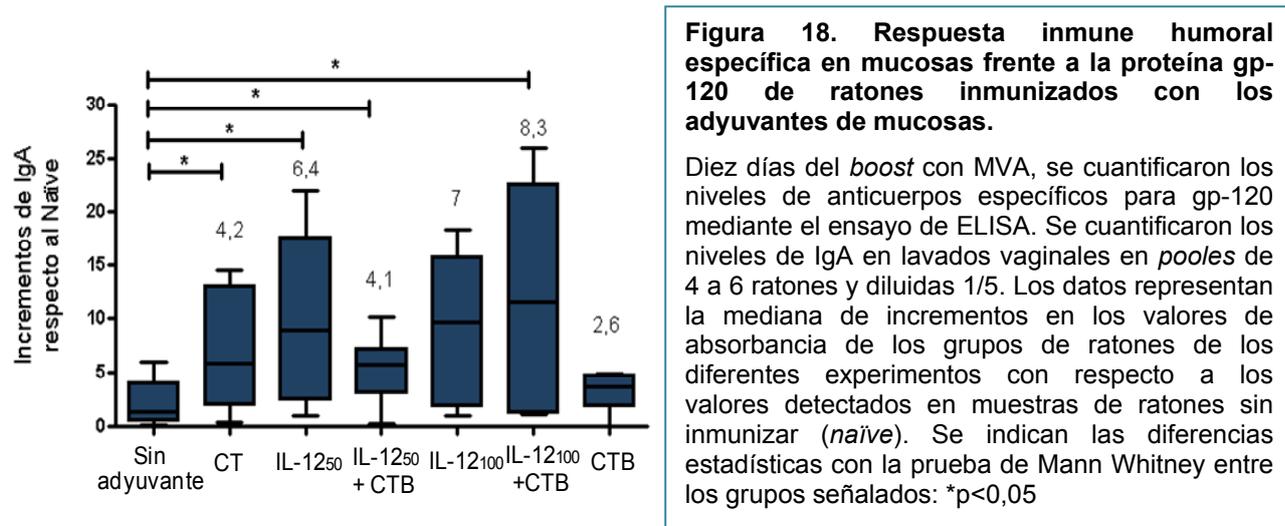


Figura 18. Respuesta inmune humoral específica en mucosas frente a la proteína gp-120 de ratones inmunizados con los adyuvantes de mucosas.
 Diez días del *boost* con MVA, se cuantificaron los niveles de anticuerpos específicos para gp-120 mediante el ensayo de ELISA. Se cuantificaron los niveles de IgA en lavados vaginales en *pools* de 4 a 6 ratones y diluidas 1/5. Los datos representan la mediana de incrementos en los valores de absorbancia de los grupos de ratones de los diferentes experimentos con respecto a los valores detectados en muestras de ratones sin inmunizar (*naïve*). Se indican las diferencias estadísticas con la prueba de Mann Whitney entre los grupos señalados: *p<0,05

Como conclusión de los resultados obtenidos en esta segunda parte, se pudo comprobar que el esquema de inmunización ADN/MVA por ruta intranasal aplicado junto con los adyuvantes ADN-IL-12 (en dosis de 50 o 100 µg) o CTB en forma individual generaron un leve incremento de la respuesta medida como CS IFN-γ/10⁶ células en muestras de bazo, ganglios drenantes de la mucosa nasal y genito-rectal. En cambio, cuando ambos adyuvantes fueron aplicados juntos (ADN-IL-12 + CTB, en las dosis de 50 y 100 µg), la respuesta fue estadísticamente mayor en cada una de las muestras analizadas (Figura 16A). Más específicamente, entre los grupos IL-12₅₀+CTB e IL-12₁₀₀+CTB, no hubo diferencias entre sí en cuanto a la magnitud de la respuesta en ganglios drenantes de mucosas (ganglios cervicales e ilíacos), pero en cambio, en bazo, la respuesta fue mayor en el grupo IL-12₅₀+CTB (Figura 16A). Este grupo en particular, fue el único que tuvo una respuesta positiva en el 100% de los experimentos realizados (Figura 16B).

En el estudio de la respuesta humoral, se pudo observar que no todos los grupos de inmunización generaron un incremento de los niveles de anticuerpos. Este es el caso de IL-12₁₀₀, donde no se observó un incremento respecto del grupo sin adyuvantes en los niveles de IgG, IgG1 y de IgG2a sistémica ni tampoco de IgA en mucosas. Esto contrasta con lo ocurrido en el grupo inmunizado con una dosis de 50 µg de ADN-IL-12 (IL-12₅₀) donde se pueden observar estos incrementos, excepto por IgG2a donde los niveles de anticuerpos no fueron superiores para ninguno de los grupos inmunizados con adyuvantes. En el grupo CTB, sólo se incrementaron los niveles de anticuerpos sistémicos, pero no de IgA en mucosas. En los grupos inmunizados con la combinación de adyuvantes, tanto en IL-12₅₀+CTB como IL-12₁₀₀+CTB, se encontraron mayores niveles de IgA en mucosas y mayor IgG1 sistémica respecto al control (sin diferencias estadísticas entre las dosis de 50 y 100 µg), pero en cuanto a IgG total sistémica, sólo se observó un incremento en el grupo IL-12₅₀+CTB.

Finalmente, los resultados descritos en esta parte demuestran que el grupo de ratones que fue inmunizado con ADN/MVA por ruta intranasal aplicando el esquema IL-12₅₀+CTB (ADN-EnvB+ADN-IL-12 (50 µg) + CTB / MVA-EnvB + CTB) generó la mayor respuesta inmune celular medida como células secretoras de IFN-γ. Con este esquema de inmunización, también pudimos observar un incremento en la respuesta inmune humoral. Por lo tanto, se continuó el trabajo con el objetivo de evaluar más detalladamente el perfil de la respuesta celular inmune específica, en términos de amplitud y calidad de la respuesta del grupo IL-12₅₀+CTB en comparación con el grupo sin adyuvantes.

Parte III. Caracterización de la respuesta celular inducida mediante la inmunización ADN/MVA con los adyuvantes ADN-IL-12 (50 µg) + CTB: estudio de la amplitud y calidad de la respuesta.

1. La co-administración intranasal de ADN-IL-12 y CTB en inmunizaciones ADN/MVA mejora la magnitud de la respuesta inmune celular específica (a nivel de IFN-γ e IL-2) en la mucosa de tracto genital.

La finalidad de inmunizar a los animales por ruta de mucosas es para justamente, inducir una respuesta inmune en esos sitios. La elección de la ruta de inmunización (intranasal) se realizó de manera de poder generar una respuesta inmune específica, en particular en el tracto genital, que es la mucosa por la cual el virus de HIV ingresa mayormente al organismo. Por tal motivo, debido a la importancia de generar una respuesta antiviral potente en estos sitios, se analizó si la combinación de adyuvantes ADN-IL-12 (50 µg) + CTB en el esquema de inmunización ADN/MVA podía inducir un incremento de la respuesta inmune celular en la mucosa de tracto genital. Para ello, se analizó la respuesta inmune tanto en ganglios drenantes de la mucosa genito-rectal (ganglios ilíacos) como en tracto genital de ratones inmunizados con el esquema IL-12₅₀+CTB comparando dicha respuesta con la del grupo sin adyuvantes (control) (Tabla 6). A los 10 días de aplicado el esquema de inmunización se cuantificó mediante un ensayo de ELISPOT, el número de células secretoras de IFN-γ y de IL-2 (CS/10⁶ células) específicas para el antígeno de Env como una medida de la calidad de la respuesta celular (Figura 19).

En primer lugar, analizamos los resultados obtenidos en ganglios ilíacos. Como se puede apreciar en la figura 19A, no solo se observa un incremento significativo en la cantidad de células secretoras de IFN-γ específicas en el grupo IL-12₅₀+CTB (mostrado anteriormente en la figura 16A) sino que además aumentó el número de células secretoras de IL-2 en 2,6 veces respecto a la respuesta encontrada en el grupo control ($p < 0,01$).

En segundo lugar, analizamos la respuesta celular específica en el sitio efector de mucosas, es decir, en el tracto genital, debido a la relevancia que implica en este trabajo poder inducir, luego de aplicado el esquema de inmunización, una respuesta inmune sitio específica de gran magnitud para que potencialmente pueda contener una futura infección por HIV (figura 19B). Efectivamente, los resultados mostraron una optimización de la respuesta celular en la mucosa genital con el esquema de inmunización IL-12₅₀+CTB, detectando en este grupo 356 CS IFN- γ /10⁶ células (SD: 8,48) mientras que en el control, se detectaron 147 CS IFN- γ /10⁶ células (SD: 8,48) (p=0,00164) (Figura 19B).

Por otro lado, aunque el número de células específicas secretoras de IL-2 detectadas en el tracto genital fue menor al encontrado para IFN- γ , también se encontró una tendencia a una mayor respuesta en el grupo IL12₅₀+CTB.

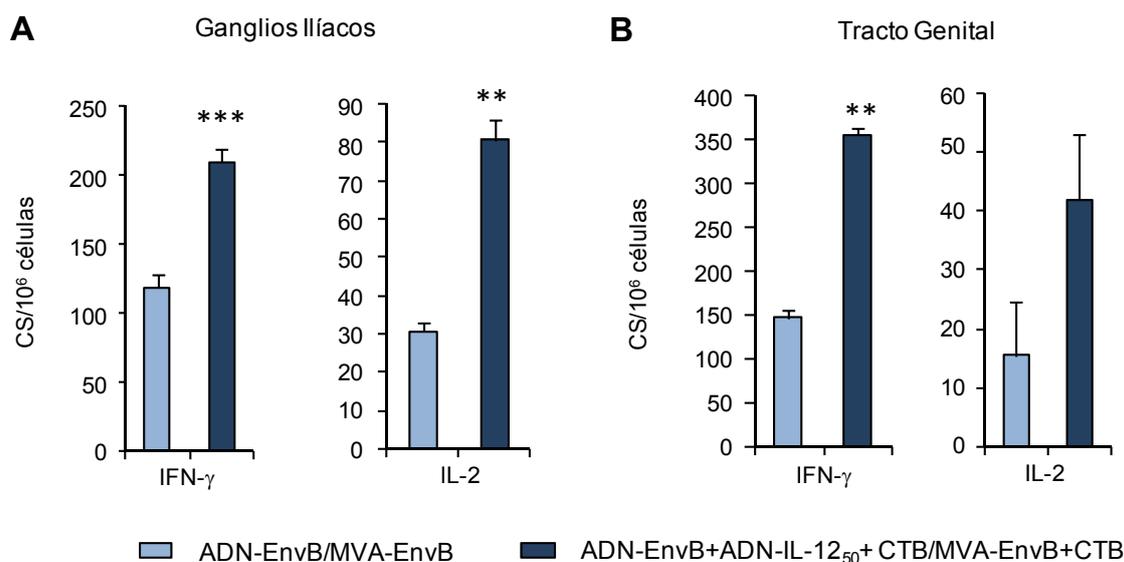


Figura 19. Análisis de la respuesta inmune celular específica en mucosa genital a los 10 días de la inmunización del grupo sin adyuvantes y el grupo ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB.

Grupos de 6 ratones BALB/c fueron inmunizados en ausencia de adyuvantes (barras claras) o con ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB (barras oscuras). Se cuantificó la respuesta celular inmune específica frente al péptido de Env a los 10 días de la inmunización en mezclas de células de ganglios ilíacos (A) y tracto genital (B) mediante el ensayo de ELISPOT. Las barras representan el número promedio de células secretoras de IFN- γ o de IL-2 por millón de células (CS/10⁶ células) + el desvío estándar por duplicado o triplicado de un experimento representativo de 3 realizados. Los valores obtenidos en los controles negativos (medio sin estímulo) fueron sustraídos. Se indican las diferencias estadísticas con la prueba T de Student entre grupos: **p<0,01; ***p<0,001

Cabe agregar que también se cuantificó el número de células secretoras de IL-2 en bazo de ratones de este grupo donde se obtuvo una respuesta incrementada respecto al control (163 CS IL-2/10⁶ células en el grupo sin adyuvantes y 331 en el grupo IL-12₅₀+CTB, p<0,001).

Los datos detallados en este apartado demuestran claramente los beneficios de la co-administración de ADN-IL-12 y CTB en un esquema de inmunización de mucosas ADN/MVA para mejorar la respuesta celular específica en sitios de mucosas blancos de HIV como en el tracto genital y ganglios ilíacos que drenan la mucosa genito-rectal.

2. Las mejoras generadas en la respuesta celular T debido a la administración de ADN-IL-12 junto con CTB fueron mantenidas durante la fase de memoria de la respuesta.

Los resultados descriptos en las secciones previas fueron analizados luego de 10 días del esquema de inmunización indicando que, de los diferentes esquemas utilizados, el que resultó más óptimo para generar una respuesta adecuada frente a EnvB tanto sistémica como en tejidos blancos de mucosas, fue el utilizado en el grupo IL-12₅₀+CTB. Por lo tanto, se prosiguió el trabajo evaluando si las mejoras encontradas en este grupo se encontraban presentes a tiempos tardíos de la inmunización. Para ello, se analizó la respuesta celular inmune frente a Env mediante un ensayo de ELISPOT en los diferentes tejidos a los 30 y 53 días de aplicado el esquema de inmunización del grupo IL-12₅₀+CTB y se comparó la magnitud de la respuesta con el grupo inmunizado en ausencia de adyuvantes (Figura 20). Los resultados demuestran que en bazo, el grupo IL-12₅₀+CTB generó un incremento de 2 y 3 veces en el número de células secretoras de IFN- γ y de IL-2 respectivamente, con respecto al grupo sin adyuvantes a los 30 días del *boost*. A tiempos aún más tardíos (53 días post-inmunización), se continúan observando diferencias significativas entre grupos.

Estos resultados indican que en el bazo, los incrementos en el número de células T-CD8 específicas secretoras de IFN- γ y de IL-2 observados en tiempos tempranos (10 días) en el grupo IL-12₅₀+CTB con respecto al grupo control, fueron mantenidos en la fase de memoria (30 y 53 días) a pesar de la disminución de la respuesta.

Indudablemente, un importante hallazgo fue que el esquema de inmunización seleccionado resultó más eficiente para inducir una respuesta inmune celular específica de memoria de mayor magnitud tanto en los ganglios drenantes de la mucosa genito-rectal como en el sitio efector del tracto genital.

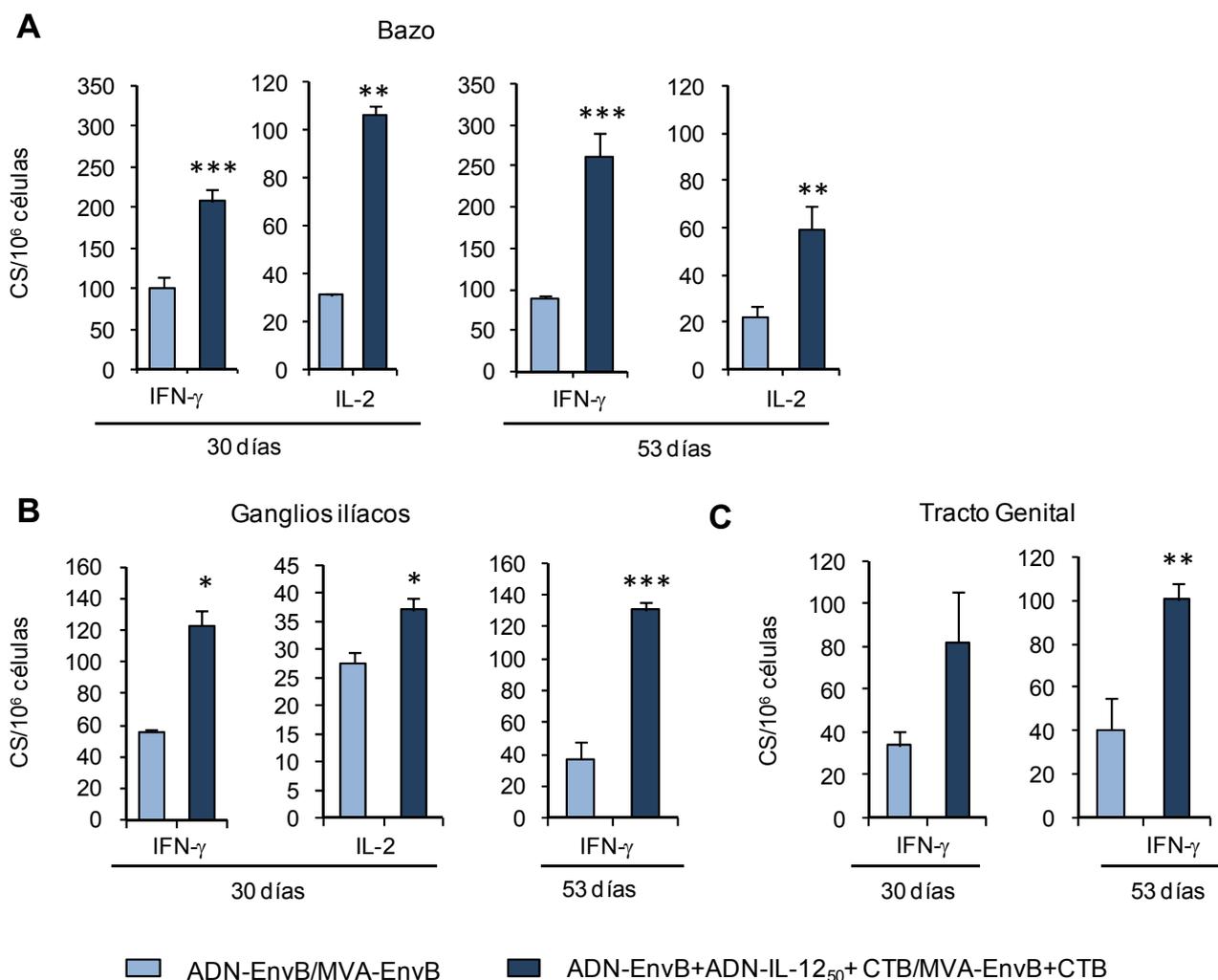


Figura 20. Cuantificación de células secretoras de IFN- γ y de IL-2 a los 30 y 53 días de la inmunización con MVA.

Grupos de 6 ratones BALB/c fueron inmunizados en ausencia de adyuvantes (barras claras) o con ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB (barras oscuras). Se cuantificó la respuesta celular inmune específica frente al péptido de Env mediante el ensayo de ELISPOT, en mezclas de células de bazo (A), ganglios ilíacos (B) y tacto genital (C) a los 30 y 53 días después de la inmunización con MVA. Las barras representan el número promedio de células secretoras de IFN- γ o de IL-2 por millón de células (CS/10⁶ células) + el desvío estándar por duplicado o triplicado de un experimento representativo de 2 o 3 realizados. Valores obtenidos en los pocillos de los controles negativos (medio sin estímulo) fueron sustraídos. Se indican las diferencias estadísticas con la prueba T de Student entre grupos: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

En ganglios ilíacos (Figura 20B), luego de 30 días de aplicado el esquema de inmunización, el incremento en el número de CS IFN- γ /10⁶ células observado fue de 2,2 ($p < 0,05$), mientras que luego de 53 días, la diferencia detectada entre ambos grupos se acentúa más, resultando de 3,5 veces ($p < 0,001$). Con respecto al análisis del número de células secretoras de IL-2 a los 30 días de la inmunización, la respuesta fue 1,35 veces mayor ($p < 0,05$). En cuanto a los resultados obtenidos en el tracto genital (Figura 20C), sólo se pudo evaluar la respuesta de IFN- γ ya que la cantidad células específicas para IL-2 fue escasa. En este tejido, la respuesta tanto a los 30 como a los 53 días en el grupo IL-12₅₀+CTB mostró un incremento de aproximadamente 2,5 veces en el número de CS IFN- γ /10⁶ células con respecto al grupo sin adyuvantes (a los 53 días, $p < 0,01$).

El análisis de la respuesta celular T-CD8 a los distintos tiempos de aplicado el esquema de inmunización (10, 30 y 53 días) muestra que la combinación de adyuvantes ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB genera una respuesta sistémica y en mucosas suficientemente superior a la obtenida en el grupo control a los 10 días de aplicado el esquema de inmunización, como para que esta respuesta siga manteniendo una diferencia significativa a lo largo del tiempo (30 y 53 días).

3. Análisis del perfil funcional celular T luego de la inmunización ADN/MVA con ADN-IL-12 + CTB: Incrementos en la capacidad citotóxica y en la amplitud de las citoquinas producidas.

Para que una respuesta inmune celular T pueda llevar a cabo su función protectora frente a los patógenos intracelulares es importante, no sólo generar una respuesta de gran magnitud, sino además, que sea de calidad. Debido a ello, los siguientes estudios del presente trabajo de tesis estuvieron centrados en la evaluación de diferentes aspectos que poseen relevancia en cuanto a la calidad de la respuesta celular T.

Una de las formas en las que se evalúa la calidad de la respuesta T es el estudio de la polifuncionalidad celular, definida como la capacidad que poseen las células T específicas en forma individual de realizar múltiples funciones efectoras simultáneamente. Diferentes trabajos han descrito que esta propiedad se encuentra altamente asociada con la protección mediada por estas

células (123, 124) y se ha descrito para HIV que en varios casos la polifuncionalidad celular se ha correlacionado con un control viral parcial (125). En base a estos reportes es que en varios ensayos clínicos de vacunas, la polifuncionalidad celular ha sido utilizada para monitorear la respuesta celular T (126-128).

Entre las funciones efectoras de las células T-CD8 con actividad antiviral, se encuentran la citotoxicidad medida por la capacidad de degranulación (evaluada por la proporción de células CD107a/b⁺) y la producción de citoquinas o quimioquinas.

En base a lo descrito anteriormente se decidió analizar la calidad de la respuesta generada en los ratones del grupo control inmunizados sin adyuvantes (ADN-EnvB/MVA-EnvB) en comparación con aquellos inmunizados según el esquema del grupo IL-12₅₀+CTB (ADN-EnvB + ADN-IL-12 (50 µg) + CTB (10 µg)/ MVA-EnvB + CTB (10 µg)).

En primera instancia, se realizaron los experimentos de evaluación de la calidad de la respuesta celular T a los 10 días luego de la aplicación del esquema de inmunización en esplenocitos de los animales de los dos grupos inmunizados. Se evaluó en las células T-CD8 específicas para el antígeno de Env la capacidad de degranular (CD107 a⁺/b⁺) y de producir las citoquinas IFN-γ, IL-2 y TNF-α mediante marcación intracitoplasmática y posterior análisis por citometría de flujo (las condiciones utilizadas para la realización del ensayo se describen en el punto 4.5.2. de Materiales y Métodos).

Para poder realizar este análisis, se realizaron dos ensayos de citometría en paralelo debido a la limitante del equipo de citometría de flujo que permite utilizar hasta 6 colores simultáneamente. Para ambos casos, se utilizaron el marcador de viabilidad, los marcadores de superficie CD3 y CD8, y los marcadores para detectar la producción de IFN-γ y TNF-α. Los experimentos se diferenciaron entre sí, en que en uno de ellos se cuantificó IL-2, y en el otro CD107a/b. De este modo, se pudieran evaluar en total 4 funciones. El esquema de la estrategia de *gating* utilizada en este ensayo se muestra en la figura 21. Los porcentajes de la combinación de las dos o tres funciones efectoras que pudieron ser analizadas con estos dos experimentos se realizaron con el software FACS Diva. Hay que tener en cuenta que, debido a que fueron dos experimentos separados, no se

podieron analizar la combinación IL-2 con CD107a/b ni tampoco las células con capacidad para ejercer las 4 funciones efectoras en forma simultánea.

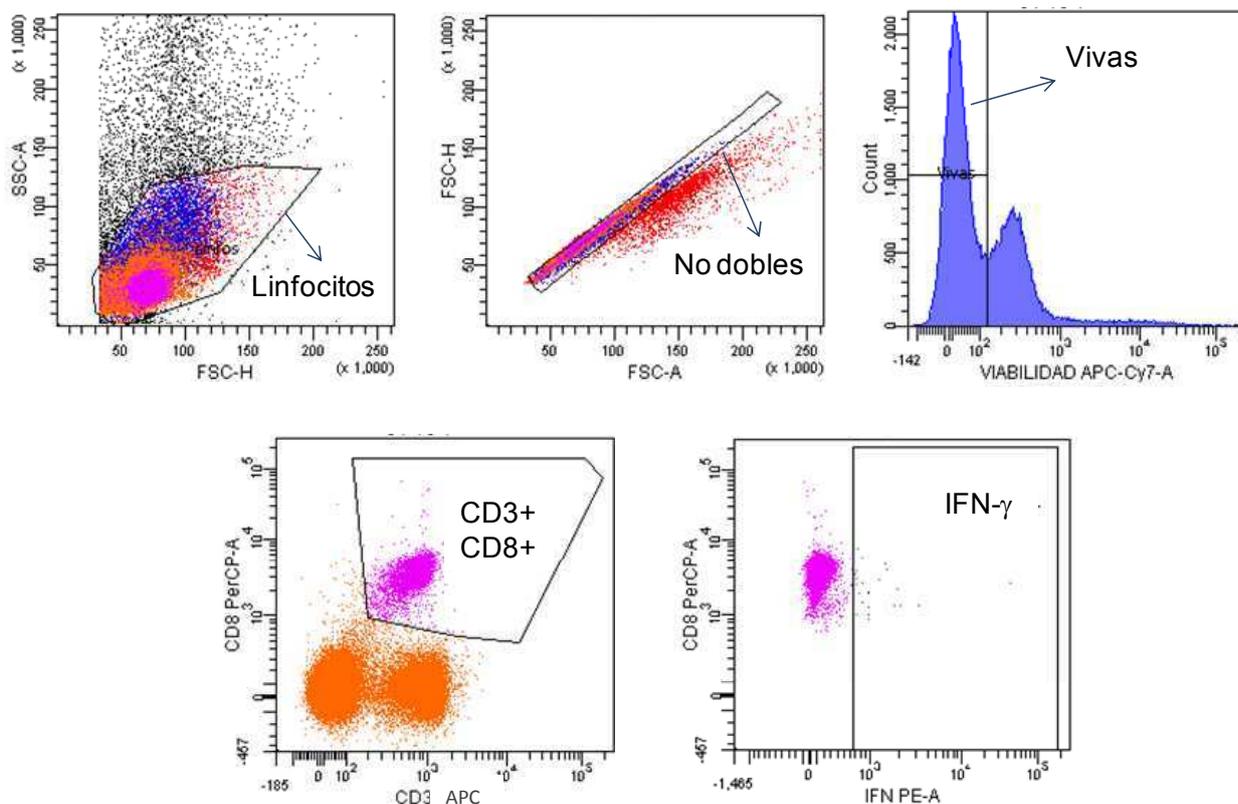


Figura 21. Esquema de la estrategia de *gating* utilizada para el estudio de polifuncionalidad por citometría de flujo.

Se graficó el forward scatter (FSC) versus el side scatter (SSC) en un dot blot. El primer parámetro mide su tamaño relativo y el segundo, la granularidad relativa o complejidad interna. Se seleccionó la población de linfocitos según los parámetros anteriores y luego se tomaron las células individuales (no dobles). A partir de esta población celular, se excluyeron las células muertas del análisis, para identificar a las células CD3+/CD8+. Finalmente, con esta subpoblación celular, se cuantificó la producción de citoquinas (sólo se muestra IFN- γ a modo de ejemplo) o del marcador de citotoxicidad (CD107a/b).

En la figura 22A se analizó el porcentaje de células T-CD8 específicas capaces de cumplir cada una de las funciones por separado. Se puede observar que en el grupo IL-12₅₀+CTB se detectaron mayores porcentajes de células T-CD8 que producen IFN- γ ($p < 0,01$) y TNF- α ($p < 0,01$) en comparación con el grupo control (ADN-EnvB/MVA-EnvB) inmunizado sin adyuvantes. Así mismo, también se encontró que los esplenocitos provenientes del grupo IL-12₅₀+CTB, mostraron mayores porcentajes de células T-CD8 específicas para el antígeno con capacidad de ejercer

citotoxicidad (CD107a/b) (0,825% en el grupo IL-12₅₀+CTB frente a 0,355% en el grupo control, p<0,01).

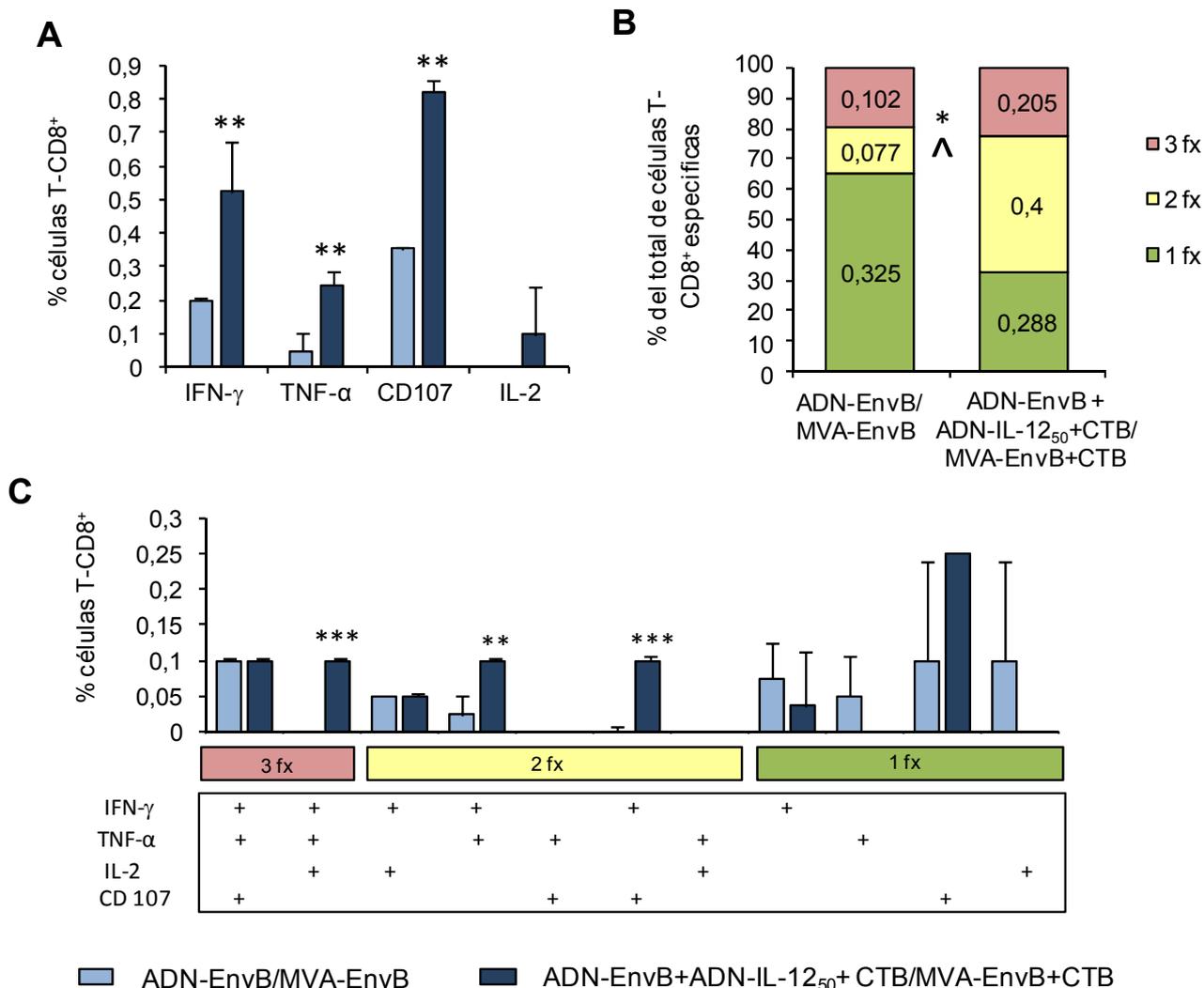


Figura 22. Modulación de la respuesta celular T en su capacidad citotóxica y el patrón de producción de citoquinas en bazo.

La calidad de la respuesta inmune fue evaluada en grupos de ratones BALB/c inmunizados en ausencia de adyuvantes (barras claras) o con ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB (barras oscuras) a los 10 días del boost en células de bazo. (A) Se determinó por citometría de flujo mediante tinción intracitoplasmática la proporción de la producción de citoquinas (IFN- γ , IL-2 y TNF- α) y citotoxicidad (CD107a/b⁺) específica de las células T-CD8⁺ frente al péptido de Env. (B) Porcentaje de células monofuncionales (1fx), bifuncionales (2fx) y trifuncionales (3fx) del total de células T-CD8⁺ específicas. (C) Porcentaje de células T-CD8⁺ específicas detallando la función que posee. Las barras representan el promedio +SD para duplicados de mezclas de células de 6 ratones donde se sustrajeron los valores obtenidos con medio sin estímulo. Diferencias estadísticas entre grupos: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 con la prueba T de Student.

Luego se analizó la polifuncionalidad celular como la proporción de células T-CD8 específicas capaces de ejercer una, dos o tres funciones efectoras simultáneamente (Figura 22B). Los resultados demuestran que el grupo IL-12₅₀+CTB posee significativamente mayor proporción de células bifuncionales, representando el 0,4% del total de células T-CD8 en este grupo, y solo un 0,077% en el grupo sin adyuvantes ($p=0,022$). Si sólo se tiene en cuenta a las células específicas, donde consideramos que el 100% son la suma de las células que poseen alguna función, aquellas que poseen 2 funciones alcanzan el 45% en el grupo IL-12₅₀+CTB y 15% en el grupo control.

Al analizar en detalle cuáles son las funciones efectoras llevadas a cabo por las células T-CD8 específicas detectadas como mono, bi o tri-funcionales (Figura 22C) pudimos observar que las diferencias significativas encontradas en las células bifuncionales entre ambos grupos, se deben a las células con capacidad de producir simultáneamente IFN- γ y TNF- α ($p<0,01$) y a aquellas con la capacidad de degranular (CD107a+/b+) y secretar IFN- γ ($p<0,001$). Este análisis nos permitió observar además que, si bien no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes totales de células trifuncionales entre grupos (Figura 22B), sí se hallaron diferencias entre ambos grupos respecto a las células T-CD8 con capacidad de producción simultánea de IFN- γ , IL-2 y TNF- α ($p<0,001$) (Figura 22C).

Tras los resultados positivos en células de bazo, se consideró importante continuar los estudios de calidad de la respuesta celular llevando a cabo un análisis similar al anterior, pero en tracto genital, para así poder caracterizar el perfil funcional de las células T-CD8 de la mucosa (Figura 23A). En este caso, las marcaciones que se realizaron fueron como anteriormente para bazo, pero se llevó a cabo un solo experimento debido a que lamentablemente, el rendimiento de células que se obtiene luego de procesar el tracto genital es bajo, y no alcanzaba para realizar todas las determinaciones. Por lo tanto, se analizó la producción de IFN- γ , TNF- α y la capacidad de degranular (CD107a/b⁺), de las células T-CD8. Se optó por la determinación del marcador CD107a/b frente a IL-2 ya que la producción de esta citoquina fue analizada anteriormente mediante el ensayo de ELISPOT.

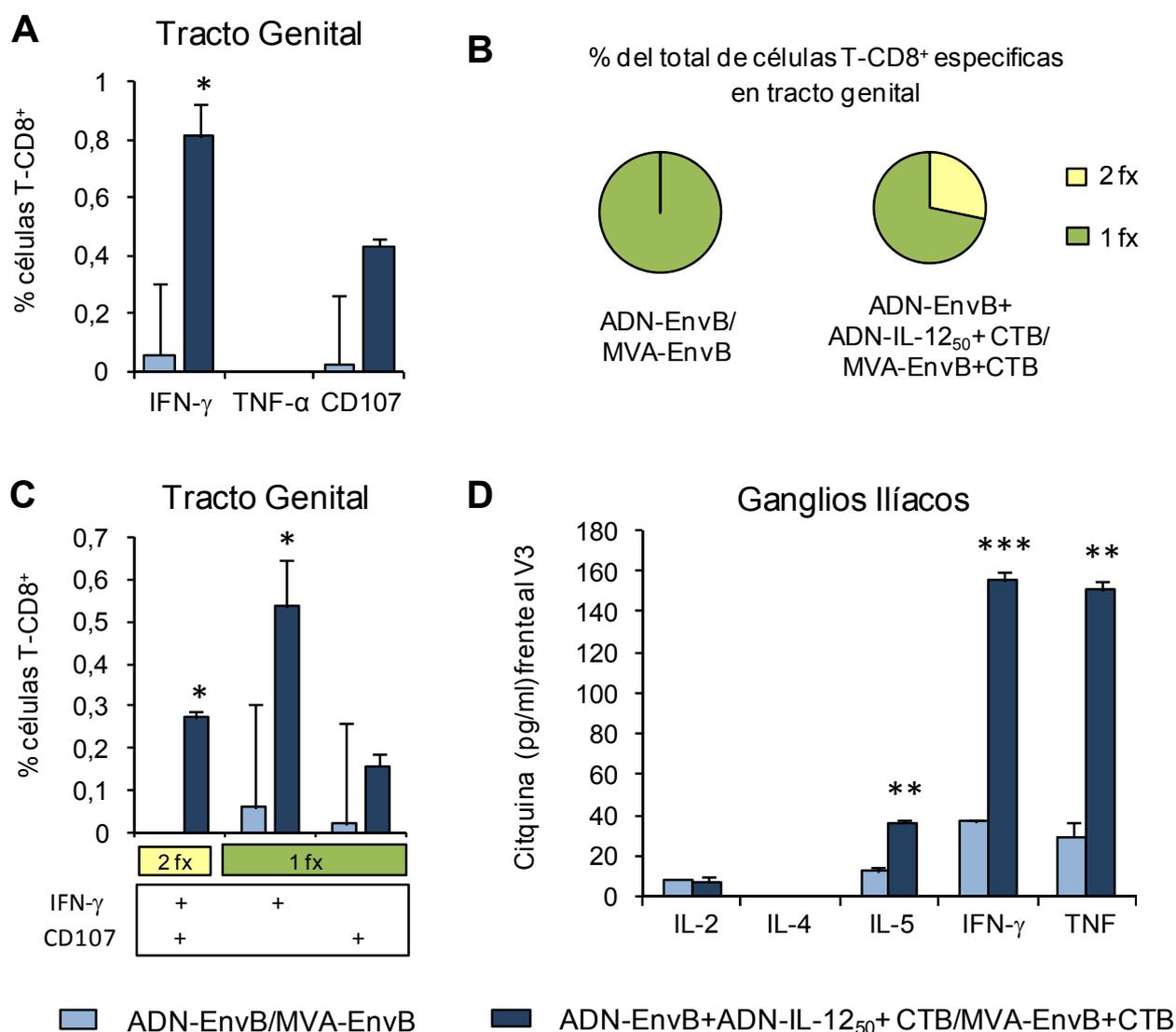


Figura 23. Modulación de la respuesta celular T en su capacidad citotóxica y el patrón de producción de citoquinas en mucosa genital.

La calidad de la respuesta inmune específica frente al péptido de Env fue evaluada en grupos de 6 ratones BALB/c inmunizados en ausencia de adyuvantes (barras claras) o con ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB (barras oscuras) a los 10 días del *boost*. (A) Células de tracto genital fueron analizadas por citometría de flujo mediante tinción intracitoplasmática y se cuantificó la proporción de la secreción de citoquinas (IFN- γ y TNF- α) y citotoxicidad (CD107a/b⁺) específica de las células T-CD8⁺. (B) Porcentaje de células monofuncionales (1fx) y bifuncionales (2fx) del total de células T-CD8⁺ específicas. (C) Porcentaje de células T-CD8⁺ específicas detallando la función que poseen. (D) Células de ganglios ilíacos fueron estimuladas con el péptido de Env durante 72 h y luego, se recogió el sobrenadante para medir citoquinas con el CBA kit. En todos los casos, valores obtenidos en los controles negativos (medio sin estímulo) fueron sustraídos. Se indican las diferencias estadísticas con la prueba T de Student entre grupos: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Al analizar el porcentaje de células T-CD8 específicas para cada una de las funciones, comprobamos que en el grupo IL-12₅₀+CTB se detectó una mayor proporción de células específicas que producen IFN- γ en comparación con el grupo sin adyuvantes ($p=0,038$) (Figura 23A). Este resultado concuerda con lo que ya se había detectado al evaluar la respuesta específica en células de tracto genital mediante ensayos de ELISPOT (Figura 19B). Por otro lado, al evaluar la capacidad citotóxica que poseían las células específicas, se encontró una tendencia a mayores porcentajes en el grupo inmunizado con los adyuvantes en comparación con el grupo control, pero sin llegar a ser estadísticamente significativo ($p=0,07$). A diferencia de lo encontrado en esplenocitos, en células de tracto genital no se pudieron detectar células específicas productoras de TNF- α en ninguno de los dos grupos.

En el estudio de la polifuncionalidad en células de tracto genital (figura 23B y C) encontramos que, mientras que el grupo IL-12₅₀+CTB presentaba células bifuncionales con capacidad de secretar IFN- γ y degranular (CD107a/b) simultáneamente, en el grupo inmunizado sin adyuvantes, no se encontraron células con estas características.

Con el fin de evaluar un poco más en detalle la calidad de la respuesta en la mucosa genital, se realizó otro ensayo con células de ganglios ilíacos para el estudio del patrón de secreción de diferentes citoquinas en sobrenadantes de cultivos de células luego de estar 72 h estimuladas con el péptido de Env. La cuantificación se realizó mediante el kit CBA que cuantifica 5 citoquinas (IL-2, IFN- γ y TNF- α de perfil Th1; IL-4, IL-5 de perfil Th2) simultáneamente mediante citometría de flujo. Lamentablemente, este mismo ensayo no se pudo realizar con células del tracto genital debido a que el número de células que se consigue por experimento es bajo, y por lo tanto, limita la cantidad de experimentos que se pueden realizar para analizar diferentes aspectos de la calidad de la respuesta inmune.

En la figura 23D se puede observar que en el grupo inmunizado con la combinación de adyuvantes, se encontraron mayores niveles de las citoquinas IL-5, IFN- γ y TNF- α con respecto al grupo sin adyuvantes. También se cuantificó IL-4, de perfil Th2 que no pudo ser detectado en ninguno de los dos casos. La cuantificación de citoquinas por el método de CBA en células de

ganglios ilíacos sugiere que tras la inmunización aplicada en el grupo IL12₅₀+CTB se incrementan principalmente citoquinas de perfil Th1 (IFN- γ y TNF- α) y también se evidencia un incremento en la respuesta Th2 (IL-5).

Los resultados demuestran que ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB no sólo incrementa la magnitud de la respuesta celular inmune, sino que también mejora la calidad de la respuesta inducida en términos de polifuncionalidad celular tanto en células de bazo como en la mucosa genital.

4. En la fase de memoria, la inmunización con ADN-IL-12 + CTB modula el patrón de secreción de citoquinas.

Con el fin de conocer el patrón de secreción de diferentes citoquinas a tiempos tardíos de la inmunización, ratones inmunizados fueron analizados a los 30 y 53 días del *boost* evaluando en células de bazo la secreción de citoquinas Th1/Th2 en los sobrenadantes de los cultivos estimulados *in vitro* durante 72 h mediante el kit de CBA (Figura 24). Luego de 53 días de la inmunización, al analizar la secreción de citoquinas cuando las células fueron estimuladas con el péptido de Env, se pudo observar un incremento en los niveles de IL-2, IFN- γ y TNF- α en el grupo IL-12₅₀+CTB en comparación al grupo sin adyuvantes (Figura 24A). Estos resultados mostraron un perfil de secreción de citoquinas similar al detectado a tiempos más cortos post-inmunización (a 10 días del *boost*) evaluado en ese caso por tinción intracitoplasmática mediante citometría de flujo (figura 22A).

Cuando las células fueron estimuladas con la proteína gp-120, como era de esperar para un esquema de inmunización ADN/MVA, se observó un patrón Th1 de secreción de citoquinas (IFN- γ , IL-2, TNF- α) que fue mucho más marcado cuando se administraron los adyuvantes ADN-IL-12 + CTB tanto a los 30 como a los 53 días del *boost* (Figura 24B).

Por lo tanto, lo mostrado anteriormente indica que durante la fase de memoria de la respuesta celular, al igual que en la fase aguda, se pudo observar un incremento en la secreción de una variedad de citoquinas, preferentemente las de perfil Th1 en el grupo IL-12₅₀+CTB.

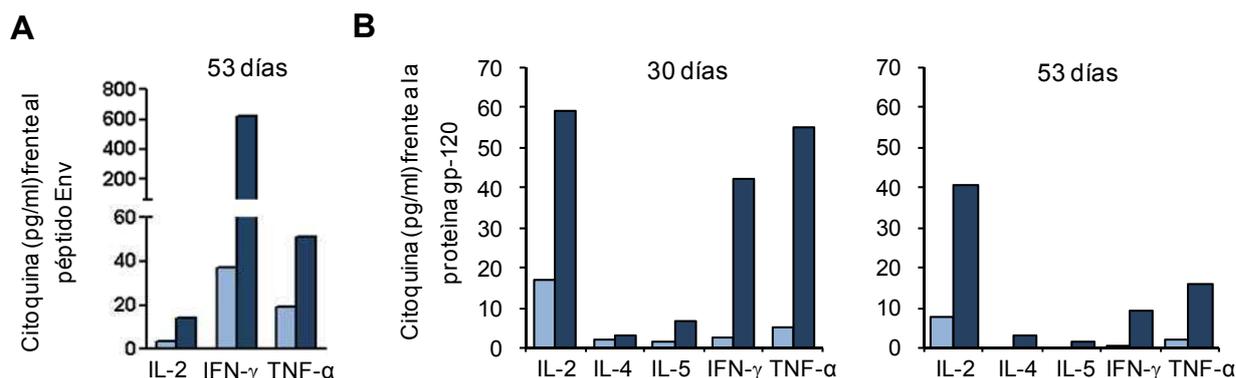


Figura 24. Patrón de secreción de diferentes citoquinas en la fase de memoria.

Grupos de 6 ratones BALB/c fueron inmunizados en ausencia de adyuvantes (barras claras) o con ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB (barras oscuras). En la fase de memoria se evaluó la respuesta inmune en mezclas de células de bazo que fueron estimuladas durante 72 h y las concentraciones de citoquinas fueron cuantificadas en los sobrenadantes de los cultivo utilizando el CBA kit para cuantificar citoquinas Th1/Th2 de ratón. (A) Análisis de muestras obtenidas a los 53 días del *boost*, donde las células de bazo fueron estimuladas con el péptido de Env (V3 loop). (B) células de bazo obtenidas a los 30 y 53 días del *boost* (panel izquierdo y derecho respectivamente), fueron estimuladas con la proteína gp-120 entera. Las barras representan los valores cuantificados por simplificado, donde se sustrajeron los valores obtenidos en sobrenadante de células sin estímulo (medio de cultivo solo).

5. Evaluación de la reactividad cruzada: El reconocimiento de péptidos heterólogos es mayor en el grupo inmunizado con los adyuvantes IL-12₅₀+CTB.

Debido a la importancia de generar vacunas que induzcan una respuesta inmune con amplitud, que tengan la habilidad de reconocer múltiples epítopes y/o diferentes variantes de estos, se analizó la reactividad cruzada utilizando *pool*es de péptidos de la proteína gp-160 de diferentes subtipos de HIV. Para ello, se realizó un ensayo de ELISPOT utilizando como estímulo un *set* de péptidos PTE (Epítopes celulares T potenciales), el cual está formado por 480 péptidos que representan diferentes subtipos de la proteína gp-160: A, B, C y varios subtipos no ABC. Para este trabajo, el *set* de péptidos fue dividido en 5 *pool*es que comprendían los dominios estructurales constantes (C) y variables (V) de la proteína: Gp120₁ (aa 1 a 154) comprende la primera región constante (C1) y variable (V1), Gp120₂ (aa 155 a 284) incluye V2 y C2, Gp120₃ (aa 285 a 511) que abarca desde el *loop* V3 hasta la región C5 inclusive, y finalmente, los péptidos que comprenden la

porción Gp-41 de la proteína, fueron divididos en 2 *pools*: Gp41₁ (aa 512 a 689) y Gp41₂ (aa 690 a 842) (Figura 25C).

Resultados del ensayo realizado a los 10 días luego de la última inmunización mostraron que la respuesta total frente a los péptidos PTE de gp-160 (evaluada como la suma de CS IFN- γ /10⁶ de células detectada frente a cada uno de los *pools* de péptidos) fue significativamente mayor en el grupo inmunizado con los adyuvantes (IL-12₅₀+CTB) con respecto al grupo inmunizado sin ellos (Figura 25A, panel izquierdo). El incremento de esta respuesta hallado para el grupo IL-12₅₀+CTB fue 6 veces mayor ($p < 0,001$). Cuando la respuesta fue estudiada más en detalle teniendo en cuenta la cantidad de células reactivas frente a cada uno de los *pools* PTE, se observó que las diferencias entre los grupos estaba mediada por la respuesta dirigida contra los *pools* Gp120₁, Gp120₃ y Gp41₂ (Figura 25A, panel derecho) siendo mayor en el grupo IL-12₅₀+CTB. En la figura se muestran los datos de un experimento representativo de dos realizados. Las diferencias significativas frente al *pool* Gp41₂ fueron encontradas en los dos experimentos ($p < 0,01$) (barras sombreadas en la figura 25A). En cambio, la respuesta frente a los *pools* Gp120₁ y Gp120₃ resultaron significativamente mayores respecto al grupo IL-12₅₀+CTB en sólo uno de los experimentos ($p < 0,001$ y $p < 0,05$ respectivamente).

Con el fin de estudiar si estas diferencias se seguían manteniendo en tiempos más tardíos se evaluó la reactividad cruzada a los 53 días después del *boost* (Figura 25B) y se observó el mismo patrón que el encontrado a tiempos tempranos (Figura 25A). La respuesta total frente a todos los *pools* PTE de gp-160 fue significativamente mayor en el grupo inmunizado con ADN-IL-12 + CTB, superando entre 3 y 4 veces la respuesta encontrada en el grupo sin adyuvantes ($p < 0,01$) (Figura 25B, panel izquierdo). En el análisis individual de cada uno de los *pools*, se encontraron diferencias significativas frente a las mismas regiones detectadas previamente a los 10 días del *boost* (Gp120₁, Gp120₃ y Gp41₂) en uno de los experimentos realizados del cual se muestran los datos en la figura. En otro experimento independiente, sólo se observaron diferencias significativas con el *pool* Gp41₂ (barras sombreadas en la figura 25B).

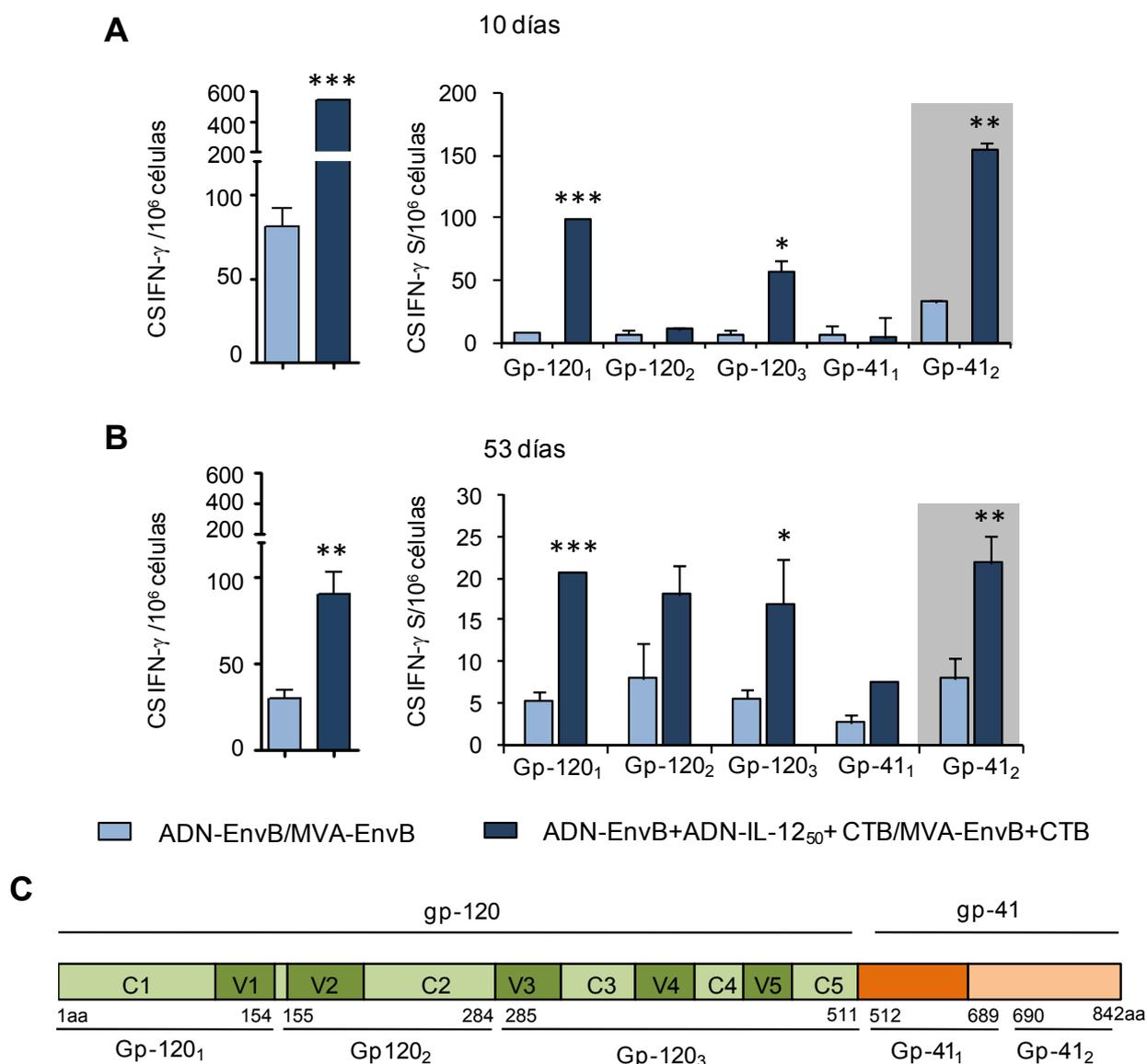


Figura 25. Evaluación de la calidad de la respuesta celular T mediante el análisis de la reactividad cruzada frente a péptidos de Env de otros subtipos de HIV.

Grupos de 6 ratones fueron inmunizados en ausencia de adyuvantes (barras claras) o con ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB (barras oscuras). Se cuantificó la respuesta celular inmune específica mediante el ensayo de ELISPOT en mezclas de células de bazo estimuladas con diferentes *pools* de péptidos PTE de Env. Se graficaron los resultados con muestras obtenidas luego de los 10 (A) y 53 (B) días del *boost*. En el panel izquierdo, las barras representan el número acumulado de células secretoras de IFN- γ por millón de células (CS IFN- γ /10⁶ células) para el total de los *pools* PTE. En el panel derecho, se muestra la magnitud de la respuesta frente a cada uno de los *pools*. Los datos provienen de 1 experimento de 2 realizados. Barras representan el promedio + SD de duplicados. Valores obtenidos en los pocillos de los controles negativos (sin estímulo) fueron sustraídos. Se indican las diferencias estadísticas con la prueba T de Student entre grupos: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001. (C) Esquema indicando las regiones de gp-120 y gp-41 incluidas en los diferentes *pools* de péptidos PTE.

Los resultados descritos en este apartado demuestran que la inmunización con la combinación IL-12₅₀+CTB induce una respuesta celular T capaz de generar un mayor reconocimiento de péptidos heterólogos en relación al antígeno expresado desde los vectores vacunales, aumentando así la amplitud de esta respuesta en comparación con la inmunización en ausencia de los adyuvantes.

6. Mejoras en la avidéz funcional celular T tanto en fase aguda como de memoria en el grupo IL-12₅₀+CTB.

Otra de las propiedades deseadas de la respuesta celular que se correlaciona con la efectividad de la función efectora es la avidéz que poseen las células T por el antígeno específico (129). Por tal motivo, se diseñó un ensayo *in vitro* que permitiera evaluar esta importante función celular T que consistió en un ensayo de ELISPOT utilizando células de bazo que fueron estimuladas con diluciones seriadas al décimo del péptido específico, siguiendo métodos descritos previamente (Ver sección 4.3.1 de Materiales y Métodos). A su vez, en los pocillos se puso una cantidad fija de esplenocitos de manera tal que, frente a concentraciones máximas u óptimas del antígeno se obtuviera el máximo de respuesta (entre 100 y 200 *spots* o puntos/pocillo).

La avidéz celular T está dada por la capacidad que poseen las células para reconocer a su ligando específico en bajas concentraciones. Los resultados se expresaron como la concentración de péptido requerida para obtener un 50% de la respuesta máxima celular T específica: DS₅₀ (Dosis sensibilizante de péptido requerido para alcanzar el 50% del máximo número de células T secretoras de IFN- γ), realizando curvas de tipo dosis-repuesta.

Se analizó la avidéz celular T inducida frente al péptido de Env (V3 *loop*) en el grupo control (ADN-EnvB/MVA-EnvB) y en el grupo inmunizado con el esquema IL-12₅₀+CTB (ADN-EnvB + ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB (10 μ g)/ MVA-EnvB + CTB (10 μ g)) a los 10 y 30 días de inmunizados a los ratones.

Las células provenientes de los animales del grupo inmunizado con la combinación de adyuvantes ADN-IL-12 + CTB mostraron significativamente mayor avidéz frente al péptido de Env, resultando el valor de DS₅₀ 3 veces menor en comparación al grupo inmunizado sin adyuvantes (1,18 frente a 3,48 ng/ml respectivamente, p=0,0136) (Figura 26A). Este resultado indica que las células T inducidas tras la inmunización IL-12₅₀+CTB tienen una mayor capacidad para detectar concentraciones más bajas del antígeno específico.

Cabe destacar que esta propiedad de las células T también se analizó a tiempos más tardíos, 30 días luego de la inmunización (Figura 26B) y se pudo observar que las diferencias entre ambos grupos se seguían manteniendo, e incluso eran mayores.

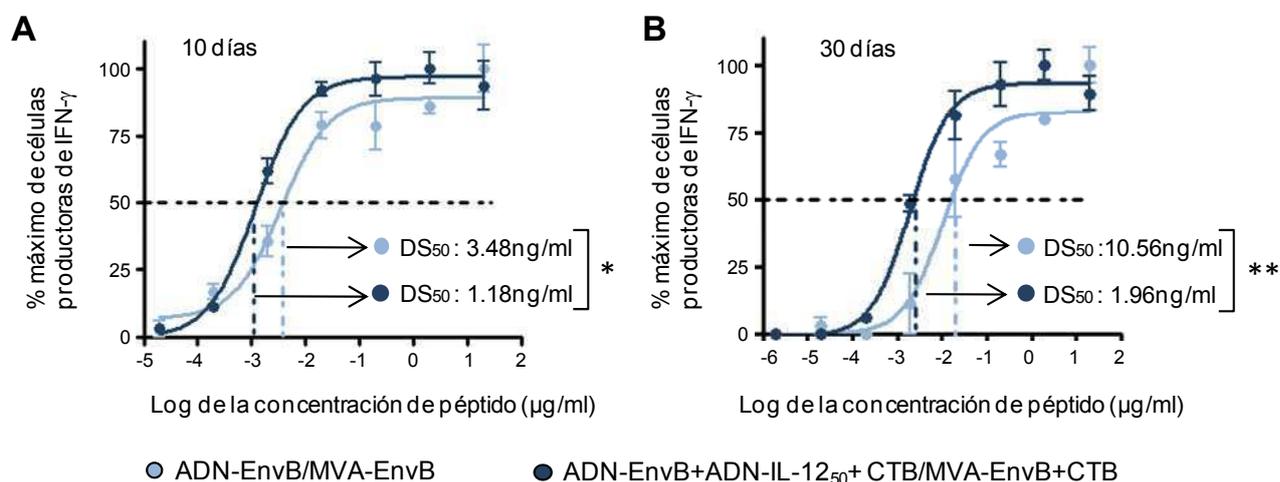


Figura 26. Estudio de la avidéz funcional de células T en muestras de bazo.

Mezclas de células de bazo de ratones (de 3 a 6 por grupo) inmunizados sin adyuvantes (puntos claros) y con IL-12₅₀+CTB (puntos oscuros) fueron analizados con un ensayo de avidéz funcional de células T específicas para el péptido de Env (V3 loop) a los 10 (A) y 30 (B) días luego de la inmunización. Se realizó el ensayo de ELISPOT utilizando diluciones seriadas del péptido de 20 a 0,00002 μg/ml en pocillos por triplicado. Cada punto representa el porcentaje promedio de la respuesta máxima. DS₅₀: Dosis sensibilizante de péptido requerido para alcanzar el 50% de la máxima producción de células T secretoras de IFN-γ. Diferencias estadísticas entre grupos: *p<0,05; **p<0,01 con la prueba de Mann-Whitney.

Mientras que en el grupo IL-12₅₀+CTB, el valor de DS₅₀ observado a los 10 días de la inmunización se mantuvo a los 30 días (1,18ng/ml y 1,96 ng/ml a los 10 y 30 días respectivamente, p>0,05), en el grupo sin adyuvantes el valor de DS₅₀ se incrementó en forma significativa durante la

fase de memoria de la respuesta (3,48 ng/ml frente a 10,56 ng/ml a los 10 y 30 días de la inmunización respectivamente, $p=0,026$), implicando una pérdida significativa en la avidéz de la respuesta T específica. Durante la fase de memoria, por lo tanto, la diferencia en la avidéz celular entre ambos grupos de inmunización es incrementada, resultando en el grupo con adyuvantes el valor de DS_{50} 5,4 veces menor respecto al valor observado en el grupo control ($p=0,0035$).

7. El potencial proliferativo de las células T es superior en el grupo inmunizado con IL-12 + CTB.

La necesidad de que las células del sistema inmune (tanto linfocitos B como T) tengan la capacidad de proliferar en respuesta a un antígeno específico es una propiedad muy importante en el desarrollo de una vacuna, ya que su rápida expansión permitiría responder más eficientemente contra patógenos, permitiendo la contención de la infección en primer lugar y eliminarla en última instancia.

Con el fin de evaluar el potencial proliferativo específico de la respuesta celular T en los grupos de ratones inmunizados, se realizó un ensayo de proliferación utilizando el método de tinción con CFSE y evaluando la respuesta por citometría de flujo. Esta metodología (descrita en detalle en la sección 4.5.3 de Materiales y Métodos) se basa en la tinción de los esplenocitos o células con CFSE a una concentración determinada para luego dejarlos estimulando *in vitro* con el antígeno específico durante 4 días. Aquellas células que responden al antígeno y que además poseen la capacidad de proliferar, se van a dividir para dar como resultado dos células hijas, y por lo tanto, el colorante CFSE se va a repartir en partes iguales en cada una de las células. De este modo, cuando estas células son analizadas mediante el citómetro de flujo, las que no proliferaron van a tener la intensidad de fluorescencia más alta debido a que conservan el colorante, y aquellas que sí se han dividido, diluyeron el colorante a la mitad respecto a la célula progenitora y debido a ello, va a tener menor intensidad de fluorescencia.

Los experimentos fueron llevados a cabo a los 10, 30 y 53 días luego de aplicado el esquema de inmunización en el grupo control (ADN-EnvB/MVA-EnvB) y en el que se aplicó ADN-IL-12 (50 µg) + CTB (ADN-EnvB + ADN-IL-12 (50 µg) + CTB (10 µg)/ MVA-EnvB + CTB (10 µg)) (Figura 27).

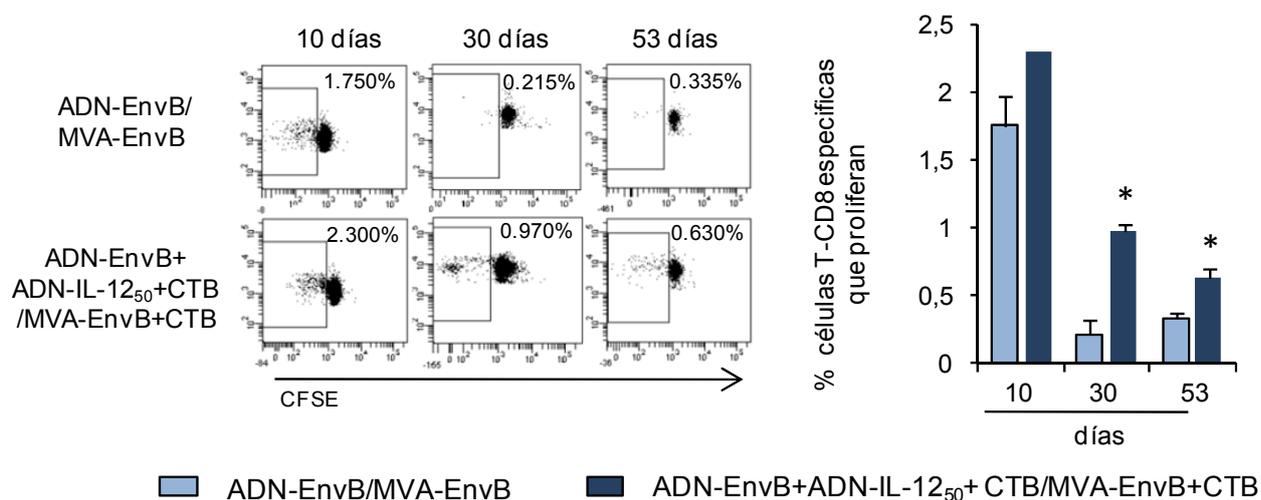


Figura 27. Potencial proliferativo de células de bazo.

La respuesta celular inmune específica fue analizada a los 10, 30 y 53 días del *boost* en grupos de ratones inmunizados en ausencia de adyuvantes (barras claras) o con ADN-IL-12 (50 µg) + CTB (barras oscuras). Las mezclas de células de bazo de 6 ratones fueron teñidas con CFSE y estimuladas *in vitro* durante 4 días con el péptido de Env (V3 loop) y luego marcadas con anticuerpos de superficie (CD3 y CD8). Las células T-CD8⁺ con baja intensidad de fluorescencia de CFSE (células que proliferaron) fueron determinados por citometría de flujo. Se muestra un gráfico de puntos representativo (panel izquierdo) y el porcentaje de células que proliferaron (panel derecho), donde las barras representan el promedio + SD de muestras por duplicado. Los valores obtenidos en los pocillos de los controles negativos (medio sin estímulo) fueron sustraídos. Se indican las diferencias estadísticas con la prueba T de Student entre grupos: *p<0,05.

Los resultados muestran que el porcentaje de células T-CD8 específicas capaces de proliferar a los 10 días de inmunizados los ratones, tendía a ser mayor en el grupo IL-12₅₀+CTB en comparación al grupo sin adyuvantes (2,3% frente a 1,75% respectivamente), pero esta diferencia no alcanzó la significancia estadística. Sin embargo, al analizar la respuesta a tiempos más tardíos, tanto a 30 como a 53 días del *boost*, las diferencias entre ambos grupos fueron más evidentes, mostrando un incremento significativo en la capacidad proliferativa. Así a los 30 días, el porcentaje

de proliferación específico que se obtuvo tras la inmunización con la combinación de adyuvantes fue 4 veces mayor respecto a la generada en el grupo control (0,97% frente a 0,21%, $p=0,012$) y a los 53 días fue de 1,9 veces (0,63% frente a 0,335%, $p=0,039$). En conclusión, a tiempos tempranos la capacidad proliferativa de las células T específicas en ambos grupos es similar, sin embargo, a tiempos tardíos, el beneficio de la inmunización con ADN-IL-12 (50 μg) + CTB se acentúa, siendo significativamente mayor la capacidad proliferativa específica en este grupo.

8. Sub-poblaciones de linfocitos T de memoria: Aumento de células T con fenotipos de estadios tempranos de diferenciación luego de la inmunización con ADN-IL-12 (50 μg) + CTB.

Los resultados de los estudios descriptos anteriormente en las secciones precedentes de Resultados, demostraron que la combinación de IL-12 junto con CTB mejoró la respuesta inmune celular a tiempos tardíos, tanto en términos de magnitud, amplitud, como de calidad de la respuesta celular T.

En los últimos años se han realizado avances en cuanto a la caracterización de las distintas sub-poblaciones de linfocitos T de memoria en relación a los distintos fenotipos y la función de los mismos. Se reconocen, típicamente, las células T de memoria central (T_{MC}), las cuales migran a tejidos linfoides, y las células T de memoria efectora (T_{ME}) que pueden migrar a múltiples tejidos periféricos. Recientemente, se ha descrito una tercera población de células T de memoria: Las células “*naïve like*” o células *stem* de memoria (T_{MCS}), que poseen alta capacidad proliferativa y son multipotentes. Además, tienen la capacidad de diferenciarse en T_{MC} y T_{ME} (130).

El análisis del posible impacto de la aplicación de adyuvantes en mucosas sobre el fenotipo celular T en memoria no ha sido explorado en profundidad hasta el momento. Por lo tanto, dada la importancia de la caracterización de las distintas subpoblaciones T de memoria, el objetivo siguiente consistió en realizar una caracterización del patrón fenotípico de la respuesta celular T de memoria inducida. Con el fin de evaluar si las mejoras obtenidas luego de la inmunización con ADN-IL-12 + CTB estaban acompañadas por diferencias en la generación de subpoblaciones de memoria celular

T específicas, a los 30 días luego de aplicado el esquema de inmunización al grupo sin adyuvante y al grupo IL-12₅₀+CTB, se analizó por citometría de flujo la respuesta celular T específica. Para ello se utilizó el ensayo de proliferación específica mediante tinción con CFSE en células de bazo que fueron estimuladas durante 4 días con el péptido específico o con medio solo. Se utilizaron además, marcadores de superficie para seleccionar las células T-CD8 (CD8⁺) y otros dos marcadores de superficie que son empleados para la identificación de las diferentes subpoblaciones celulares T de memoria: CD44 (marcador de activación celular) y CD62L (marcador de *homing* a ganglios linfáticos secundarios). Mediante la marcación de las células con estos anticuerpos se clasificaron a las células T-CD8 específicas con capacidad de proliferar en 4 subpoblaciones: Células *stem* de memoria o células “*naïve like*” (T_{MCS}; CD44L-CD62L+), memoria central (T_{MC}; CD44+ CD62L+), memoria efectora (T_{ME}; CD44+ CD62L-) y efectora terminal (T_{ET}; CD44- CD62L-).

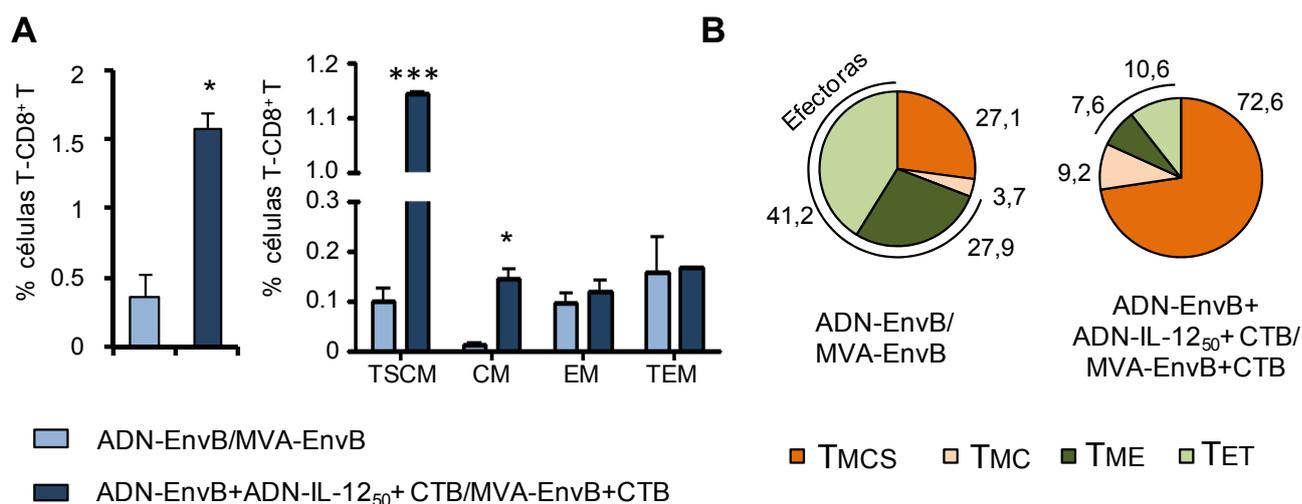


Figura 28. Caracterización de las subpoblaciones celulares T de memoria inducida luego de la inmunización.

A los 30 días del *boost*, mezclas de células de bazo de 6 ratones inmunizados sin adyuvantes (barras claras) y con IL-12₅₀+CTB (barras oscuras) fueron analizadas por citometría de flujo. Las células fueron marcadas con CFSE y estimuladas con el péptido de Env (V3 *loop*) durante 4 días y luego, las células fueron marcadas con anticuerpos de superficie (CD8, CD44 y CD62L). Células T-CD8⁺ con capacidad proliferativa (evaluada con el ensayo de dilución del CFSE) fueron clasificadas en 4 subpoblaciones de memoria. (A) Porcentaje de células T-CD8⁺ que proliferan (panel izquierdo) y porcentaje de células T-CD8⁺ que además de proliferar, poseen los siguientes fenotipos: Células *stem* de memoria (T_{MCS}; CD44L- CD62L+), memoria central (T_{MC}; CD44+ CD62L+) y efectora terminal (T_{ET}; CD44- CD62L-). (B) Porcentaje de células T-CD8⁺ específicas que expresan los fenotipos indicados. Las diferencias estadísticas entre grupos son indicadas: *p<0,05; ***p<0,001 mediante la prueba T de Student.

Como ya se había visto anteriormente (Figura 27), el porcentaje de células T-CD8 que proliferan en respuesta al péptido específico fue significativamente mayor en el grupo IL-12₅₀+CTB en comparación con el grupo sin adyuvantes, siendo la respuesta 4 veces superior. Al analizar la distribución de las subpoblaciones celulares T de memoria en cada uno de los grupos analizados, se puede observar que el grupo que recibió la combinación de adyuvantes mostró un incremento significativo de la proporción de células T-CD8 específicas con un fenotipo de memoria central (0,1455% frente a 0,013%; $p < 0,05$) y de células T *stem* de memoria (1,14% frente a 0,098%; $p < 0,001$) (Figura 28). En la figura 28B se muestra la distribución de las células T-CD8 específicas para el antígeno en los diferentes estadios de diferenciación para cada uno de los grupos de inmunización. Los resultados demuestran que luego de la inmunización con ADN-IL-12 (50 µg) + CTB, las subpoblaciones T de memoria con menores grados de diferenciación (T_{MCS} y T_{MC}) fueron incrementadas en forma significativa (82% en IL-12₅₀+CTB y 31% en el grupo sin adyuvantes), llevando a la consecuente reducción del fenotipo efector (T_{ME} y T_{ET}).

Estos resultados demuestran que, luego de la inmunización con ADN-IL-12 + CTB, se incrementan las subpoblaciones de células T de memoria específicas con fenotipos de memoria central y las células *stem* de memoria, con capacidad proliferativa específica frente al antígeno.

9. Ensayo de citotoxicidad *in vivo*: La aplicación de ADN-IL-12 + CTB generó un incremento en la actividad citotóxica *in vivo*.

Todos los experimentos y ensayos descriptos hasta el momento demostraron los beneficios de la co-inoculación de ADN-IL-12 + CTB en el esquema de inmunización intranasal ADN/MVA. Sin embargo, quizás una limitación que poseen la mayoría de los ensayos de evaluación de la respuesta celular específica es que son estudios *ex vivo* que son desarrollados *in vitro*, lo cual podría no siempre reflejar lo que sucede *in vivo*. Por lo tanto, se consideró importante realizar un ensayo que permitiera evaluar la calidad de la respuesta celular T inducida, pero *in vivo* de manera tal de realizar el análisis en el contexto del animal.

Para poder concretar este objetivo, se realizó un ensayo con el fin de medir el nivel de capacidad citotóxica de las células T-CD8 *in vivo* y así corroborar si las diferencias encontradas en los ensayos funcionales *in vitro* eran reproducidos por un ensayo *in vivo*.

Este experimento consistió en la inyección intravenosa de una mezcla de células de bazo marcadas con baja concentración de CFSE (CFSE_{bajo}) y células con alta concentración y pulsada con el péptido de Env (CFSE_{alto}) en ratones de diferentes grupos (*naïve*, sin adyuvantes y IL-12₅₀+CTB). A las 4 y 16 h de la inyección, los animales fueron sacrificados y se analizó la lisis específica en células de bazo por citometría de flujo. La figura 29 muestra los resultados obtenidos a los 10 y 30 días de la inmunización. En el panel izquierdo, se muestran los histogramas representativos de una muestra de ratón de cada uno de los grupos de ratones estudiados, en los cuales se pueden observar los dos picos correspondientes a las células inyectadas de CFSE_{alto} (pulsado con el péptido específico) y CFSE_{bajo} (no pulsado). En los ratones *naïve*, ambos picos son de tamaño similar a las 4 y 16 h de inyectadas las células, indicando que se recuperaron cantidades similares de cada una de las poblaciones marcadas con CFSE. En cambio, en los ratones que recibieron el esquema de inmunización intranasal, las células CFSE_{alto} se encontraban en menor proporción en relación a la población encontrada de CFSE_{bajo}. Esta diferencia resultó más evidente en el grupo inmunizado con IL-12₅₀+CTB. El porcentaje de citotoxicidad *in vivo* fue analizado a los 10 y 30 días de la última inmunización. El análisis luego de los 10 días, a las 4 y 16 h de transfundidas las células marcadas con CFSE muestra que en el grupo inmunizado con IL-12₅₀+CTB el porcentaje de citotoxicidad detectada fue superior en comparación al grupo sin adyuvantes, siendo el incremento 3,9 y 3,2 veces mayor a las 4 y 16 h respectivamente. Si bien, a las 4 h las diferencias encontradas no llegan a ser estadísticamente significativas, a las 16 h, la mediana de actividad citotóxica encontrada en el grupo de ratones con adyuvantes fue significativamente más alta en comparación con el grupo sin adyuvantes (valores de la mediana: 53,03% frente a 16,37%, $p=0,0043$). Este mismo ensayo se realizó durante la fase de memoria de la respuesta celular T adaptativa, luego de 30 días de aplicado el esquema de inmunización y se analizó la actividad citotóxica a las 16 h de la transfusión (Figura 29). Los resultados obtenidos

muestran que la actividad citotóxica aún era detectada en fase de memoria de la respuesta, y al comparar los niveles encontrados en cada uno de los grupos, la mediana del valor de citotoxicidad fue de 3,51% en el grupo sin adyuvantes frente a 17,51% con la combinación de ADN-IL-12₅₀+CTB (incremento de 5 veces, p=0,057).

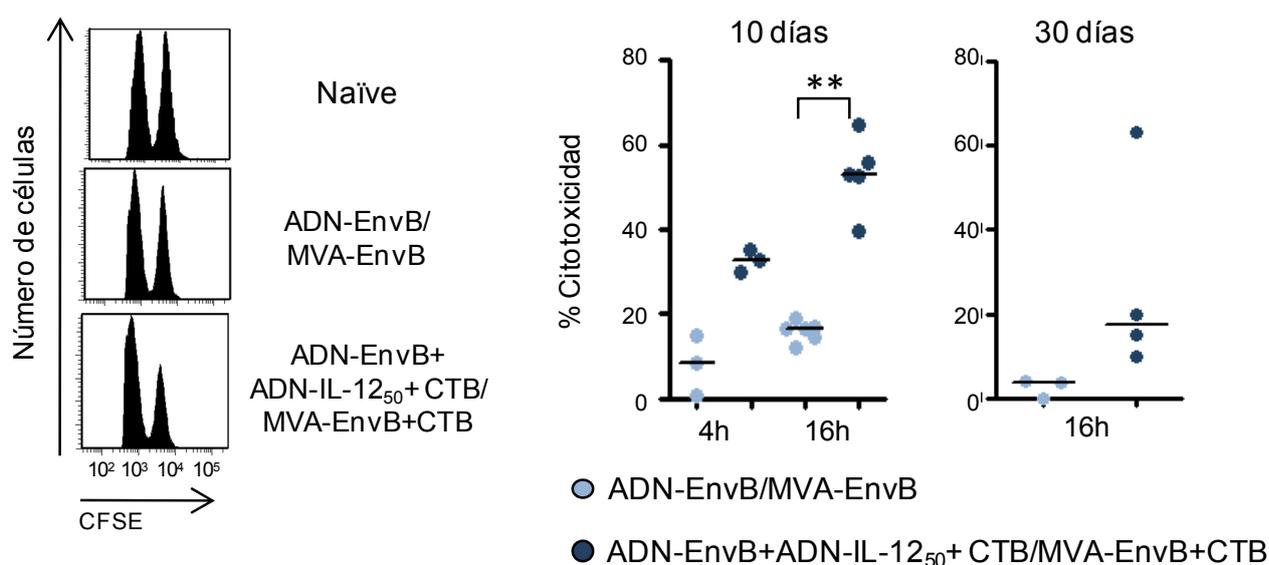


Figura 29. Actividad citotóxica específica de células T *in vivo*.

Ratones inmunizados en ausencia de adyuvantes (círculos claros) o con ADN-IL-12 (50 µg) + CTB (círculos oscuros) fueron analizados en un ensayo de citotoxicidad *in vivo* mediante transferencia adoptiva de células marcadas con baja concentración de CFSE como control y células de alta concentración de CFSE y con el péptido de Env cargado en su superficie. Luego de 10 y 30 días de la inmunización, bazo individual de ratones *naïve*, y de los 2 grupos de ratones inmunizados (sin adyuvantes y el grupo IL-12₅₀+CTB) fueron analizados en los tiempos indicados luego de la inyección intravenosa de células. A la izquierda se muestra un histograma representativo. Los puntos representan los resultados obtenidos en cada uno de los ratones. Líneas representan la mediana y se muestran las diferencias estadísticas entre grupos: **p<0,01 con la prueba de Mann-Whitney.

Es importante destacar que la realización de estos últimos ensayos nos permitió evaluar directamente *in vivo* la capacidad de las células T específicas de ejercer su actividad pudiendo comprobar que el esquema de inmunización optimizado ADN-IL-12 (50 µg) + CTB (ADN-EnvB + ADN-IL-12 (50 µg) + CTB (10 µg)/ MVA-EnvB + CTB (10 µg)) efectivamente generó un respuesta específica mejorada.

Estos últimos experimentos nos permitieron demostrar una correlación directa entre los ensayos de células T específicas realizados *in vitro* y las funciones efectoras de las células T ejercidas *in vivo*.

DISCUSIÓN

El SIDA es una enfermedad que afecta a todo el mundo y a 33 años del inicio de la pandemia, aún no se ha encontrado una vacuna efectiva frente al HIV para poder frenar la infección. Con el pasar de los años, se ha observado un descenso en el número de nuevas infecciones y de muertes en el mundo debido al mayor acceso a terapias antirretrovirales sumado a un mayor compromiso político, inversiones, programas estratégicos y avances científicos orientados a acabar con la epidemia del SIDA. Sin embargo, se calcula que a nivel mundial, de todas las personas que viven con HIV, tan solo cerca de la mitad tienen conocimiento de ello y hay indicios de que en algunos países se incrementó el comportamiento sexual de riesgo (heterosexual) y que además, aumentaron las nuevas infecciones en hombres que tienen sexo con hombres, obstaculizando los esfuerzos que se realizan para prevenir la transmisión del HIV. Otra de las problemáticas actuales es que hay países en donde los usuarios de drogas inyectables aún constituyen una parte considerable de la epidemia nacional y no hay compromiso político para reducir la transmisión del virus (6).

Según la Organización Mundial de la Salud, entre las 10 causas principales de defunción en el mundo (entre el 2000 y 2012) se encuentra el HIV/SIDA, ocupando el sexto lugar. Este panorama sin duda pone en evidencia la importancia de las investigaciones focalizadas en el desarrollo de estrategias de inmunización para HIV capaces de inducir una respuesta inmune potente especialmente en sitios de mucosas (ya que el virus se transmite principalmente a través de la mucosa genital) con el fin de poder evitar la transmisión del virus. Los avances científicos en este ámbito, pueden además ser útiles y aplicables a otras enfermedades infecciosas con impacto en el sistema inmune de mucosas. Por este motivo, la relevancia de expandir el conocimiento en cuanto a las estrategias relacionadas a vacunas de mucosas es de interés mundial, ya que muchos patógenos ingresan al cuerpo a través de las membranas de mucosas y por lo tanto, son necesarias vacunas efectivas con la habilidad para proteger estos sitios. Hay que tener en cuenta que, luego del desarrollo de la vacuna oral para polio, fueron pocas las nuevas vacunas de mucosas que fueron desarrolladas posteriormente y una de las razones por la cual esto ha ocurrido es por la falta de adyuvantes seguros y efectivos (42).

La mucosa genital, además de ser la ruta principal de transmisión del HIV, es susceptible a otros virus también causantes de enfermedades de transmisión sexual como por ejemplo, el virus de la hepatitis B (HBV) y el virus del papiloma humano (HPV), cuyas infecciones pueden ser prevenidas ya que existen vacunas para ello. Sin embargo, existen otras infecciones virales para las cuales, al igual que para el HIV, todavía no se ha encontrado una vacuna efectiva como por ejemplo, el virus del herpes simple (HSV) genital y el virus linfotrópico-T humano (HTLV). Con respecto al desarrollo de vacunas para HIV, la generación de inmunidad en las superficies de mucosas no son el objetivo de la mayoría de las vacunas que se están probando en ensayos clínicos a pesar de los estudios que demostraron la importancia de ello (131), excepto casos aislados (89, 132).

Por todo lo mencionado anteriormente, el objetivo de este trabajo fue el estudio y desarrollo de esquemas de inmunización eficientes capaces de generar inmunidad tanto a nivel de mucosas como a nivel sistémico frente a un antígeno de HIV. La estrategia de inmunización seleccionada fue de *prime/boost* empleando dos vectores vacunales ampliamente utilizados en la actualidad en ensayos clínicos de vacunas, como son los vectores de ADN y el vector viral atenuado MVA, que en este caso expresan la glicoproteína de envoltura de HIV-1 del subtipo B (EnvB).

Parte I. Control de expresión de vectores ADN y MVA

Los vectores vacunales recombinantes ADN-EnvB y MVA-EnvB, así como también, el adyuvante ADN-IL-12, no fueron generados en este estudio, si no que fueron cedidos gentilmente por diferentes laboratorios (ver sección 1.2 y 1.3 de Materiales y Métodos). Estos mismos vectores fueron utilizados anteriormente en trabajos ya publicados (39, 108, 110, 133).

Sin embargo, se realizaron los estudios preliminares pertinentes previos a la realización de los experimentos de inmunización para corroborar que todos los vectores expresasen efectivamente la proteína recombinante en forma correcta. Esto se realizó porque podría suceder que mutaciones

puntuales o deleciones ocurridas durante la replicación del vector (ya sea de ADN o MVA) podrían impedir la correcta expresión del inserto de interés.

Una vez realizados los controles de los diferentes reactivos biológicos, se procedió a desarrollar los diferentes experimentos en el modelo murino en los que los respectivos vectores se emplearon en los esquemas de inmunización ADN/MVA.

Discusión Parte II. Inmunización intranasal ADN/MVA con la aplicación de adyuvantes

Estudios previos han demostrado que la inmunización por ruta intranasal con esquemas de vacunación en los cuales se emplearon vectores MVA es eficaz para inducir una respuesta inmune específica de mucosas, utilizando como modelo antígenos de diferentes patógenos (66, 134). El modo de administración del antígeno en este trabajo de tesis, fue mediante la estrategia ADN-*prime*/MVA-*boost*, la cual ha sido ampliamente probada y está siendo actualmente empleada en diversas pruebas clínicas. La aplicación de estos esquemas de inmunización anti-HIV/SIV por ruta intranasal fueron previamente desarrollados en modelos murinos y en macacos (39, 87). En uno de estos estudios, se demostró que la vacunación por vía nasal de ADN/MVA, provee una protección más significativa de la progresión a SIDA que una vacunación intramuscular (87).

Para cumplir con el objetivo de desarrollar esquemas de inmunización eficientes, capaces de generar inmunidad tanto a nivel de mucosas como a nivel sistémico, se utilizaron varios esquemas de inmunización con el fin de seleccionar el más adecuado. Todos los grupos de ratones estudiados recibieron la aplicación de los vectores vacunales que consistieron en un *prime* de ADN-EnvB (50 µg) y 14 días después, el *boost* con MVA-EnvB (10^7 UFP) en ratones BALB/c por ruta intranasal. Los esquemas de inmunización que se detallan en la tabla 6, se diseñaron de forma tal que cada grupo se diferenciaba entre sí, en el uso de adyuvantes. Esto se debe a que en el diseño de estrategias de inmunización de mucosas, además de la elección de la ruta de inoculación y de los vectores vacunales, la selección de los adyuvantes apropiados es muy importante para poder generar una vacuna de mucosas efectiva. Por este motivo, los experimentos que corresponden a

esta segunda parte, tuvieron el objetivo de generar una respuesta inmune específica potente con el uso de diferentes adyuvante o combinación de ellos.

Fueron seleccionados 2 diferentes adyuvantes con potencial capacidad de incrementar la respuesta celular T sistémica y de mucosas: ADN-IL-12 y CTB. Para ello, se tuvieron en cuenta las propiedades de cada uno (ver Introducción, sección 3.7), sus antecedentes en aplicación en humanos, sumado a que hasta el momento del inicio del presente plan de tesis existía solamente un reporte en el que se analizó los posibles beneficios de la co-administración de las moléculas IL-12 y CTB por ruta intranasal en ratones BALB/c. En dicho estudio se utilizó una estrategia de inmunización basada en proteínas recombinantes tanto para el antígeno de HIV (gp-120 y gp-140) como para el adyuvante IL-12 y sólo fue analizada la capacidad para mejorar la respuesta inmune humoral tanto sistémica como en mucosas. Los autores concluyeron que IL-12 y CTB administrados por ruta intranasal actúan sinérgicamente para aumentar la respuesta de anticuerpos sistémicos y locales específicos para la glicoproteína de HIV (122). Este precedente positivo en cuanto a la potencialidad de las funciones de ambos adyuvantes (IL-12 y CTB) sirvió como aval para el diseño de los primeros experimentos de este trabajo. Más allá de este antecedente, hay que tener en cuenta que son muy escasos los estudios en donde se hayan analizado durante una inmunización ADN/MVA el efecto adyuvante de IL-12 por vía de mucosas (135), ni tampoco se ha analizado su efecto luego de su combinación con CTB al ser aplicado junto con estos vectores de inmunización.

El primer estudio que se realizó en este trabajo de tesis con el esquema de inmunización ADN/MVA, fue para comprobar que en nuestro modelo, el vector ADN-IL-12 poseía un efecto adyuvante al ser administrado por ruta intranasal y que esto era debido a la expresión de la citoquina IL-12 y no al vector de ADN, el cual podría tener un efecto adyuvante *per se* (136). Este estudio previo le da sentido al uso del ADN como vector de expresión de IL-12, el cual es el causante del efecto inmunomodulador observado luego de su administración por ruta intranasal. Cabe mencionar que este mismo vector de expresión fue utilizado previamente en otro trabajo como adyuvante en un esquema de inmunización ADN/MVA donde se analizó la respuesta celular frente al antígeno de Nef de HIV-1 en un modelo murino (133). La ruta de inmunización empleada en ese

caso fue intramuscular para la dosis de ADN e intraperitoneal para el MVA. Durante ese trabajo, también se ha constatado que el vector de ADN-IL-12 genera una modulación de la respuesta celular inmune debido a la expresión de IL-12, por lo que por ruta sistémica de inmunización, tampoco se genera un efecto adyuvante por parte del vector de ADN.

Una vez comprobada la efectividad de la aplicación de ADN como vector de expresión de IL-12, se realizaron los experimentos con los 7 grupos de inmunización (ver Tabla 6) donde fueron utilizados los adyuvantes ADN-IL-12 y CTB. Ambos fueron aplicados en forma individual, y en el caso de ADN-IL-12 se utilizaron dos diferentes dosis. También se aplicó la combinación ambos. Como control positivo, se utilizó al potente adyuvante de mucosas, CT (10 µg tanto en el *prime* como en el *boost*). Como control negativo, se utilizó un grupo inmunizado en ausencia de adyuvantes (ADN-EnvB/MVA-EnvB) para poder compararlo con el resto de los grupos en donde sí fueron aplicados alguno de los siguientes adyuvantes (ver tabla 6):

- ✓ ADN-IL-12: Dos grupos de inmunización. En uno de ellos se aplicó una dosis de 50 µg (IL-12₅₀) y en el otro, 100 µg (IL-12₁₀₀) durante en el *prime*.
- ✓ CTB: Un grupo de inmunización. 10 µg administrados tanto en el *prime* como en el *boost* (CTB).
- ✓ ADN-IL-12+CTB: Dos grupos. La combinación de ambos adyuvantes, utilizando las dos dosis de ADN-IL-12 aplicadas en el *prime* junto con la aplicación de 10 µg de CTB tanto en el *prime* como en el *boost* (IL-12₅₀+CTB e IL-12₁₀₀+CTB).

Los resultados (Figura 16) mostraron que la aplicación de los adyuvantes en forma individual, ya sean las dos dosis de ADN-IL-12 (50 y 100 µg) como así también CTB, indujeron un leve incremento en la magnitud de la respuesta inmune celular T-CD8 específica para el péptido de Env que no alcanzó la significancia estadística (cuantificado por ELISPOT como células secretoras de IFN-γ/10⁶ células) en comparación con la inmunización en ausencia de ellos. Esto se pudo observar en todas las muestras analizadas (en bazo y en ganglios cervicales e ilíacos).

Cuando en cambio, ADN-IL-12 (en una dosis de 50 o 100 µg) y CTB fueron administrados juntos durante el *prime* en un régimen de vacunación intranasal ADN/MVA, se generó un incremento

en la magnitud de la respuesta celular T-CD8 tanto en tejidos sistémicos (bazo) como también en ganglios linfáticos drenantes de la mucosa próxima al sitios de inmunización (ganglios cervicales: GC) y más importante aún, en ganglios drenantes de la mucosa genito-rectal (ganglios ilíacos: GI). La generación de respuesta anti-HIV en los ganglios ilíacos es destacable, debido a la relevancia de producir inmunidad específica en mucosas de tracto genital para evitar la infección por patógenos que pudieran ingresar al organismo por esos sitios.

La magnitud de la respuesta inmune celular en ganglios drenantes de mucosas (cervicales e ilíacos) fue similar para las dos dosis de ADN-IL-12 empleadas. En cambio, en el bazo, la menor dosis (50 µg) generó un incremento cooperativo con CTB en la magnitud de la respuesta detectándose un incremento mayor a 7 veces respecto a la respuesta encontrada en el grupo sin adyuvantes, y resultando la respuesta más alta con respecto al resto de los grupos de inmunización.

Estudios previos han demostrado que la co-administración de antígenos con CTB por vía de mucosas puede promover la inmunidad humoral en esos sitios, principalmente, de IgA secretoria (85). En el presente estudio se observó que CTB posee un efecto parcial como adyuvante de mucosa intranasal en un esquema de inmunización ADN/MVA. Si bien, la respuesta celular T-CD8 sistémica y en ganglios drenantes de mucosas se incrementó aproximadamente 2 veces con respecto al grupo sin adyuvantes, la diferencia no fue significativa estadísticamente y sólo se observó un 50% de eficacia del adyuvante. En un estudio previo en el cual, CTB incrementaba la respuesta celular T en el tracto genital luego de su administración en su sitio distal por ruta de mucosas (inmunización sublingual), el efecto de CTB sola no pudo ser efectivamente evaluado debido a que, cuando fue acoplado al antígeno (péptido Pol) la toxina colérica completa (CT) fue también administrada durante la inmunización (137). Un hecho similar ocurrió en otro trabajo en el cual, se estudió una proteína de fusión que consistía en la subunidad B de la toxina colérica y un péptido de 36 residuos correspondiente al ectodominio conservado de la membrana proximal de gp-41 (CTBMPR649-684). Esta construcción fue utilizada para inmunizar ratones por diferentes rutas, (intraperitoneal e intranasal), y se analizó su potencial para inducir anticuerpos anti-MPR649-684

sistémicos y en mucosas. Sin embargo, los esquemas de inmunización intranasal, fueron siempre acompañados de CT (138).

En relación a IL-12, su administración por ruta de mucosas fue previamente descrita y se ha demostrado que la citoquina al ser aplicada por estas rutas, resulta efectiva para incrementar la respuesta inmune celular sistémica y en mucosas cuando es aplicado con otras moléculas adyuvantes (93, 95). Sin embargo, el efecto de la interacción del IL-12 con CTB administrado por ruta intranasal no ha sido analizado en detalle. La expresión de IL-12 desde plásmidos de ADN ha demostrado ser un candidato prometedor a adyuvante ya que incrementa la respuesta inmune celular cuando es aplicado en un esquema de inmunización ADN-*prime*/Vector viral-*boost* frente a antígenos de HIV o SIV (110, 133, 139). Resulta interesante, que en un estudio preclínico realizado en macacos, se demostró que la inmunización por ruta sistémica con ADN-IL-12 en un esquema de inmunización ADN-*prime*/vector viral adenovirus-*boost* generó un aumento en el control de la replicación de un virus patogénico SIVmac239 que fue administrado luego de aplicado el esquema de inmunización a baja dosis y por ruta intrarectal (139).

Los resultados obtenidos con la aplicación de los adyuvantes demuestran que no sólo es importante elegir la combinación adecuada de estos, sino que además, se debe tener en cuenta la dosis aplicada de cada uno. Si bien, en algunos tejidos analizados, la dosis de ADN-IL-12 no posee efecto en la respuesta inmune cuando es aplicado con CTB (cuando es analizada la respuesta como CS IFN- γ /10⁶ células), se pudo observar que el incremento de la dosis puede tener efectos negativos en la magnitud de la respuesta inmune (Figura 16).

Si bien, este trabajo se encontraba enfocado en el estudio de la respuesta inmune celular específica debido a que el esquema de inmunización aplicado implicó una combinación de vectores que predominantemente modula el perfil celular de la respuesta, también se evaluó en todos los grupos de inmunización la respuesta inmune humoral ya que, previamente se han reportados anticuerpos específicos luego de la inmunización de mucosas ADN/MVA (39). Por otro lado, el análisis del aumento potencial de anticuerpos por la combinación IL-12 y CTB luego de la inmunización intranasal fue previamente descrito para gp-120 de HIV-1, con la diferencia respecto

a este trabajo, en que se utilizó una formulación de vacuna en la cual, tanto el antígeno como la citoquina fueron administrados como proteína recombinante (122). En ese estudio, se encontró que IL-12 y CTB actuaban en forma sinérgica para aumentar la respuesta de anticuerpos frente a la proteína de HIV-1 tanto sistémica como de mucosas. Teniendo en cuenta todo esto, se decidió cuantificar los niveles de anticuerpos específicos anti-Env generados en suero y en lavados vaginales.

Los ensayos mostraron que a nivel sistémico (suero), el grupo inmunizado con la combinación de adyuvantes ADN-IL-12 (50 µg) + CTB (no así, la dosis de 100 µg) generó mayores niveles de IgG específicos para la glicoproteína de envoltura comparado al grupo inmunizado sin adyuvantes. Al cuantificar las subclases de IgG, se observó un incremento de IgG1 en ese grupo respecto al control, y una tendencia de mayores niveles de IgG2a (no significativo en ninguno de los grupos de inmunización).

Cuando se analizó la relación IgG1/IgG2a, se pudo observar que el grupo de ratones inmunizados con ADN-IL-12 (50 µg) + CTB incrementó esta relación en comparación al grupo sin adyuvantes. La generación de una respuesta con perfil Th1 produce predominantemente anticuerpos IgG2a, y una de perfil Th2 produce predominantemente anticuerpos IgG1 (140). Por lo tanto, estos resultados demuestran que, la combinación de adyuvantes modula también la respuesta humoral específica hacia un incremento en la relación IgG1/IgG2a, que se relaciona al incremento de la respuesta Th2 (colaboración con células B).

En cuanto al estudio de los anticuerpos en mucosas, se cuantificó IgA específica en los lavados vaginales. Los valores obtenidos en las muestras de cada uno de los grupos de inmunización fueron en general muy dispersos. Sin embargo, en particular en el grupo inmunizados con ADN-IL-12 (50 µg) + CTB, observamos no sólo un incremento de IgA anti-Env de 4,1 veces con respecto al grupo sin adyuvantes, sino que los valores eran más homogéneos entre los diferentes ratones del grupo. Estos resultados indicaron que la respuesta inmune humoral sistémica y en mucosas puede ser estimulada en un esquema de inmunización intranasal ADN/MVA utilizando la combinación de adyuvantes ADN-IL-12 (50 µg) + CTB.

La relevancia de estos hallazgos debe a los antecedentes de diferentes trabajos que demostraron una correlación entre presencia de inmunidad específica en mucosas y protección frente a HIV, principalmente por la presencia de IgA específica en varias cohortes de personas expuestas seronegativas (ESN) (47-50). Por otro lado, en el ensayo clínico de fase III realizado en Tailandia (RV144) demostraron que los anticuerpos IgG dirigidos contra la región V1V2 de gp-120 (en particular, las subclases IgG1 e IgG3) pueden mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, los cuales se ha visto que poseen un rol importante en la protección contra la adquisición de HIV. Estudios como este sugieren que Env es esencial, y quizás suficiente para inducir una respuesta de anticuerpos protectivos contra HIV (141).

En conclusión, en esta segunda parte del trabajo de tesis, se pudo demostrar que el esquema de inmunización por ruta intranasal que consiste en una primera dosis de ADN-EnvB aplicado junto con los adyuvantes ADN-IL-12 en una dosis de 50 µg junto con CTB y un refuerzo con MVA-EnvB acompañado nuevamente de CTB (IL-12₅₀+CTB) fue el esquema que generó la respuesta inmune celular sistémica y en mucosas de mayor magnitud en comparación con los otros esquemas de inmunización, analizado en la fase aguda de la respuesta. Además, también pudimos comprobar que este esquema de inmunización también resultó efectivo para generar un incremento de la respuesta inmune humoral específica (tanto sistémica como en mucosa genital) respecto a los valores encontrados en el grupo control (ADN-EnvB/MVA-EnvB). La combinación de adyuvantes, por lo tanto, es capaz de modular tanto la respuesta celular como la humoral, sistémica y en mucosas

Discusión. Parte III: Combinación de ADN-IL-12 (50 µg) + CTB

Una vez analizada a grandes rasgos la respuesta inmune celular en los diferentes tejidos y la respuesta humoral tanto sistémica como de mucosas en cada uno de los grupos de inmunización, se procedió a evaluar más en detalle la respuesta generada en el grupo IL-12₅₀+CTB (ADN-EnvB + ADN-IL-12 (50 µg) + CTB / MVA-EnvB + CTB) en comparación con el grupo control (ADN-

EnvB/MVA-EnvB), estudiando la magnitud, amplitud y calidad de la respuesta. Se seleccionó a este grupo debido a que los resultados obtenidos anteriormente en conjunto, mostraron que el uso de esta combinación de adyuvantes generaba la respuesta más óptima, tanto en el análisis de la respuesta inmune tanto a nivel sistémico como en mucosas.

Existen evidencias que indican que la inducción de células T-CD8 específicas en la puerta de entrada de la mucosa del virus es crucial para controlar la replicación viral y además, retrasar la progresión a SIDA (142). Sin embargo, de las múltiples vacunas de mucosas para HIV probadas hasta el momento, son pocas en las que ha analizado la respuesta celular específica directamente en el sitio efector de la mucosa del tracto genital (137, 143). Por ejemplo, en una publicación reciente se describió una estrategia original de inmunización para HIV basada en IL-13R α 2, (receptor α 2 de IL-13: bloquea la actividad de IL-13 en el sitio de vacunación) la cual inducía mejoras en diversas funciones de las células T-CD8 de mucosas. Sin embargo, este efecto fue sólo analizado en ganglios linfáticos drenantes de mucosas, como ganglios ilíacos y placas de peyer, y como sitio efector de mucosas, los autores sólo evaluaron la respuesta en el pulmón (144).

Debido a que en los últimos años el análisis de la respuesta inmune en mucosas, ya sea frente al virus del HIV o luego de la aplicación de posibles vacunas frente al mismo ha tomado mayor importancia, se intenta en la actualidad poner a punto la extracción de muestras del tracto genital, ya sea de células o de fluidos, para poder utilizarlo en ensayos clínicos. Con el fin de estandarizar la toma de muestras de mucosas, se están realizando estudios metodológicos (145, 146) y de optimización (147). Por otro lado, también se evalúa la aceptabilidad por parte de las mujeres a acceder a la extracción de muestras de la mucosa genital (148). De hecho en nuestro laboratorio, hace unos años que se está trabajando en este sentido optimizando tanto la toma de muestras de mucosa genital femenina como la cuantificación de mediadores solubles y fenotipificación de células mononucleares de mucosa cervical.

Indudablemente, un hallazgo importante de este trabajo de tesis fue demostrar que el esquema de inmunización IL-12₅₀+CTB generó una mayor respuesta celular T-CD8 específica en

comparación al grupo sin adyuvantes en el tracto genital, el que funciona como un sitio efector de mucosas crucial ya que actúa como barrera frente al virus (ver Figura 19).

Debido a la importancia de que una vacuna efectiva tenga la capacidad de generar una respuesta inmune a largo plazo, se consideró importante evaluar la respuesta celular específica a tiempos más tardíos, ya en la fase de memoria. Como era de esperar, luego de 30 y 53 días posteriores a la inmunización, la respuesta inmune específica encontrada fue de menor magnitud en comparación a la obtenida en la fase aguda. Sin embargo, el efecto adyuvante en el grupo inmunizado con ADN-IL-12 (50 µg) + CTB mantuvo diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo inmunizado sin ellos, tanto en el bazo (respuesta sistémica) como en ganglios drenantes de la mucosa genito-rectal y más importante aún en el tracto genital (sitio efector de mucosas). Pudimos verificar por lo tanto, que las mejoras detectadas durante la fase aguda de la respuesta inmune fueron mantenidas durante la fase de memoria.

En el desarrollo de una vacuna para HIV, se sabe que no sólo es importante la magnitud de la respuesta específica, si no también, la calidad de dicha respuesta. Esto es debido a que las células T poseen diversas funciones efectoras con actividad antiviral y el estudio de los distintos aspectos de las funciones celulares T brinda información que puede ser muy útil para plantear estrategias que mejoren cada una de estas funciones y en última instancia, mejorar la respuesta inmune general inducida.

El análisis de la modulación del perfil funcional celular T en la fase aguda de la respuesta luego del esquema intranasal ADN/MVA con ADN-IL-12 (50 µg) + CTB mostró que entre los beneficios detectados en la respuesta celular T-CD8 específica se encuentra la generación de mayor proporción de células polifuncionales no sólo en las muestras de bazo, sino que además, en el tracto genital. Esto significa que se encontró mayor número de células capaces de realizar dos o tres funciones antivirales simultáneamente en respuesta al antígeno específico, como la secreción de citoquinas o capacidad citotóxica. En particular, en el tracto genital se encontró una mayor proporción de células capaces de producir IFN-γ, de células con actividad citotóxica y además, de células capaces de realizar estas dos funciones simultáneamente.

La importancia de la polifuncionalidad celular T, ha sido ampliamente descrita (123-125) y en el contexto de la infección y vacunación frente a HIV, varios estudios han encontrado una asociación de la respuesta polifuncional específica como un marcador indicativo de la eficacia celular T (126). De este modo, se cuantifica la expresión de IFN- γ , CD107a/b, MIP-1 α en forma individual y simultánea ya que se correlaciona con la inhibición viral.

En este trabajo, la combinación de adyuvantes generó tanto en células de bazo como de tracto genital, mayor proporción de células T-CD8 específicas para HIV bifuncionales que tenían simultáneamente la capacidad de degranular y secretar IFN- γ . Cabe destacar que estas dos funciones fueron previamente asociadas con mayor supresión de la replicación viral durante la infección aguda por HIV (149). Por otro lado, en otro trabajo también se ha visto una correlación entre la supresión viral y células T-CD8 polifuncionales donde una de sus funciones era producir IL-2 (150). En este trabajo de tesis, se observó que la combinación de adyuvantes generó un incremento de células trifuncionales capaces de producir IL-2 y además, IFN- γ y TNF- α .

Además del estudio de polifuncionalidad en las células de tracto genital, realizamos un ensayo con células de ganglios drenantes de la mucosa genito-rectal que nos permitió medir la concentración de citoquinas secretadas en sobrenadantes de cultivos al ser estimuladas con el antígeno específico en la respuesta aguda. Los datos obtenidos indicaron que en el grupo inmunizado con ADN-EnvB + ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB / MVA-EnvB + CTB se detectaron mayores niveles de determinadas citoquinas (IFN- γ , TNF- α , IL-5). En el bazo, la secreción de diferentes citoquinas pudimos analizarlas en la fase aguda de la respuesta mediante citometría flujo, pero también en fase memoria, cuantificando los niveles de secreción de citoquinas en sobrenadantes de cultivos. La respuesta en el grupo ADN-IL-12 (50 μ g) + CTB fue mayor, y estimuló preferentemente el perfil Th1 de la respuesta (IFN- γ , TNF- α , IL-2), asociado a un incremento de la respuesta celular T-CD8.

En el desarrollo de una vacuna, es muy importante que tenga la propiedad de reconocer y generar una respuesta inmune frente al antígeno con el que se inmunizó, pero también que sea capaz de reconocer diferentes variantes de dicho antígeno. En HIV podemos hablar de dos tipos de

variabilidades: a) la variabilidad genética debido a la alta tasa de replicación que posee el virus, generando cuasiespecies virales, y por el otro lado, b) la variabilidad generada por los diferentes subtipos de HIV en el mundo. En cuanto al primer punto, el reconocimiento de diferentes variantes impide la generación de mutantes de escape. Esto es, la variación en la secuencia aminoacídica de los epítopes celulares T-CD8, lo cual perjudica el procesamiento antigénico, ya sea por impedir la unión a la molécula MHC clase I, o por alteraciones en el reconocimiento con el TCR. En cuanto al segundo punto, la variabilidad es mucho más pronunciada debido a los subtipos y a las formas recombinantes circulantes (del inglés, CRF). Según la base de datos de HIV de Los Alamos National Laboratory (11), existen 9 subtipos, 2 sub-subtipos y se han reportado hasta 66 CRF. Por ese motivo se realizó en este trabajo el ensayo de evaluación de la reactividad cruzada donde los resultados demuestran que ADN-IL-12 (50 µg) + CTB en una inmunización ADN/MVA por ruta intranasal indujo mayor amplitud en la respuesta inmune inducida frente a péptidos de Env de diferentes subtipos de HIV tanto en la respuesta de fase aguda como de memoria. La inducción de una respuesta inmune celular de gran amplitud, capaz de reconocer las péptidos Env de diferentes subtipos de HIV, es una característica deseada para una vacuna de HIV. Esta propiedad podría beneficiar la respuesta inmune, ya que existen reportes donde se observó que la respuesta celular T-CD8 específica para HIV con mayor eficiencia en el reconocimiento de diferentes variantes de epítopes fueron asociados con un retraso en la progresión de la enfermedad (151).

Otra de las propiedades estudiadas en este trabajo y de destacada relevancia fue la avidéz de las células T-CD8 específicas generadas tras la inmunización. Las células T con alta avidéz funcional tienen la capacidad de responder a muy bajas dosis de antígeno, lo cual favorece la detección del virus a tiempos tempranos, impidiendo la diseminación a otros tejidos del organismo. En cuanto a la infección por HIV, estudios recientes demostraron que individuos con la capacidad para controlar la infección poseen células T-CD4 con la habilidad intrínseca para reconocer cantidades mínimas del antígeno Gag (152) y que además, la respuesta CTL de alta avidéz específica para este mismo antígeno y restringida a HLA-B correlacionaban con la supresión viral *in vivo* (153).

En relación al impacto potencial que podrían tener las vacunas de mucosas en la avidéz celular T, estudios previos indicaron la superioridad de la inmunización de mucosas (intranasal) para generar mayor avidéz en respuestas CTL en comparación a la inmunización por ruta sistémica (intramuscular) en un esquema de inmunización *prime/boost*, basado en una combinación de vectores virales Fowlpox/Vaccinia (154). En esta tesis, aunque no se comparó la ruta de inmunización de mucosas frente a la sistémica, se pudo demostrar la capacidad de ADN-IL-12 junto con CTB para aumentar la avidéz funcional de la respuesta celular T-CD8 inducida luego de la inmunización intranasal ADN/MVA. Cabe destacar que, las mejoras en la avidéz celular T durante la fase de memoria indicó que los valores de DS_{50} (la concentración de péptido requerida para inducir el 50% de la respuesta celular T-CD8 máxima) para el grupo inmunizado con IL-12 (50 μ g) + CTB fue 5,4 veces menor que lo observado en el grupo control. En cuanto a la influencia que podría tener la aplicación de citoquinas o adyuvantes durante la inmunización en la avidéz de los clones de células T específicas, estudios anteriores han descripto que IL-12 podría promover un incremento en la formación de la sinapsis entre células presentadoras de antígeno (CPAs) y células T, llevando al reconocimiento de péptidos que son débilmente antigénicos, incluyendo péptidos propios los cuales normalmente no se reconocerían (155). Además, se ha observado que la generación de CTLs de alta avidéz con fenotipo de memoria efectora es dependiente de IL-12 (156). Con respecto a CTB y sus efectos como adyuvante sobre la avidéz celular T, no se encuentra información hasta ahora sobre el tema.

Recientemente, en un estudio ya publicado realizado por nuestro grupo de investigación, se analizó el impacto de la incorporación de ADN-GM-CSF (del inglés: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) y ADN-IL-12 como adyuvantes en un esquema de inmunización sistémica ADN/MVA utilizando el antígeno de Nef de la variante CRF12_BF como modelo. En aquel trabajo se encontró que ADN-IL-12, producía una mejora similar a la reportada en este trabajo en cuanto a la calidad de la respuesta inmune específica en términos de amplitud (reactividad cruzada), avidéz funcional y además, de la capacidad proliferativa celular específica (133).

La capacidad que poseen las células de proliferar en respuesta a un estímulo permite la generación de clones que van a montar una respuesta inmune específica para combatir al antígeno más efectivamente (52). En este trabajo, se estudió la capacidad proliferativa específica frente a Env de las células T-CD8 provenientes de bazo, donde no se observaron diferencias significativas a los 10 días entre los dos grupos de inmunización analizados. Sin embargo, en la fase de memoria (a los 30 y 53 días), sí se observó mayor capacidad proliferativa en el grupo ADN-IL-12 (50 µg) + CTB debido a que en el grupo sin adyuvantes, esta función disminuye rápidamente a lo largo del tiempo, y en cambio, en el inmunizado con adyuvantes, esta capacidad es mantenida a tiempos tardíos.

Las células T de memoria han sido típicamente divididas en 2 subgrupos principales de poblaciones: Las células T de memoria central (T_{MC}) y las de memoria efectora (T_{ME}). Las T_{MC} se encuentran en áreas celulares T de ganglios linfáticos secundarios y poseen muy poca función efectora, pero sin embargo se caracterizan por su alta capacidad de proliferar y de diferenciarse a células efectoras en respuesta a un estímulo antigénico. Las T_{ME} son las células de memoria protectora que migran a los tejidos periféricos inflamados para llevar a cabo sus funciones efectoras. En el caso de las células T-CD8, estas funciones implican tener actividad citolítica y producir IFN- γ , TNF- α e IL-2 (157). Las subpoblaciones de células T de memoria pueden diferenciarse entre sí por la expresión de moléculas de *homing* a ganglios linfáticos en la superficie de la célula. Uno de los marcadores más comúnmente utilizados son CD62L (molécula de adhesión L-selectina) y CCR7 (receptor para la quimioquina CCL19). La alta expresión de ambos marcadores es lo que define a la subpoblación T_{MC} y los niveles más bajos corresponden a T_{ME} (158). En este trabajo, se utilizaron los marcadores CD62L (molécula de *homing* a ganglios linfáticos) y CD44 (molécula de activación) para poder identificar a ambas subpoblaciones. En este caso, la subpoblación T_{MC} posee un fenotipo de alta expresión de CD44 y CD62L (CD44⁺ CD62L⁺), y las T_{ME} poseen alta expresión de CD44 y baja expresión de CD62L (CD44⁺CD62L⁻). Las células que presentan en la superficie baja expresión de CD44 y alta de CD62L (CD44⁻ CD62L⁺) eran consideradas *naïve* debido a que son células que no presentan el marcador de activación, por lo que nunca vieron el antígeno y se encuentran en ganglios linfáticos. Sin embargo, estudios realizados más recientemente en ratones

demonstraron que la subpoblación celular T con fenotipo *naïve* teniendo en cuenta sólo dos marcadores de superficie, eran muy importantes en la respuesta inmune (159). Estudios más exhaustivos demostraron que estas células "*naïve like*" se diferenciaban de las verdaderas *naïve* (no estimuladas) debido a su alta capacidad de proliferación (superior a las T_{MC}) y a la expresión de otros marcadores como Sca-1, CD122 y Bcl-2 en ratones (160). Esta nueva subpoblación de memoria celular T, fue denominada entonces "células T de memoria *stem-cell*" (T_{MCS}). Esta población celular T descrita originalmente en modelos murinos (160, 161), fue luego identificada en humanos (126, 162). Debido a la relevancia que se le ha dado en estos últimos tiempos a las T_{MCS} , en este trabajo de tesis se consideró importante analizar la distribución de los fenotipos presentes dentro de las células T de memoria específicas, para comparar las proporciones de las subpoblaciones inducidas luego de aplicado el esquema de inmunización ADN/MVA en ausencia de adyuvantes o con la combinación ADN-IL-12 (50 µg) + CTB. La especificidad de las células T-CD8 para el antígeno de Env se evidenció por su capacidad de proliferar mediante el ensayo de tinción con CFSE, lo cual, favorecería la detección de las células T_{MCS} y las T_{MC} en menor medida. Al comparar ambos grupos, encontramos que las células de los ratones inmunizados con la combinación de adyuvantes mostraron una mayor proporción de células T-CD8 específicas con fenotipo T_{MC} (CD44+ CD62L+) y con un fenotipo compatible con la subpoblación T_{MCS} (CD44- CD62L+). Por lo tanto, las subpoblaciones de células T que resultaron significativamente incrementados luego de la co-administración de ADN-IL-12 + CTB estuvieron asociados con los estadios tempranos de la diferenciación celular (T_{MCS} y T_{MC}). (Figura 28).

Resulta interesante destacar que en otros trabajos previos se ha encontrado un patrón similar de la distribución del fenotipo de células T de memoria al encontrado en el presente estudio. En uno de ellos, se observó que en individuos vacunados con el virus Vaccinia (VACV), había una subpoblación celular T de memoria que presentaba funciones efectoras (polifuncionales) y que esas mismas tenían un fenotipo *naïve* (163). En otro trabajo, examinaron la relación entre el fenotipo celular T-CD8 y la actividad antiviral frente a HIV. Para ello, analizaron 3 grupos de individuos: infectados crónicos (HIV+), controladores *elite* (HIV+) y vacunados contra HIV con un esquema de

inmunización *prime-boost* heterólogo (con vectores ADN y adenovirus). Los resultados de ese trabajo mostraron que el grupo de individuos vacunados tenía una mayor proporción de células T-CD8 específicas de un estadio de diferenciación temprana, incluyendo una alta proporción del fenotipo de memoria temprana o “*naïve-like*”, en comparación con los controladores *elite*, mientras que los infectados crónicos son los que poseían la mayor proporción de células de estadios más diferenciados (T efectoras) (126).

En relación a estudios previos de vacunas desarrollados en el modelo murino, en los cuales se estudiaron las subpoblaciones de memoria celular T frente a antígenos específicos, se describió que una transferencia de células provenientes de ratones vacunados con *Mycobacterium bovis* BCG, expresando un fenotipo “*resting/naïve-like*” (CD44^{low} CD62L^{high}) similar a la encontrada en la presente tesis, fue capaz de proteger a los ratones receptores (Rag^{-/-}) de una infección con la cepa virulenta (159), destacando la función protectora de esta subpoblación celular T.

La identificación de la población celular T de memoria T_{MCS} en humanos caracterizada por su alta capacidad proliferativa y además, por una respuesta antitumoral protectora hizo que esta población sea considerada de gran relevancia para el diseño de vacunas y terapias celulares T (162). Por este motivo, en estos últimos años, publicaciones sobre esta nueva subpoblación celular T de memoria intentan dar más información sobre su funcionalidad en el contexto de HIV. Así, por un lado, se ha visto que las células T_{MCS} dentro la población T-CD4 se las ha relacionado con un posible reservorio de HIV que promueve la persistencia viral (164), y por el otro, dentro de las T-CD8, las células T_{MCS} se las ha asociado con una mejor prognosis en individuos crónicamente infectados (165). Por lo tanto, los encuentros en el presente estudio en relación a la capacidad de ADN-IL-12 + CTB durante la inmunización intranasal ADN/MVA para aumentar la proporción de células T-CD8 específicas con un fenotipo T_{MCS} tiene relevancia en el contexto del diseño de vacunas.

Finalmente, se desarrolló un ensayo CTL (linfocitos T citotóxicos) *in vivo* con el fin de hacer más profundo el análisis de la respuesta inmune generada (120). La desventaja de los ensayos *in vitro* y *ex vivo* frente a los realizados *in vivo* es que, a pesar de dar información muy importante

donde se puede analizar en detalle una característica en particular pudiendo maximizar el control de las variables del experimento, no se toma en cuenta la complejidad del microambiente donde la respuesta inmune ocurre realmente, y además, no siempre reproduce exactamente la realidad de lo que pasa *in vivo*. En este trabajo, los resultados demostraron la superior citotoxicidad específica *in vivo* tras la inmunización ADN/MVA incluyendo a los adyuvantes ADN-IL-12 (50 µg) + CTB (Figura 29). Estos ensayos mostraron la relevancia del innovador esquema de inmunización de mucosas ADN/MVA presentado en este trabajo. Un punto muy importante a destacar es que la capacidad citolítica específica de las células T-CD8 evaluada *in vivo*, puede ser considerada una medición indirecta de la capacidad protectora de la inmunidad celular T-CD8 generada. Este concepto fue claramente demostrado en el trabajo de Li et. al, previamente publicado (166), en el cual, los autores demostraron en ratones inmunizados que hay una correlación directa entre altos niveles de actividad citolítica *in vivo* frente a células blanco marcadas con el péptido Gag y la capacidad protectora frente a la infección con el virus Vaccinia recombinante para Gag. En el presente estudio, además de ADN como vector vacunal se utilizó el vector viral MVA recombinante que fue aplicado en el *boost* del esquema de inmunización, por lo que la inmunidad generada frente al vector no permitiría el uso del virus Vaccinia como modelo de desafío (debido a la reactividad cruzada entre ambos vectores virales). Otro punto importante a tener en cuenta es que, de las diferentes funciones efectoras de las células T, la actividad citolítica de las CTLs juega un rol preponderante durante la patogénesis SIV/HIV. Una de las principales evidencias de esto es que se ha demostrado ampliamente que la reducción de la viremia durante la infección aguda con HI/SIV está temporalmente asociada con la aparición de CTLs específicos contra el virus. Además, la respuesta CTL es muy importante en la contención del HIV y que el escape de CTL es asociado a rápida progresión a SIDA (167).

En resumen los resultados del presente trabajo de tesis muestran en conjunto que, los adyuvantes ADN-IL-12 + CTB pueden ser utilizados juntos en un esquema de inmunización ADN/MVA por ruta de mucosas para potenciar la respuesta inmune generada tanto a nivel sistémico como a nivel de mucosas.

El mecanismo por el cual IL-12 podría estar potenciando la respuesta inmune es que funcionaría como tercera señal en las células T-CD8 *naïve* (además de la co-estimulación TCR-CD28) para obtener una activación óptima, proliferar y diferenciarse en células efectoras (168, 169). Por otro lado, otros autores postulan que una señal corta a través de la interacción TCR y B7-CD28 gatillarían la división celular y que la señal por parte del receptor de IL-12 aseguraría la expansión clonal, funciones efectoras y el desarrollo de células de memoria (168).

En el caso de CTB, se sabe que es un buen adyuvante de mucosas, lo cual está ampliamente comprobado tanto en ensayos preclínicos (170) como clínicos y su uso está aprobado para aplicación humana como adyuvante de la vacuna oral frente al cólera (Dukoral), siendo una de las pocas vacunas de administración por vía de mucosas que posee licencia. Su mecanismo de acción como adyuvante no se conoce con mucho detalle y, paradójicamente, se ha visto que además CTB promueve la tolerancia oral frente a antígenos heterólogos (171). Algunos autores utilizan como estrategia de inmunización a CTB fusionada al antígeno ya que facilitaría la internalización del antígeno acoplado en las células dendríticas y la posterior presentación a través de la molécula de MHC clase I a una célula T-CD8 (172). En este trabajo, en cambio, se ha utilizado a CTB mezclado con el antígeno al igual que la formulación de la vacuna. El mecanismo de acción, en este caso, es diferente. Algunos postulan que el reconocimiento y unión de CTB al receptor GM1 podría estimular la upregulación de la expresión de B7-2 (o también conocido como CD86, ligando del receptor CD28) en células presentadoras de antígeno (CPA) y promover una respuesta inmune Th2 (170).

La descripción de esta nueva combinación de adyuvantes de mucosas en un estudio preclínico que implica el uso de ADN-IL-12 junto con CTB demuestra que podría ser potencialmente utilizado en el desarrollo de una vacuna de uso para humanos debido a los beneficios en la modulación de la respuesta inmune generada. Ambas moléculas ya fueron probadas en estudios clínicos en forma individual, por lo que es factible su uso ya que son seguras. En el caso de IL-12, ya ha sido utilizada en estudios clínicos (ya sea como proteína recombinante o expresada a partir de un vector de ADN) para diversas aplicaciones, como adyuvante para vacuna de HIV y terapias contra el cáncer (173).

Generalmente, se aplica por ruta subcutánea e intravenosa pero esto genera efectos indeseados. Por este motivo, una buena alternativa sería su administración por ruta intranasal (100). Sin embargo, la dosis a inmunizar por esta ruta no ha sido analizada aún en humanos.

Respecto a los beneficios de CTB, podemos decir que no sólo está probada clínicamente (107), sino que además, se encuentra disponible la vacuna contra el cólera denominada Dukoral, desarrollada en Suecia y aprobado su uso en ese país desde 1991. Esta vacuna contiene a la bacteria *Vibrio Cholerae* inactivada con el agregado de CTB (174) y es de administración oral. Estos antecedentes demuestran que sería posible utilizar a ambos adyuvantes en forma conjunta por ruta de mucosas para el desarrollo de vacunas en humanos. En este trabajo, se describió la capacidad de modular la respuesta inmune en un esquema de inmunización ADN/MVA que también se encuentra ampliamente utilizado en ensayos clínicos.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo de tesis demuestran por primera vez que la respuesta inmune celular inducida tras un esquema de inmunización intranasal ADN/MVA puede ser incrementada en términos de magnitud, amplitud y calidad de la respuesta, por la co-administración de ADN-IL-12 (50 µg) + CTB como adyuvantes de mucosas. Más específicamente, se enumeran a continuación, las conclusiones más importantes obtenidas de los experimentos realizados y los beneficios del uso de la combinación de adyuvantes (ADN-IL-12 + CTB):

- ✓ La respuesta generada mediante este esquema de inmunización fue de mayor magnitud induciendo una elevada respuesta celular T-CD8 específica para HIV a nivel sistémico y más importante, en sitios de mucosas tales como tejidos de tracto genital y ganglios ilíacos.
- ✓ La respuesta CTL específica encontrada fue de calidad superior mostrando mayor polifuncionalidad, un amplio perfil de citoquinas secretadas, un incremento en la avidéz funcional y en la capacidad de proliferar.
- ✓ Las mejoras observadas en la fase aguda de la respuesta adaptativa fueron mantenidas durante la fase de memoria donde se encontró mayor proporción de las subpoblaciones celulares T de memoria específicas con fenotipo correspondiente a estadios de diferenciación temprana (T_{MC} y T_{MCS}).
- ✓ Mediante un ensayo de citotoxicidad *in vivo* se pudo demostrar además que la inmunización con la combinación de adyuvantes generó un incremento de la respuesta celular T-CD8 específica *in vivo*.

Por último, todos los estudios realizados en este trabajo de tesis, demuestran que la combinación de adyuvantes ADN-IL-12 + CTB podrían ser utilizados en esquemas de inmunización ADN/MVA para potenciar la respuesta inmune de mucosas con el fin de desarrollar vacunas para enfermedades que hasta el día de hoy, no se cuenta con vacunas efectivas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, Wormser G, Brettman L, Lange M, Murray HW, Cunningham-Rundles S.** 1981. *An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. The New England journal of medicine.* **305:** 1431-1438.
2. **Fauci AS.** 2003. *HIV and AIDS: 20 years of science. Nature medicine.* **9:** 839-843.
3. **Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.** 1983. *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science (New York, N.Y.)* **220:** 868-871.
4. **Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, et al.** 1986. *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science (New York, N.Y.)* **233:** 343-346.
5. **Kong LI, Lee SW, Kappes JC, Parkin JS, Decker D, Hoxie JA, Hahn BH, Shaw GM.** 1988. *West African HIV-2-related human retrovirus with attenuated cytopathicity. Science (New York, N.Y.)* **240:** 1525-1529.
6. <http://www.unaids.org/>.
7. <http://www.msal.gov.ar/sida/>.
8. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>.
9. <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/howHIVCausesAIDS/Pages/howhiv.aspx>.
10. **Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR.** 2002. *DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. Immunity.* **16:** 135-144.
11. www.hiv.lanl.gov.
12. **Rodriguez AM, Turk G, Pascutti MF, Falivene J, Gherardi MM.** 2010. *[Development of vaccines for HIV-1. Relevance of subtype-specific cellular immunity]. Medicina.* **70:** 543-554.
13. **Maartens G, Celum C, Lewin SR.** 2014. *HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. Lancet.* **384:** 258-271.
14. **Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q.** 2006. *HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. Lancet.* **368:** 489-504.
15. **Lifson AR, Buchbinder SP, Sheppard HW, Mawle AC, Wilber JC, Stanley M, Hart CE, Hessol NA, Holmberg SD.** 1991. *Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. The Journal of infectious diseases.* **163:** 959-965.
16. **Hoover DR, Rinaldo C, He Y, Phair J, Fahey J, Graham NM.** 1995. *Long-term survival without clinical AIDS after CD4+ cell counts fall below 200 x 10(6)/l. AIDS (London, England).* **9:** 145-152.
17. **Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF.** 1997. *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. Nature.* **387:** 183-188.
18. **Alter HJ, Klein HG.** 2008. *The hazards of blood transfusion in historical perspective. Blood.* **112:** 2617-2626.
19. **Cohen JE, Amon JJ.** 2008. *Health and human rights concerns of drug users in detention in Guangxi Province, China. PLoS medicine.* **5:** e234.
20. **Ahmad N.** 2011. *Molecular mechanisms of HIV-1 mother-to-child transmission and infection in neonatal target cells. Life sciences.* **88:** 980-986.
21. **Van de Perre P.** 2000. *Breast milk transmission of HIV-1. Laboratory and clinical studies. Annals of the New York Academy of Sciences.* **918:** 122-127.
22. **Shaw GM, Hunter E.** 2012. *HIV transmission. Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* **2.**
23. **Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li X, Laeyendecker O, Kiwanuka N, Kigozi G, Kiddugavu M, Lutalo T, Nalugoda F, Wabwire-Mangen F, Meehan MP,**

- Quinn TC. 2005. Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *The Journal of infectious diseases*. **191**: 1403-1409.
24. Fleming DT, Wasserheit JN. 1999. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sexually transmitted infections*. **75**: 3-17.
25. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ. 2006. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS (London, England)*. **20**: 73-83.
26. Tobian AA, Gray RH, Quinn TC. 2010. Male circumcision for the prevention of acquisition and transmission of sexually transmitted infections: the case for neonatal circumcision. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. **164**: 78-84.
27. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, Rosenzweig M, Johnson RP, Desrosiers RC, Lackner AA. 1998. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science (New York, N.Y.)*. **280**: 427-431.
28. <http://www.hivmedicine.com/hivmedicine2006.pdf>.
29. Grinsztejn B, Hosseinipour MC, Ribaudo HJ, Swindells S, Eron J, Chen YQ, Wang L, Ou SS, Anderson M, McCauley M, Gamble T, Kumarasamy N, Hakim JG, Kumwenda J, Pilotto JH, Godbole SV, Chariyalertsak S, de Melo MG, Mayer KH, Eshleman SH, Piwowar-Manning E, Makhema J, Mills LA, Panchia R, Sanne I, Gallant J, Hoffman I, Taha TE, Nielsen-Saines K, Celentano D, Essex M, Havlir D, Cohen MS. 2014. Effects of early versus delayed initiation of antiretroviral treatment on clinical outcomes of HIV-1 infection: results from the phase 3 HPTN 052 randomised controlled trial. *The Lancet*. **14**: 281-290.
30. <http://www.iavireport.org>.
31. http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/whatisanhivvaccine_fs_en.pdf.
32. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premrsri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH. 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England journal of medicine*. **361**: 2209-2220.
33. Kim JH, Rerks-Ngarm S, Excler JL, Michael NL. 2010. HIV vaccines: lessons learned and the way forward. *Current opinion in HIV and AIDS*. **5**: 428-434.
34. Haynes BF, Moody MA, Alam M, Bonsignori M, Verkoczy L, Ferrari G, Gao F, Tomaras GD, Liao HX, Kelsoe G. 2014. Progress in HIV-1 vaccine development. *The Journal of allergy and clinical immunology*. **134**: 3-10; quiz 11.
35. Taylor BS, Hammer SM. 2008. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *The New England journal of medicine*. **359**: 1965-1966.
36. Chanzu N, Ondondo B. 2014. Induction of Potent and Long-Lived Antibody and Cellular Immune Responses in the Genitoretal Mucosa Could be the Critical Determinant of HIV Vaccine Efficacy. *Frontiers in immunology*. **5**: 202.
37. Haase AT. 2010. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature*. **464**: 217-223.
38. Lamichhane A, Azegami T, Kiyono H. 2014. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine*. **32**: 6711-6723.
39. Gherardi MM, Perez-Jimenez E, Najera JL, Esteban M. 2004. Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. *J Immunol*. **172**: 6209-6220.
40. Fainboim L, Geffner J eds. (2011) *Introducción a la Inmunología Humana* (Editorial Médica Panamericana).
41. Cesta MF. 2006. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicologic pathology*. **34**: 599-608.

42. **Lycke N.** 2012. *Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations.* *Nat Rev Immunol.* **12:** 592-605.
43. **Shattock RJ, Haynes BF, Pulendran B, Flores J, Esparza J.** 2008. *Improving defences at the portal of HIV entry: mucosal and innate immunity.* *PLoS medicine.* **5:** e81.
44. **Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC.** 2004. *CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract.* *The Journal of experimental medicine.* **200:** 749-759.
45. **Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, Boden D, Racz P, Markowitz M.** 2004. *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract.* *The Journal of experimental medicine.* **200:** 761-770.
46. **Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M.** 2005. *Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection.* *Nature.* **434:** 1093-1097.
47. **Lo Caputo S, Trabattoni D, Vichi F, Piconi S, Lopalco L, Villa ML, Mazzotta F, Clerici M.** 2003. *Mucosal and systemic HIV-1-specific immunity in HIV-1-exposed but uninfected heterosexual men.* *AIDS (London, England).* **17:** 531-539.
48. **Devito C, Hinkula J, Kaul R, Kimani J, Kiama P, Lopalco L, Barass C, Piconi S, Trabattoni D, Bwayo JJ, Plummer F, Clerici M, Broliden K.** 2002. *Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects.* *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999).* **30:** 413-420.
49. **Devito C, Hinkula J, Kaul R, Lopalco L, Bwayo JJ, Plummer F, Clerici M, Broliden K.** 2000. *Mucosal and plasma IgA from HIV-exposed seronegative individuals neutralize a primary HIV-1 isolate.* *AIDS (London, England).* **14:** 1917-1920.
50. **Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwangi FM, Kariuki C, Ngugi EN, MacDonald KS, Ball TB, Clerici M, Plummer FA.** 1999. *HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers.* *AIDS (London, England).* **13:** 23-29.
51. **Kaul R, Plummer FA, Kimani J, Dong T, Kiama P, Rostron T, Njagi E, MacDonald KS, Bwayo JJ, McMichael AJ, Rowland-Jones SL.** 2000. *HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi.* *J Immunol.* **164:** 1602-1611.
52. **Hirbod T, Kaul R, Reichard C, Kimani J, Ngugi E, Bwayo JJ, Nagelkerke N, Hasselrot K, Li B, Moses S, MacDonald KS, Broliden K.** 2008. *HIV-neutralizing immunoglobulin A and HIV-specific proliferation are independently associated with reduced HIV acquisition in Kenyan sex workers.* *AIDS (London, England).* **22:** 727-735.
53. **Genesca M, Skinner PJ, Hong JJ, Li J, Lu D, McChesney MB, Miller CJ.** 2008. *With minimal systemic T-cell expansion, CD8+ T Cells mediate protection of rhesus macaques immunized with attenuated simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6 from vaginal challenge with simian immunodeficiency virus.* *Journal of virology.* **82:** 11181-11196.
54. **Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA.** 1999. *Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes.* *Science (New York, N.Y.).* **283:** 857-860.
55. **Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, Irwin CE, Safrit JT, Mittler J, Weinberger L, Kostrikis LG, Zhang L, Perelson AS, Ho DD.** 1999. *Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques.* *The Journal of experimental medicine.* **189:** 991-998.
56. **Betts MR, Krowka JF, Kepler TB, Davidian M, Christopherson C, Kwok S, Louie L, Eron J, Sheppard H, Frelinger JA.** 1999. *Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte activity is inversely correlated with HIV type 1 viral load in HIV type 1-infected long-term survivors.* *AIDS research and human retroviruses.* **15:** 1219-1228.

57. **Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, Nixon DF, McMichael AJ.** 1998. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science (New York, N.Y.)* **279**: 2103-2106.
58. **Schoenly KA, Weiner DB.** 2008. Human immunodeficiency virus type 1 vaccine development: recent advances in the cytotoxic T-lymphocyte platform "spotty business". *Journal of virology*. **82**: 3166-3180.
59. **Musey L, Hughes J, Schacker T, Shea T, Corey L, McElrath MJ.** 1997. Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine*. **337**: 1267-1274.
60. **Newman MJ.** 2002. Heterologous prime-boost vaccination strategies for HIV-1: augmenting cellular immune responses. *Curr Opin Investig Drugs*. **3**: 374-378.
61. **McShane H.** 2002. Prime-boost immunization strategies for infectious diseases. *Current opinion in molecular therapeutics*. **4**: 23-27.
62. **Woodland DL.** 2004. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends in immunology*. **25**: 98-104.
63. **Ramshaw IA, Ramsay AJ.** 2000. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunology today*. **21**: 163-165.
64. **Belyakov IM, Ahlers JD.** 2008. Functional CD8+ CTLs in mucosal sites and HIV infection: moving forward toward a mucosal AIDS vaccine. *Trends in immunology*. **29**: 574-585.
65. **Dunachie SJ, Hill AV.** 2003. Prime-boost strategies for malaria vaccine development. *The Journal of experimental biology*. **206**: 3771-3779.
66. **Gherardi MM, Esteban M.** 2005. Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *The Journal of general virology*. **86**: 2925-2936.
67. **Li S, Rodrigues M, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Palese P, Nussenzweig RS, Zavala F.** 1993. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **90**: 5214-5218.
68. **McShane H, Brookes R, Gilbert SC, Hill AV.** 2001. Enhanced immunogenicity of CD4(+) t-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infection and immunity*. **69**: 681-686.
69. **Hanke T, Blanchard TJ, Schneider J, Hannan CM, Becker M, Gilbert SC, Hill AV, Smith GL, McMichael A.** 1998. Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine*. **16**: 439-445.
70. **Radaelli A, De Giuli Morghen C, Zanutto C, Pacchioni S, Bissa M, Franconi R, Massa S, Paolini F, Muller A, Venuti A.** 2012. A prime/boost strategy by DNA/fowlpox recombinants expressing a mutant E7 protein for the immunotherapy of HPV-associated cancers. *Virus research*. **170**: 44-52.
71. **Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, Yang ZY, Nabel GJ.** 2000. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature*. **408**: 605-609.
72. **Khan KH.** 2013. DNA vaccines: roles against diseases. *Germs*. **3**: 26-35.
73. **Morrow MP, Weiner DB.** 2008. Cytokines as adjuvants for improving anti-HIV responses. *AIDS (London, England)*. **22**: 333-338.
74. **Hu K, Luo S, Tong L, Huang X, Jin W, Huang W, Du T, Yan Y, He S, Griffin GE, Shattock RJ, Hu Q.** 2013. CCL19 and CCL28 augment mucosal and systemic immune responses to HIV-1 gp140 by mobilizing responsive immunocytes into secondary lymph nodes and mucosal tissue. *J Immunol*. **191**: 1935-1947.
75. **McFadden G.** 2005. Poxvirus tropism. *Nature reviews*. **3**: 201-213.
76. **Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG.** 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*. **244**: 365-396.
77. **McCurdy LH, Larkin BD, Martin JE, Graham BS.** 2004. Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine. *Clin Infect Dis*. **38**: 1749-1753.

78. **Boukhebz H, Bellon N, Limacher JM, Inchauspe G.** 2012. *Therapeutic vaccination to treat chronic infectious diseases: current clinical developments using MVA-based vaccines. Human vaccines & immunotherapeutics.* **8:** 1746-1757.
79. **Volz A, Sutter G.** 2013. *Protective efficacy of Modified Vaccinia virus Ankara in preclinical studies. Vaccine.* **31:** 4235-4240.
80. **Huang X, Liu L, Ren L, Qiu C, Wan Y, Xu J.** 2007. *Mucosal priming with replicative Tiantan vaccinia and systemic boosting with DNA vaccine raised strong mucosal and systemic HIV-specific immune responses. Vaccine.* **25:** 8874-8884.
81. **Ranasinghe C, Medveczky JC, Woltring D, Gao K, Thomson S, Coupar BE, Boyle DB, Ramsay AJ, Ramshaw IA.** 2006. *Evaluation of fowlpox-vaccinia virus prime-boost vaccine strategies for high-level mucosal and systemic immunity against HIV-1. Vaccine.* **24:** 5881-5895.
82. **Buonaguro L, Devito C, Tornesello ML, Schroder U, Wahren B, Hinkula J, Buonaguro FM.** 2007. *DNA-VLP prime-boost intra-nasal immunization induces cellular and humoral anti-HIV-1 systemic and mucosal immunity with cross-clade neutralizing activity. Vaccine.* **25:** 5968-5977.
83. **Gherardi MM, Najera JL, Perez-Jimenez E, Guerra S, Garcia-Sastre A, Esteban M.** 2003. *Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes. Journal of virology.* **77:** 7048-7057.
84. **Robinson HL.** 2002. *New hope for an AIDS vaccine. Nat Rev Immunol.* **2:** 239-250.
85. **Holmgren J, Czerkinsky C.** 2005. *Mucosal immunity and vaccines. Nature medicine.* **11:** S45-53.
86. **Belyakov IM, Ahlers JD.** 2009. *What role does the route of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens? J Immunol.* **183:** 6883-6892.
87. **Manrique M, Kozlowski PA, Wang SW, Wilson RL, Micewicz E, Montefiori DC, Mansfield KG, Carville A, Aldovini A.** 2009. *Nasal DNA-MVA SIV vaccination provides more significant protection from progression to AIDS than a similar intramuscular vaccination. Mucosal immunology.* **2:** 536-550.
88. **Azizi A, Ghunaim H, Diaz-Mitoma F, Mestecky J.** 2010. *Mucosal HIV vaccines: a holy grail or a dud? Vaccine.* **28:** 4015-4026.
89. **Brekke K, Lind A, Holm-Hansen C, Haugen IL, Sorensen B, Sommerfelt M, Kvale D.** 2014. *Intranasal administration of a therapeutic HIV vaccine (Vacc-4x) induces dose-dependent systemic and mucosal immune responses in a randomized controlled trial. PloS one.* **9:** e112556.
90. **Leroux-Roels G, Maes C, Clement F, van Engelenburg F, van den Dobbelen M, Adler M, Amacker M, Lopalco L, Bomsel M, Chalifour A, Fleury S.** 2013. *Randomized Phase I: Safety, Immunogenicity and Mucosal Antiviral Activity in Young Healthy Women Vaccinated with HIV-1 Gp41 P1 Peptide on Virosomes. PloS one.* **8:** e55438.
91. **Pialoux G, Hocini H, Perusat S, Silberman B, Salmon-Ceron D, Slama L, Journot V, Mathieu E, Gaillard C, Petitprez K, Launay O, Chene G.** 2008. *Phase I study of a candidate vaccine based on recombinant HIV-1 gp160 (MN/LAI) administered by the mucosal route to HIV-seronegative volunteers: the ANRS VAC14 study. Vaccine.* **26:** 2657-2666.
92. **Sanchez J, Holmgren J.** 2008. *Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. Cell Mol Life Sci.* **65:** 1347-1360.
93. **Staats HF, Bradney CP, Gwinn WM, Jackson SS, Sempowski GD, Liao HX, Letvin NL, Haynes BF.** 2001. *Cytokine requirements for induction of systemic and mucosal CTL after nasal immunization. J Immunol.* **167:** 5386-5394.
94. **Ahlers JD, Belyakov IM.** 2010. *Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory. Blood.* **115:** 1678-1689.
95. **Belyakov IM, Ahlers JD, Clements JD, Strober W, Berzofsky JA.** 2000. *Interplay of cytokines and adjuvants in the regulation of mucosal and systemic HIV-specific CTL. J Immunol.* **165:** 6454-6462.

96. **Toka FN, Pack CD, Rouse BT.** 2004. *Molecular adjuvants for mucosal immunity. Immunological reviews.* **199:** 100-112.
97. **Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A.** 2009. *The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. Inflammation & allergy drug targets.* **8:** 40-52.
98. **Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, Anichini A.** 2007. *Interleukin-12: biological properties and clinical application. Clin Cancer Res.* **13:** 4677-4685.
99. **Kalams SA, Parker SD, Elizaga M, Metch B, Edupuganti S, Hural J, De Rosa S, Carter DK, Rybczyk K, Frank I, Fuchs J, Koblin B, Kim DH, Joseph P, Keefer MC, Baden LR, Eldridge J, Boyer J, Sherwat A, Cardinali M, Allen M, Pensiero M, Butler C, Khan AS, Yan J, Sardesai NY, Kublin JG, Weiner DB.** 2013. *Safety and comparative immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine in combination with plasmid interleukin 12 and impact of intramuscular electroporation for delivery. The Journal of infectious diseases.* **208:** 818-829.
100. **Wright AK, Briles DE, Metzger DW, Gordon SB.** 2008. *Prospects for use of interleukin-12 as a mucosal adjuvant for vaccination of humans to protect against respiratory pneumococcal infection. Vaccine.* **26:** 4893-4903.
101. **Kalams SA, Parker S, Jin X, Elizaga M, Metch B, Wang M, Hural J, Lubeck M, Eldridge J, Cardinali M, Blattner WA, Sobieszczyk M, Suriyanon V, Kalichman A, Weiner DB, Baden LR.** 2012. *Safety and immunogenicity of an HIV-1 gag DNA vaccine with or without IL-12 and/or IL-15 plasmid cytokine adjuvant in healthy, HIV-1 uninfected adults. PloS one.* **7:** e29231.
102. **Duckett NS, Olmos S, Durrant DM, Metzger DW.** 2005. *Intranasal interleukin-12 treatment for protection against respiratory infection with the Francisella tularensis live vaccine strain. Infection and immunity.* **73:** 2306-2311.
103. **Lynch JM, Briles DE, Metzger DW.** 2003. *Increased protection against pneumococcal disease by mucosal administration of conjugate vaccine plus interleukin-12. Infection and immunity.* **71:** 4780-4788.
104. **Li Y, Li X, Liu H, Zhuang S, Yang J, Zhang F.** 2013. *Intranasal immunization with recombinant Lactococci carrying human papillomavirus E7 protein and mouse interleukin-12 DNA induces E7-specific antitumor effects in C57BL/6 mice. Oncology letters.* **7:** 576-582.
105. **Ahlers JD, Belyakov IM.** 2009. *Strategies for optimizing targeting and delivery of mucosal HIV vaccines. European journal of immunology.* **39:** 2657-2669.
106. <http://www.ema.europa.eu/ema/>.
107. **Clemens JD, Sack DA, Harris JR, Chakraborty J, Khan MR, Stanton BF, Kay BA, Khan MU, Yunus M, Atkinson W, et al.** 1986. *Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh. Lancet.* **2:** 124-127.
108. **Ramirez JC, Gherardi MM, Rodriguez D, Esteban M.** 2000. *Attenuated modified vaccinia virus Ankara can be used as an immunizing agent under conditions of preexisting immunity to the vector. Journal of virology.* **74:** 7651-7655.
109. **Andre S, Seed B, Eberle J, Schraut W, Bultmann A, Haas J.** 1998. *Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. Journal of virology.* **72:** 1497-1503.
110. **Gherardi MM, Ramirez JC, Esteban M.** 2000. *Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide. Journal of virology.* **74:** 6278-6286.
111. **Tapia E, Perez-Jimenez E, Lopez-Fuertes L, Gonzalo R, Gherardi MM, Esteban M.** 2003. *The combination of DNA vectors expressing IL-12 + IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. Microbes Infect.* **5:** 73-84.
112. **Earl PL, Cooper N, Wyatt LS, Moss B, Carroll MW.** 2001. *Preparation of cell cultures and vaccinia virus stocks. Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al. Chapter 5: Unit5 12.*

113. **Ferko B, Katinger D, Grassauer A, Egorov A, Romanova J, Niebler B, Katinger H, Muster T.** 1998. *Chimeric influenza virus replicating predominantly in the murine upper respiratory tract induces local immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in the genital tract. The Journal of infectious diseases.* **178:** 1359-1368.
114. **Takeshita T, Takahashi H, Kozlowski S, Ahlers JD, Pendleton CD, Moore RL, Nakagawa Y, Yokomuro K, Fox BS, Margulies DH, et al.** 1995. *Molecular analysis of the same HIV peptide functionally binding to both a class I and a class II MHC molecule. J Immunol.* **154:** 1973-1986.
115. **Bergmann C, Stohlmann SA, McMillan M.** 1993. *An endogenously synthesized decamer peptide efficiently primes cytotoxic T cells specific for the HIV-1 envelope glycoprotein. European journal of immunology.* **23:** 2777-2781.
116. **Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, Asher TE, Samri A, Schnuriger A, Theodorou I, Costagliola D, Rouzioux C, Agut H, Marcelin AG, Douek D, Autran B, Appay V.** 2007. *Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. The Journal of experimental medicine.* **204:** 2473-2485.
117. **Ramirez JC, Gherardi MM, Esteban M.** 2000. *Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. Journal of virology.* **74:** 923-933.
118. **Quah BJ, Warren HS, Parish CR.** 2007. *Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. Nature protocols.* **2:** 2049-2056.
119. **Coles RM, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, Brooks AG.** 2002. *Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. J Immunol.* **168:** 834-838.
120. **Durward M, Harms J, Splitter G.** 2010. *Antigen specific killing assay using CFSE labeled target cells. J Vis Exp.*
121. **Lindsay RW, Ouellette I, Arendt HE, Martinez J, DeStefano J, Lopez M, Pavlakis GN, Chiuchiolo MJ, Parks CL, King CR.** 2013. *SIV antigen-specific effects on immune responses induced by vaccination with DNA electroporation and plasmid IL-12. Vaccine.* **31:** 4749-4758.
122. **Albu DI, Jones-Trower A, Woron AM, Stellrecht K, Broder CC, Metzger DW.** 2003. *Intranasal vaccination using interleukin-12 and cholera toxin subunit B as adjuvants to enhance mucosal and systemic immunity to human immunodeficiency virus type 1 glycoproteins. Journal of virology.* **77:** 5589-5597.
123. **Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, Hoff ST, Andersen P, Reed SG, Morris SL, Roederer M, Seder RA.** 2007. *Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major. Nature medicine.* **13:** 843-850.
124. **Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA.** 2006. *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. Blood.* **107:** 4781-4789.
125. **Pantaleo G, Koup RA.** 2004. *Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. Nature medicine.* **10:** 806-810.
126. **Freel SA, Lamoreaux L, Chattopadhyay PK, Saunders K, Zarkowsky D, Overman RG, Ochsenbauer C, Edmonds TG, Kappes JC, Cunningham CK, Denny TN, Weinhold KJ, Ferrari G, Haynes BF, Koup RA, Graham BS, Roederer M, Tomaras GD.** 2010. *Phenotypic and functional profile of HIV-inhibitory CD8 T cells elicited by natural infection and heterologous prime/boost vaccination. Journal of virology.* **84:** 4998-5006.
127. **Currier JR, Ngauy V, de Souza MS, Ratto-Kim S, Cox JH, Polonis VR, Earl P, Moss B, Peel S, Slike B, Sriplienchan S, Thongcharoen P, Paris RM, Robb ML, Kim J, Michael NL, Marovich MA.** 2010. *Phase I safety and immunogenicity evaluation of MVA-CMDR, a*

- multigenic, recombinant modified vaccinia Ankara-HIV-1 vaccine candidate. PLoS one. 5:* e13983.
128. **de Souza MS, Ratto-Kim S, Chuenarom W, Schuetz A, Chantakulkij S, Nuntapinit B, Valencia-Micolta A, Thelian D, Nitayaphan S, Pitisuttithum P, Paris RM, Kaewkungwal J, Michael NL, Rerks-Ngarm S, Mathieson B, Marovich M, Currier JR, Kim JH.** 2012. *The Thai phase III trial (RV144) vaccine regimen induces T cell responses that preferentially target epitopes within the V2 region of HIV-1 envelope. J Immunol. 188:* 5166-5176.
129. **Vigano S, Utschneider DT, Perreau M, Pantaleo G, Zehn D, Harari A.** 2012. *Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells? Clinical & developmental immunology. 2012:* 153863.
130. **Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP.** 2014. *Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. Nat Rev Immunol. 14:* 24-35.
131. **Lopalco L, Bomsel M.** 2011. *Protecting the initial site of viral entry: an alternative HIV vaccine target. Expert review of vaccines. 10:* 1253-1256.
132. **Lewis DJ, Wang Y, Huo Z, Giemza R, Babaahmady K, Rahman D, Shattock RJ, Singh M, Lehner T.** 2014. *Effect of vaginal immunization with HIVgp140 and HSP70 on HIV-1 replication and innate and T cell adaptive immunity in women. Journal of virology. 88:* 11648-11657.
133. **Rodriguez AM, Pascutti MF, Maeto C, Falivene J, Holgado MP, Turk G, Gherardi MM.** 2012. *IL-12 and GM-CSF in DNA/MVA immunizations against HIV-1 CRF12_BF Nef induced T-cell responses with an enhanced magnitude, breadth and quality. PLoS one. 7:* e37801.
134. **Karkhanis LU, Ross TM.** 2007. *Mucosal vaccine vectors: replication-competent versus replication-deficient poxviruses. Current pharmaceutical design. 13:* 2015-2023.
135. **Manrique M, Micewicz E, Kozlowski PA, Wang SW, Aurora D, Wilson RL, Ghebremichael M, Mazzara G, Montefiori D, Carville A, Mansfield KG, Aldovini A.** 2008. *DNA-MVA vaccine protection after X4 SHIV challenge in macaques correlates with day-of-challenge antiviral CD4+ cell-mediated immunity levels and postchallenge preservation of CD4+ T cell memory. AIDS research and human retroviruses. 24:* 505-519.
136. **Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM.** 2011. *CpG DNA as a vaccine adjuvant. Expert review of vaccines. 10:* 499-511.
137. **Hervouet C, Luci C, Cuburu N, Cremel M, Bekri S, Vimeux L, Maranon C, Czerkinsky C, Hosmalin A, Anjuere F.** 2010. *Sublingual immunization with an HIV subunit vaccine induces antibodies and cytotoxic T cells in the mouse female genital tract. Vaccine. 28:* 5582-5590.
138. **Matoba N, Geyer BC, Kilbourne J, Alfsen A, Bomsel M, Mor TS.** 2006. *Humoral immune responses by prime-boost heterologous route immunizations with CTB-MPR(649-684), a mucosal subunit HIV/AIDS vaccine candidate. Vaccine. 24:* 5047-5055.
139. **Winstone N, Wilson AJ, Morrow G, Boggiano C, Chiuchiolo MJ, Lopez M, Kemelman M, Ginsberg AA, Mullen K, Coleman JW, Wu CD, Narpala S, Ouellette I, Dean HJ, Lin F, Sardesai NY, Cassamasa H, McBride D, Felber BK, Pavlakis GN, Schultz A, Hudgens MG, King CR, Zamb TJ, Parks CL, McDermott AB.** 2011. *Enhanced control of pathogenic Simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication in macaques immunized with an interleukin-12 plasmid and a DNA prime-viral vector boost vaccine regimen. Journal of virology. 85:* 9578-9587.
140. **Bretscher PA.** 2014. *On the mechanism determining the TH1/TH2 phenotype of an immune response, and its pertinence to strategies for the prevention, and treatment, of certain infectious diseases. Scandinavian journal of immunology. 79:* 361-376.
141. **Kim JH, Excler JL, Michael NL.** 2015. *Lessons from the RV144 Thai Phase III HIV-1 Vaccine Trial and the Search for Correlates of Protection. Annual review of medicine. 66:* 423-437.
142. **Genesca M, McChesney MB, Miller CJ.** 2009. *Antiviral CD8+ T cells in the genital tract control viral replication and delay progression to AIDS after vaginal SIV challenge in rhesus macaques immunized with virulence attenuated SHIV 89.6. J Intern Med. 265:* 67-77.
143. **Haut LH, Lin SW, Tatsis N, DiMenna LJ, Giles-Davis W, Pinto AR, Ertl HC.** 2010. *Robust genital gag-specific CD8+ T-cell responses in mice upon intramuscular immunization with*

- simian adenoviral vectors expressing HIV-1-gag. European journal of immunology.* **40**: 3426-3438.
144. **Ranasinghe C, Trivedi S, Stambas J, Jackson RJ.** 2013. *Unique IL-13R α 2-based HIV-1 vaccine strategy to enhance mucosal immunity, CD8(+) T-cell avidity and protective immunity. Mucosal immunology.* **6**: 1068-1080.
145. **Liebenberg LJ, Gamielidien H, Mkhize NN, Jaumdally SZ, Gumbi PP, Denny L, Passmore JA.** 2011. *Stability and transport of cervical cytobrushes for isolation of mononuclear cells from the female genital tract. Journal of immunological methods.* **367**: 47-55.
146. **Jespers V, Francis SC, van de Wijgert J, Crucitti T.** 2011. *Methodological issues in sampling the local immune system of the female genital tract in the context of HIV prevention trials. Am J Reprod Immunol.* **65**: 368-376.
147. **McKinnon LR, Hughes SM, De Rosa SC, Martinson JA, Plants J, Brady KE, Gumbi PP, Adams DJ, Vojtech L, Galloway CG, Fialkow M, Lentz G, Gao D, Shu Z, Nyanga B, Izulla P, Kimani J, Kimwaki S, Bere A, Moodie Z, Landay AL, Passmore JA, Kaul R, Novak RM, McElrath MJ, Hladik F.** 2014. *Optimizing viable leukocyte sampling from the female genital tract for clinical trials: an international multi-site study. PloS one.* **9**: e85675.
148. **Omosa-Manyonyi G, Park H, Mutua G, Farah B, Bergin PJ, Laufer D, Lehrman J, Chinyenze K, Barin B, Fast P, Gilmour J, Anzala O.** 2014. *Acceptability and feasibility of repeated mucosal specimen collection in clinical trial participants in Kenya. PloS one.* **9**: e110228.
149. **Turk G, Ghiglione Y, Falivene J, Socias ME, Laufer N, Coloccini RS, Rodriguez AM, Ruiz MJ, Pando MA, Giavedoni LD, Cahn P, Sued O, Salomon H, Gherardi MM.** 2013. *Early Gag immunodominance of the HIV-specific T-cell response during acute/early infection is associated with higher CD8+ T-cell antiviral activity and correlates with preservation of the CD4+ T-cell compartment. Journal of virology.* **87**: 7445-7462.
150. **Akinsiku OT, Bansal A, Sabbaj S, Heath SL, Goepfert PA.** 2011. *Interleukin-2 production by polyfunctional HIV-1-specific CD8 T cells is associated with enhanced viral suppression. Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999).* **58**: 132-140.
151. **Turnbull EL, Lopes AR, Jones NA, Cornforth D, Newton P, Aldam D, Pellegrino P, Turner J, Williams I, Wilson CM, Goepfert PA, Maini MK, Borrow P.** 2006. *HIV-1 epitope-specific CD8+ T cell responses strongly associated with delayed disease progression cross-recognize epitope variants efficiently. J Immunol.* **176**: 6130-6146.
152. **Vingert B, Perez-Patrigeon S, Jeannin P, Lambotte O, Boufassa F, Lemaitre F, Kwok WW, Theodorou I, Delfraissy JF, Theze J, Chakrabarti LA.** 2010. *HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. PLoS Pathog.* **6**: e1000780.
153. **Berger CT, Frahm N, Price DA, Mothe B, Ghebremichael M, Hartman KL, Henry LM, Brenchley JM, Ruff LE, Venturi V, Pereyra F, Sidney J, Sette A, Douek DC, Walker BD, Kaufmann DE, Brander C.** 2011. *High-functional-avidity cytotoxic T lymphocyte responses to HLA-B-restricted Gag-derived epitopes associated with relative HIV control. Journal of virology.* **85**: 9334-9345.
154. **Ranasinghe C, Turner SJ, McArthur C, Sutherland DB, Kim JH, Doherty PC, Ramshaw IA.** 2007. *Mucosal HIV-1 pox virus prime-boost immunization induces high-avidity CD8+ T cells with regime-dependent cytokine/granzyme B profiles. J Immunol.* **178**: 2370-2379.
155. **Markiewicz MA, Wise EL, Buchwald ZS, Cheney EE, Hansen TH, Suri A, Cemerski S, Allen PM, Shaw AS.** 2009. *IL-12 enhances CTL synapse formation and induces self-reactivity. J Immunol.* **182**: 1351-1361.
156. **DeBenedette MA, Calderhead DM, Ketteringham H, Gamble AH, Horvatinovich JM, Tcherepanova IY, Nicolette CA, Healey DG.** 2008. *Priming of a novel subset of CD28+ rapidly expanding high-avidity effector memory CTL by post maturation electroporation-CD40L dendritic cells is IL-12 dependent. J Immunol.* **181**: 5296-5305.
157. **Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A.** 2004. *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. Annual review of immunology.* **22**: 745-763.

158. **Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A.** 1999. *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.* *Nature.* **401:** 708-712.
159. **Kipnis A, Irwin S, Izzo AA, Basaraba RJ, Orme IM.** 2005. *Memory T lymphocytes generated by Mycobacterium bovis BCG vaccination reside within a CD4 CD44^{lo} CD62 ligand(hi) population.* *Infection and immunity.* **73:** 7759-7764.
160. **Zhang Y, Joe G, Hexner E, Zhu J, Emerson SG.** 2005. *Host-reactive CD8⁺ memory stem cells in graft-versus-host disease.* *Nature medicine.* **11:** 1299-1305.
161. **Gattinoni L, Zhong XS, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, Yu Z, Wrzesinski C, Boni A, Cassard L, Garvin LM, Paulos CM, Muranski P, Restifo NP.** 2009. *Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8⁺ memory stem cells.* *Nature medicine.* **15:** 808-813.
162. **Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP.** 2011. *A human memory T cell subset with stem cell-like properties.* *Nature medicine.* **17:** 1290-1297.
163. **Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, Asher TE, Douek DC, Harari A, Pantaleo G, Bailer R, Graham BS, Roederer M, Koup RA.** 2007. *Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses.* *The Journal of experimental medicine.* **204:** 1405-1416.
164. **Buzon MJ, Sun H, Li C, Shaw A, Seiss K, Ouyang Z, Martin-Gayo E, Leng J, Henrich TJ, Li JZ, Pereyra F, Zurakowski R, Walker BD, Rosenberg ES, Yu XG, Lichterfeld M.** 2014. *HIV-1 persistence in CD4⁺ T cells with stem cell-like properties.* *Nature medicine.* **20:** 139-142.
165. **Ribeiro SP, Milush JM, Cunha-Neto E, Kallas EG, Kalil J, Somsouk M, Hunt PW, Deeks SG, Nixon DF, SenGupta D.** 2014. *The CD8(+) memory stem T cell (T(SCM)) subset is associated with improved prognosis in chronic HIV-1 infection.* *Journal of virology.* **88:** 13836-13844.
166. **Li Z, Zhang M, Zhou C, Zhao X, Iijima N, Frankel FR.** 2008. *Novel vaccination protocol with two live mucosal vectors elicits strong cell-mediated immunity in the vagina and protects against vaginal virus challenge.* *J Immunol.* **180:** 2504-2513.
167. **Goulder PJ, Watkins DI.** 2004. *HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design.* *Nature reviews.* **4:** 630-640.
168. **Chabalgoity JA, Baz A, Rial A, Grille S.** 2007. *The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines.* *Cytokine & growth factor reviews.* **18:** 195-207.
169. **Curtsinger JM, Mescher MF.** 2010. *Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation.* *Current opinion in immunology.* **22:** 333-340.
170. **Lei H, Sheng Z, Ding Q, Chen J, Wei X, Lam DM, Xu Y.** 2011. *Evaluation of oral immunization with recombinant avian influenza virus HA1 displayed on the Lactococcus lactis surface and combined with the mucosal adjuvant cholera toxin subunit B.* *Clin Vaccine Immunol.* **18:** 1046-1051.
171. **Basset C, Thiam F, Martino CD, Holton J, Clements JD, Kohli E.** 2010. *Cholera-like enterotoxins and Regulatory T cells.* *Toxins.* **2:** 1774-1795.
172. **Luci C, Hervouet C, Rousseau D, Holmgren J, Czerkinsky C, Anjuere F.** 2006. *Dendritic cell-mediated induction of mucosal cytotoxic responses following intravaginal immunization with the nontoxic B subunit of cholera toxin.* *J Immunol.* **176:** 2749-2757.
173. www.clinicaltrials.gov.
174. http://www.who.int/immunization/sage/Status_of_Cholera_Vaccines_Steele_22Oct.pdf.