Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Estudio de la deleción de tres genes inmunomoduladores del genoma de MVA: efecto sobre su inmunogenicidad

Holgado, María Pía

2017-02-10

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:
Holgado, María Pía. (2017-02-10). Estudio de la deleción de tres genes inmunomoduladores del genoma de MVA: efecto sobre su inmunogenicidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Holgado, María Pía. "Estudio de la deleción de tres genes inmunomoduladores del genoma de MVA: efecto sobre su inmunogenicidad". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-02-10.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Estudio de la deleción de tres genes inmunomoduladores del genoma de MVA: efecto sobre su inmunogenicidad

Tesis presentada para optar por el título de

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

Lic. María Pía Holgado

Directora de tesis: **Dra. María Magdalena Gherardi**

Consejero de estudios: **Dr. Luis Alberto Scolaro**

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

Buenos Aires, 2016

ESTUDIO DE LA DELECIÓN DE TRES GENES INMUNOMODULADORES DEL GENOMA DE MVA: EFECTO SOBRE SU INMUNOGENICIDAD

El virus Vaccinia Ankara modificado (MVA, del inglés *Modified Vaccinia Ankara*) es un vector viral atenuado que aún conserva numerosos genes inmunomoduladores en su genoma. Nuestro grupo reportó anteriormente la optimización de este vector luego de eliminar el gen viral *C12L*, el cual codifica para la proteína de unión a IL-18. En este trabajo se analizó la inmunogenicidad del vector MVA al cual se le delecionaron de manera simultánea los genes *A44L*, relacionado con la síntesis de esteroides, y *A46R*, un inhibidor de la señalización mediada por receptores Toll (MVAΔA44L-A46R); o también incluyendo la deleción del gen *C12L*, previamente descripto (MVAΔC12L/ΔA44L-A46R). Para ello, se evaluó la respuesta celular T contra epítopes de Vaccinia tanto en bazo como en ganglios inguinales, drenantes al sitio de inoculación, en ratones de la cepa C57BL/6. Se observó que la magnitud de la respuesta adaptativa, tanto en la etapa aguda como de memoria, fue mayor en los animales inmunizados con los vectores delecionados en relación a aquellos que recibieron el vector de la cepa salvaje (MVAwt). Asimismo, el vector MVAΔC12L/ΔA44L-A46R indujo una respuesta celular T específica de memoria de mayor calidad, caracterizada tanto por la bifuncionalidad de las células T-CD8$^+$ (expresión simultánea de CD107a/b e IFN-γ) como por la capacidad de proliferación específica de las células T-CD4$^+$ y CD8$^+$. Al estudiar la respuesta innata generada por el MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, se observó que este vector indujo una mayor producción de citoquinas relacionadas con la generación de una respuesta celular T, tales como IL-12 e IFN-γ, así como mediadores pro inflamatorios y antivirales como IL-1β e IFN-β. En conclusión, este estudio describe por primera vez que la deleción simultánea de los genes inmunomoduladores del genoma de MVA, cuyas funciones se encuentran inter-relacionadas, tales como *A44L*, *A46R* y *C12L* constituye una metodología adecuada para incrementar la inmunogenicidad del vector generando de esta manera una mayor respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Esto convierte al vector MVA en una herramienta útil y versátil para ser utilizada en el campo del desarrollo de vacunas.

PALABRAS CLAVE: MVA, RESPUESTA CELULAR T, VACUNAS

STUDY OF THE DELETION OF THREE IMMUNOMODULATORY GENES FROM THE MVA GENOME: EFFECT ON ITS IMMUNOGENICITY

Modified Vaccinia Ankara virus (MVA) is an attenuated vector that still retains many immunomodulatory genes in its genome. Our group previously reported the optimization of this viral vector after removing the *C12L* gene, coding for the IL-18 binding protein. In this work, we analyzed the immunogenicity of MVA vectors harboring the simultaneous deletion of *A44L* gene, related to steroid synthesis, and *A46R*, a TLR-signaling inhibitor (MVAΔA44L-A46R); or also including a deletion of *C12L* (MVAΔC12L/ΔA44L-A46R), previously described. For this, T-cell responses against Vaccinia virus epitopes were evaluated in C57BL/6 mice in spleen and inguinal lymph-nodes, draining to the site of inoculation. The results showed that the magnitude of the adaptive response, in both the acute and memory phases, was higher in mice immunized with the deleted vectors in relation to those that received the MVAwt. Furthermore, MVAΔC12L/ΔA44L-A46R induced specific memory T cell responses of higher quality, characterized by the CD8 T-cell bifunctionality (simultaneous expression of CD107a/b and IFN-γ) and the specific proliferation capacity of $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cells. The study of innate immune responses generated by the MVAΔC12L/ΔA44L-A46R indicated that this vector induced an increased production of cytokines associated with the generation of a specific T-cell response, such as IL-12 and IFN-γ and also, pro inflammatory and antiviral mediators like IL-1β and IFN-β. In summary, this study describes for the first time that the simultaneous deletion of immunomodulatory genes from MVA genome, whose functions are inter-related, such as *A44L*, *A46R* and *C12L* is an appropriate methodology to enhance the immunogenicity of the vector, enhancing both innate and adaptive immune responses. This type of strategies converts MVA vector in a useful and versatile tool to be used in the vaccine development field.

KEYWORDS: MVA, T CELL RESPONSE, VACCINE

Gladys B. Stern, escritora británica, expresó que “la gratitud en silencio no sirve a nadie”. Y coincido plenamente. Pienso que dedicar el tiempo, y el espacio, para agradecer a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a que este trabajo saliera adelante, es tan importante como la tesis misma:

Al Dr. Horacio Salomón, por dejarme formar parte de este Instituto y poder realizar mi tesis doctoral en él (…y por enseñarme, entre otras cosas, que los freezers no son mesada).

A Magda, por confiar en mi para llevar a cabo este proyecto y ser parte importante de mi formación como científica.

A las chicas del INTA, Gaby Calamante y Pau del Médico, por su grata colaboración y tan buena predisposición siempre.

A Anetta, por entrenarme los primeros meses, por tu dedicación e infinita paciencia.

A Mayu y Juli, más que compañeras de grupo fueron, son y serán grandes amigas. Me enseñaron, por sobre todas las cosas, lo que es el verdadero trabajo en equipo. Gracias por ser, junto a Lu, Romi y Cin, las mejores amigas que uno puede pedir en su lugar de trabajo. Las horas de catarsis, los mates, los consejos, opiniones, las complicidades, las noches de Fey, las risas, los llantos …. La vida. Sin duda, mi doctorado no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A Nanu, mi Lita querida. Quien en este último año se convirtió en una de las personas más importantes para mí dentro del Instituto. Gracias por tu apoyo y por escuchar(me) la misma historia una y mil veces.

A los investigadores del INBIRS que estuvieron presentes cuando los necesité, que me brindaron su ayuda, opinión o consejo, y siempre desinteresadamente: Gaby Turk, Nati Laufer, Flor Quiroga, Fede Remes, Mati Ostrowski y Jorge Geffner.

Al resto de los integrantes del Boletín Festivo INBIRS, con quienes comparto no solo el día a día en el laboratorio, sino muchas (y memorables) salidas,

A mi hermana de la vida, Paulette. Por las innumerables tardes de catarsis mutua, por los termos de mate y por enseñarme que lo importante, siempre, es seguir adelante.

A mi familia, por la perfecta combinación entre dejarme ser libre y darme contención, siempre y en todo momento. Por estar presentes aun en la distancia, y por interesarse en lo que hago, aunque a veces no entiendan de qué les hablo. Gracias por demostrarme que, con esfuerzo, todo se logra, aunque a veces, tarde en llegar.

A Gabi, por tu apoyo incondicional y por escucharme, una y mil veces. Gracias por ser mi sostén en estos años, y por hacerme ver el vaso medio lleno, aunque sé que a veces resulta difícil lograrlo. Porque sos mi ejemplo de pasión, perseverancia y compromiso por el trabajo. Y gracias por enseñarme, cada día, a ser una mejor persona.

A todos, muchas gracias.

Tarda en llegar y al final, al final
hay recompensa.
- Zona de promesas, Soda Stereo

a Mamá, Papá, a Jose…
a Gabi.

La familia es la primera célula esencial de la sociedad humana.

-Juan XXIII

a Augusto y Andrés.

Uno recuerda con aprecio a los maestros brillantes, pero con gratitud a los que tocaron nuestros sentimientos.

-Carl Gustav Jung

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS 9

ABREVIATURAS 12

I. INTRODUCCIÓN 14

1. Origen de las vacunas 15

2. Poxvirus: Aspectos generales 20

3. Virus VACCINIA (VACV) 21

3.1 Origen 21

3.2 Estructura y Morfología 22

3.3 Ciclo de Replicación 24

4. Virus Vaccinia Ankara Modificado: MVA (*Modified Vaccinia virus Ankara*) 28

4.1 Generación de MVA 28

4.2 Genes inmunomoduladores 31

4.3 El MVA en ensayos clínicos humanos 32

4.4 Uso de MVA en medicina veterinaria 36

4.5 Perspectivas en cuanto al uso de MVA como vacuna frente a HIV 37

5. Estrategias de optimización de vectores 38

5.1 El MVA como vector vacunal 38

5.2 Optimización de vectores vacunales: deleción de genes inmunomoduladores 39

5.2.1 Gen *A46R* 42

5.2.2 Gen *A44L* 45

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 48

III. MATERIALES Y MÉTODOS 50

1. Reactivos Biológicos 51

1.1 Líneas celulares 51

1.2 Virus 52

1.2.1 Generación de los vectores MVA delecionados 52

1.2.2 Análisis de la expresión de ARNm de los genes *C12L, A44L* y *A46R* en los vectores delecionados 56

2. Preparación de los *stocks* virales 57

2.1 Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) 57

2.1.1 Infección de células 57

2.1.2 Generación de los *stocks* virales 57

2.1.3 Purificación de los *stocks* virales para inmunizar 58

2.1.4 Titulación por *immunostaining*. 58

3. Caracterización *in vitro* 60

3.1 Evaluación de la cinética de crecimiento de los vectores MVAwt y MVA delecionados 60

3.2 Ensayos de actividad biológica 60

3.2.1 Ensayo funcional de IL-18 bp 60

3.2.2 Actividad de la enzima 3β-HSD 62

3.2.3 Infección de THP-1 y cuantificación de citoquinas producidas 64

4. Inmunizaciones y manejo de animales 65

4.1 Ratones y manejo de animales 65

4.2 Inmunizaciones 65

4.2.1 Inmunización Intramuscular 65

4.2.2 Inoculación intravenosa por el seno retro-orbital 66

4.3 Esquema de Inmunización 66

4.4 Toma de muestras 66

4.4.1. Suero 67

4.4.2. Bazos: Obtención de esplenocitos 67

4.4.3 Ganglios inguinales: Obtención de linfocitos 67

5. Técnicas Inmunológicas 68

5.1 Estímulos para evaluar respuesta inmune 68

5.1.1 Péptidos 68

5.1.2 Virus Vaccinia inactivado 68

5.2 Análisis de la respuesta inmune celular 69

5.2.1 ELISPOT: Cuantificación de células T específicas secretoras de IFN-γ o IL-2 69

5.2.2 Cuantificación de la producción de citoquinas 70

5.2.3 Ensayo simultáneo de marcación intracelular de citoquinas y actividad citotóxica 71

5.2.4 Evaluación de proliferación celular específica mediante tinción con CFSE 72

5.2.5 Caracterización de las poblaciones celulares T de memoria 73

5.3 Cuantificación de inmunoglobulinas en suero 75

5.4 Evaluación de citotoxicidad 76

5.4.1 *In vivo* 76

5.4.2 *In vitro* 77

6. Análisis de la respuesta Innata 78

6.1 Esquema de inmunización y obtención de muestras 78

6.2 Procesamiento de muestras y cuantificación de mediadores 79

6.2.1 Muestras para determinaciones proteicas 79

6.2.2 Muestras para determinaciones de ARN 79

7. Análisis de los Datos 81

IV. RESULTADOS 82

1. Caracterización *in vitro* de los vectores MVA luego de la deleción de los genes *A44L, A46R y C12L* 83

1.1 Estudios moleculares 83

1.2 Estudios virológicos 86

1.3 Estudios funcionales: análisis *in vitro* de la ausencia de los genes seleccionados 88

1.3.1 Gen *C12L* 89

1.3.2 Gen *A44L* 90

1.3.3 Gen *A46R* 91

2. Análisis de la respuesta *in vivo*: Modulación de la respuesta celular T específica por los vectores MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R 94

2.1 Respuesta inmune adaptativa en etapa aguda 95

2.2 Respuesta inmune adaptativa en etapa de memoria 98

2.3 Análisis de la calidad de la respuesta T de memoria 101

2.4 Estudio de la respuesta humoral 108

2.5 Análisis de la capacidad citotóxica 110

3. Análisis de la respuesta innata 112

3.1 Mediadores pro-inflamatorios producidos por el MVAwt versus MVAΔC12L/ΔA44L-A46R 113

3.2 Mediadores antivirales producidos por el MVAwt versus MVAΔC12L/ΔA44L-A46R..... 117

V. DISCUSIÓN 120

VI. CONCLUSIONES 137

VII. REFERENCIAS 140

ANEXO 150

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Desarrollo de Vacunas a lo largo del tiempo

Figura 2. Morfología del virus Vaccinia

Figura 3. Mecanismos de entrada de poxvirus

Figura 4. Ciclo replicativo de Poxvirus

Figura 5. Análisis filogenético de CVA

Figura 6. Representación esquemática de las deleciones de MVA

Figura 7. Mapa de las seis deleciones en MVA y CVA

Figura 8. Distribución de los ensayos clínicos con MVA a nivel mundial

Figura 9. Esquema de las diferentes vías de señalización mediadas por receptores Toll

Figura 10. Inhibición de vías pro-inflamatorias por proteínas de VACV

Figura 11. Representación esquemática de las vías de señalización de hormonas esteroides

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 12. Representación esquemática de la ubicación de los genes delecionados

Figura 13. Generación de los MVA delecionados

Figura 14. Imagen representativa de una titulación viral por *immunostaining*

Figura 15. Ensayo biológico para *C12L*

Figura 16. Ensayo biológico para *A44L*

Figura 17. Imagen representativa de un ELISPOT para IFN-γ

Figura 18. Cuantificación de citoquinas por CBA kit

Figura 19. Estrategia de *gating* general

Figura 20. Corrida electroforética de productos de PCR cuantitativa

RESULTADOS

Figura 21. Verificación por PCR de la eliminación de los genes *C12L*, *A44L* y *A46R* del genoma de MVA

Figura 22. Verificación por RT-PCR de la ausencia de expresión de los genes *C12L*, *A44L* y *A46R*

Figura 23. Curvas de crecimiento intracelular y extracelular de los distintos virus

Figura 24. Inmunofluorescencia de células THP-1 infectadas con los distintos MVA

Figura 25. Ensayo de actividad biológica del gen *C12L*

Figura 26. Ensayo de actividad biológica del gen *A44L*

Figura 27. Ensayo de actividad biológica del gen *A46R*

Figura 28. Cuantificación de TNF-α en sobrenadantes de THP-1

Figura 29. Análisis de la respuesta celular T en etapa aguda

Figura 30. Cuantificación de mediadores solubles en etapa aguda

Figura 31. Análisis de la respuesta celular T en ganglios inguinales

Figura 32. Análisis de la respuesta celular T en etapa de memoria

Figura 33. Análisis de la respuesta celular T en ganglios inguinales en etapa de memoria

Figura 34. Cuantificación de mediadores solubles en etapa de memoria

Figura 35. Selección de células bifuncionales

Figura 36. Análisis de la calidad de respuesta: bifuncionalidad de células T-CD8$^+$

Figura 37. Análisis de las subpoblaciones de memoria.

Figura 38. Análisis de las subpoblaciones de memoria dentro de células específicas T-CD8$^+$ bifuncionales

Figura 39. Proliferación de células T específicas

Figura 40. Análisis de la calidad de respuesta: proliferación de células específicas

Figura 41. Caracterización de las subpoblaciones de memoria en células que proliferaron frente a VACV

Figura 42. Determinación de anticuerpos anti VACV

Figura 43. Citotoxicidad *in vitro*

Figura 44. Cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias en homogenatos de ganglio inguinal

Figura 45. Cuantificación de IL-6 en homogenatos de ganglio inguinal

Figura 46. Cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias en suero

Figura 47. Cuantificación de IFN de tipo I en homogenatos de ganglio inguinal

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Morbilidad anual estimada durante el siglo XX en Estados Unidos antes de la vacunación comparada con la morbilidad luego de la implementación de esta práctica en 1990

Tabla 2. Ensayos clínicos de los últimos 6 años que involucran el uso de MVA como vector vacunal

Tabla 3. Vacunas humanas basadas en el vector viral MVA

Tabla 4. Vacunas recombinantes basadas en VACV para uso veterinario

Tabla 5. Breve descripción de las características de MVA y las ventajas que ofrece como vector vacunal

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 6. *Primers* utilizados para generar pBS-A44L-A46R

Tabla 7. *Primers* utilizados para verificar la correcta deleción de los genes

Tabla 8. *Primers* utilizados para amplificar el ADN copia de cada uno de los genes

Tabla 9. *Primers* utilizados para amplificar el ADN copia de cada uno de los genes

RESULTADOS

Tabla 10. Análisis dela respuesta de cada grupo (MVAwt y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R) en relación al grupo *naïve*, para cada mediador y tiempo ensayado

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BAC: Cromosoma artificial bacteriano (*bacterial artificial chromosome)*

bp: proteína de unión (*binding protein*)

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

CFSE: Carboxifluoresceína succinimidil éster (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester)*

CHIKV: *Chikungunya virus*

ConA: Concanavalina A

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

CVA: *Chorioallantois vaccinia virus Ankara*

DAB: *3.3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

dpi: días post-infección

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

ELISA: Técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

ELISPOT: Ensayo de Puntos por Inmunoabsorción Unida a Enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSpot*)

FEPs: Fibroblastos de embrión de pollo

GI: Ganglios inguinales

HBV: Virus de la hepatitis B

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

hpi: horas post-infección

HRP: Peroxidasa de Rabanito (*horseradish peroxidase*)

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

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulinas

IL: Interleuquina

im: intramuscular

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

ip: intraperitoneal

Kb/kbp: kilobases/kilopares de bases

LC-MS/MS: Cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas (*Liquid chromatography–mass spectrometry*)

LPS: Lipopolisacárido

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)

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

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

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido (*β-Nicotinamide adenine dinucleotide*)

NALT: tejido linfoide asociado a nasofaringe (*Nasal associated lymphoid tissue)*

NF-κβ: Factor nuclear κβ (Nuclear factor κβ)

NTC: control sin ADN (*Non-Template Control*)

NYVAC: *New York Vaccinia virus*

ORF: marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*)

pb: pares de base

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

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

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato (*phorbol myristate acetate*)

rpm: Revoluciones por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR: PCR con transcriptasa reversa (*Reverse Transcription PCR*)

SFB: Suero fetal bovino

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

T_{ET}: Células T efectoras terminales

Th1/Th2: Respuesta celular T tipo 1 o tipo 2 (*T helper*)

TLR: Receptor tipo Toll (*Toll Like Receptor*)

T_{MC}: Células T de memoria central

T_{ME}: Células T de memoria efectora

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

T_{SCM}: Células T *stem cells* de memoria (*Stem cell memory*)

UFP: Unidades formadoras de placas

VACV: virus Vaccinia

VARV: *Variola virus*

WR: virus replicativo de VACV, cepa *Western Reserve*

3β-HSD: 3β hidroxiesteroide deshidrogenasa (*3β hydroxysteroid-dehydrogenase/Δ5-Δ4 isomerase*)

1. INTRODUCCIÓN

La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable.

- Leonardo da Vinci

1. ORIGEN DE LAS VACUNAS

Las vacunas son actualmente la herramienta más efectiva de la cual disponemos para prevenir, combatir y en el mejor de los casos, erradicar enfermedades. Fue gracias a Edward Jenner, médico inglés de la ciudad de Berkley, quien en 1796 dio inicio a lo que hoy conocemos como vacunación [1, 2]. En el siglo XVIII, la viruela era una de las enfermedades epidémicas con más alto índice de mortalidad. El único tratamiento conocido en la época era de naturaleza preventiva, y se conocía como "variolización o variolación". Este tratamiento consistía en administrar a una persona no inmune, por insuflación o escarificación, el virus aislado de pústulas de personas infectadas. Si bien la tasa de mortalidad de esta práctica era considerablemente alta (entre 0,5 y 2%), resultaba bastante menor respecto a la tasa de mortalidad de contraer viruela de forma natural (hasta un 40%). Jenner advirtió que las personas que trabajaban ordeñando las vacas a menudo se infectaban sus manos con el virus *cowpox*, sufriendo una infección local que, al parecer, confería protección frente a la viruela humana. Fue así que en 1796 extrajo material infectado de una lesión de una tambera, Sarah Nelmes, y se la inoculó a un niño sano de 8 años, James Phipps, quien desarrolló una fiebre leve y pequeñas lesiones. Dos meses después inoculó nuevamente al niño, pero esta vez con el virus de la viruela convencional, y la enfermedad nunca se desarrolló [1].

A partir de este hecho, se llevó a cabo una intensa campaña de vacunación, que finalmente culminó en 1980 con la declaración de la erradicación de la viruela a nivel mundial y que representa hasta el día de hoy la única enfermedad infecciosa eliminada por vacunación. Actualmente, más de 70 vacunas se han licenciado para ser utilizadas frente a más de 30 organismos patógenos [3] (Figura 1). Enfermedades como la poliomielitis, sarampión o rubéola que en el siglo XX causaron millones de infecciones, actualmente son consideradas poco comunes gracias a la utilización de vacunas, reduciendo considerablemente el número de casos (Tabla 1, tomado de [4] y [5]).

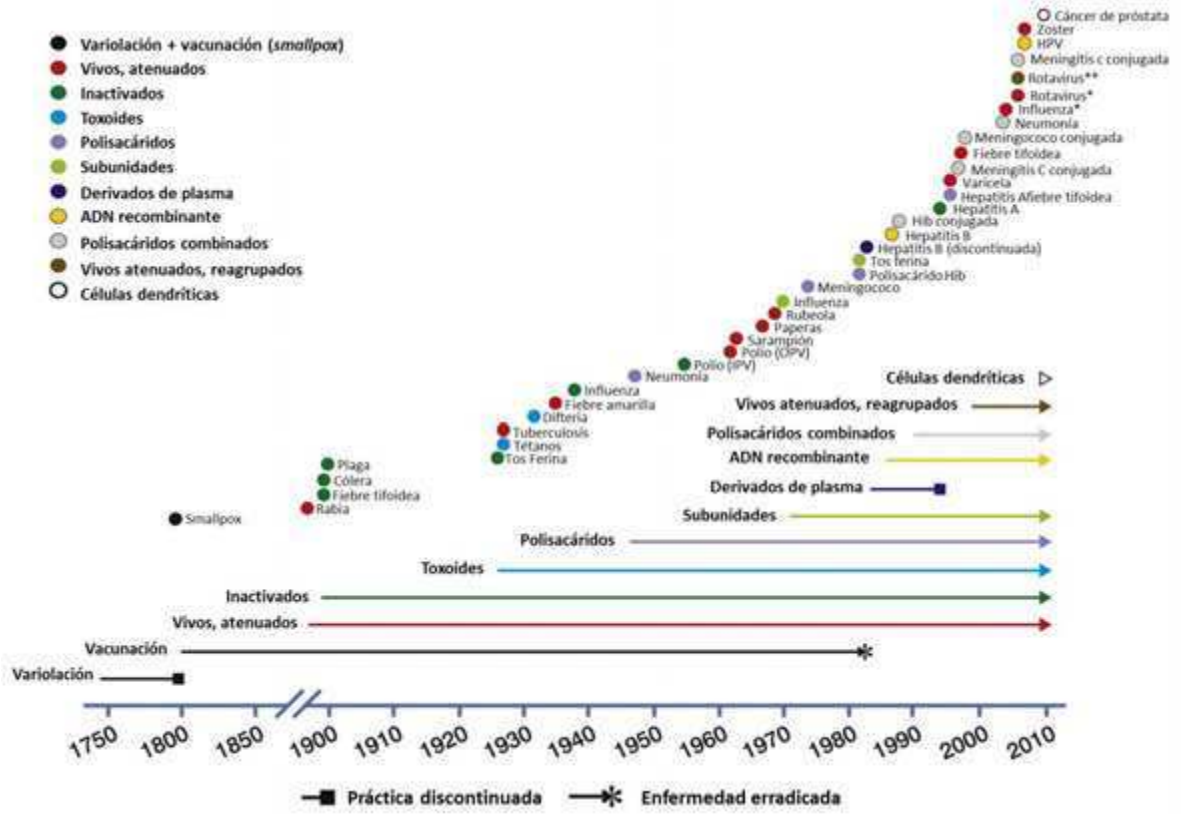

Figura 1. Desarrollo de vacunas a lo largo del tiempo. Línea de tiempo donde se muestra el desarrollo de las vacunas a lo largo de los años desde 1796 en paralelo con las diferentes tecnologías utilizadas. Traducida y adaptada de *Garçon* y colaboradores [3].

Si bien a lo largo de estos años el desarrollo de vacunas ha experimentado grandes avances, con el advenimiento de nuevas estrategias y herramientas (Figura 1, [3]), muchas de las tecnologías desarrolladas inicialmente siguen siendo utilizadas. Pese al gran progreso en este campo, aún quedan enfermedades infectocontagiosas en las cuales no se ha dado con una estrategia de vacunación efectiva que permita prevenir las infecciones, como es el caso de HIV (virus de la inmunodeficiencia humana, *Human Immunodeficience Virus*), Malaria y Tuberculosis.

Las vacunas actúan desarrollando inmunidad frente al patógeno, tratando de imitar la infección causada por el agente patógeno sin desarrollar la enfermedad, pero sí estimulando al sistema inmune a montar una respuesta de tipo humoral y/o celular específica frente al mismo. El tipo de respuesta inmune desarrollada, como también el sitio anatómico donde se despliega esta respuesta dependen del patógeno, como así también de las vías de transmisión por las cuales se disemina. En

función de esto se han desarrollado distintos tipos de vacunas que, combinadas con la ruta de inmunización y un esquema de vacunación adecuados, contribuyen al mejor desempeño de la respuesta inmune.

Tabla 1. Morbilidad anual estimada durante el siglo XX en Estados Unidos antes de la vacunación comparada con la morbilidad luego de la implementación de esta práctica en 1990.

Enfermedad	Casos por año antes de la vacunación en el siglo XX[§]	Casos en 1998
Viruela (*Smallpox*)	48164	0
Poliomielitis	16316	0
Difteria	175885	1
Haemophilus influenzae	20000	54
Sarampión	503282	89
Paperas	152209	606
Tos ferina	147271	6279
Rubeola	47745	345
Tétanos	1314	34

[§]Número promedio de casos por año estimados antes de la vacunación universal en niños en 1990, en Estados Unidos. Adaptado y traducido al español de *Nabel GJ*, 2013 [4] y Reporte semanal de Morbilidad y Mortalidad del CDC, Estados Unidos [5].

A continuación se describen brevemente los distintos tipos de vacunas que se conocen y utilizan actualmente [6, 7]:

- *Vacunas vivas atenuadas*: están compuestas por el agente patógeno pero que ha sido atenuado en el laboratorio de modo que no puede causar enfermedad. Dado que la vacuna viva atenuada es lo más parecido a una infección natural, provocan fuertes respuestas celulares y de anticuerpos, y a menudo ofrecen inmunidad a largo plazo con solo una o dos dosis. Sin embargo, ofrecen ciertas

desventajas relacionadas a la posibilidad de que el microorganismo pueda mutar o revertir a su forma virulenta. Es por esto que no se recomienda la administración de este tipo de vacunas en personas inmunocomprometidas.

- *Vacunas inactivadas*: Se generan al tratar a los microorganismos con calor, químicos o radiación de manera de matarlos o inactivarlos. Estas vacunas son más estables y seguras ya que no existe posibilidad de reversión. Sin embargo, la mayoría de las vacunas inactivadas estimulan una respuesta más débil del sistema inmunitario, mayoritariamente humoral, y en general son necesarias varias dosis adicionales para mantener la inmunidad.

- *Vacunas a subunidades*: En este caso, en lugar del microorganismo completo se incluyen sólo los antígenos que mejor estimulan al sistema inmune. Al poseer solo una parte del patógeno las posibilidades de experimentar reacciones adversas a la vacuna son menores. El antígeno puede ser purificado a partir del microorganismo o bien, generado mediante la tecnología de ADN recombinante. Generalmente requieren varias dosis y la administracion conjunta de adyuvantes que contribuyan a potenciar la respuesta inmune.

- *Toxoides*: Estas vacunas se utilizan cuando una toxina bacteriana es la causa principal de la enfermedad. Inactivando estas toxinas con agentes como el formaldehído, se puede obtener el toxoide (o toxina inactivada) capaz de estimular una respuesta por parte del sistema inmune. Debido a la inocuidad del toxoide, este tipo de vacunas son altamente seguras, aunque puede requerir refuerzos y/o combinación con adyuvantes, ya que no suelen ser muy inmunogénicos.

- *Vacunas a ADN*: inducen inmunidad a través de una transfección transitoria de las células del huésped a través de un plásmido que codifica para algún antígeno del agente patógeno [8].

- *Vacunas basadas en células dendríticas*: la estrategia de este tipo de vacunas es “cargar” *in vitro* células dendríticas con el antígeno del patógeno e infundirlas en los pacientes para desarrollar una

respuesta celular T. Este tipo de abordaje está considerado para ser utilizado en cáncer, aunque los ensayos clínicos no han sido muy promisorios hasta el momento [8].

- *Vectores recombinantes*: Las vacunas de vectores recombinantes utilizan microorganismos vivos atenuados, que pueden ser virus o bacterias, como vehículos para expresar antígenos recombinantes que provienen del agente patógeno contra el que se desarrollará la vacuna. Dado que estos vectores recombinantes simulan una infección natural, resultan altamente inmunogénicos y efectivos para estimular el sistema inmune. Dentro de los virus utilizados como vectores se encuentran el virus parainfluenza [9], virus de la familia *Rhabdoviridae* [10-12], o basados en virus del Herpes [13]. Sin embargo los más utilizados, y en los que se ha avanzado más son los vectores basados en adenovirus [14-17] y en poxvirus derivados de cepas atenuadas del virus Vaccinia como el virus Vaccinia Ankara Modificado (*Modified Vaccinia Ankara*, MVA) o el virus *New York Vaccinia virus* (NYVAC) [18-21], o en avipoxvirus como *canarypox* o *fowlpox* [22].

En este trabajo de tesis nos centraremos particularmente en el virus MVA de la familia *Poxviridae*, como prototipo de vector viral vacunal. En la siguiente sección se describirán ciertos aspectos generales de los virus que componen esta familia.

La vacunación tiene como finalidad conferir inmunidad protectiva, efectiva y duradera, y que incluya, idealmente, ambos brazos de la respuesta inmune tanto humoral como celular [23, 24]. En particular, para ciertos patógenos como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o *Mycobacterium Tuberculosis*, es sumamente importante hacer hincapié en el desarrollo de una respuesta celular T de magnitud y calidad, capaz de contener la carga viral o bacteriana y evitar la propagación del patógeno. En cuanto a magnitud se hace referencia al número de células T específicas que se generan, que son capaces de secretar citoquinas de gran importancia en el desarrollo de una respuesta celular de tipo Th1, como IFN-γ e IL-2 [25, 26]. Las células T constituyen una población celular funcionalmente heterogénea, mediando sus efectos a través de una gran variedad de

mecanismos, ya sea la capacidad de ejercer citotoxicidad, de proliferar o de sintetizar diferentes citoquinas y/o quimioquinas. Estas múltiples funciones combinadas de diversas formas, es lo que se define como "calidad de la respuesta celular T" [27], y constituye un factor fundamental en la definición de una respuesta protectiva [28-30].

Numerosas estrategias de vacunación se han ensayado para lograr inducir respuestas celulares T, sin embargo, la mayoría han fallado en este aspecto ya que se obtenían respuestas de escasa magnitud y en algunos casos no lograban conferir protección. En este contexto, numerosos estudios clínicos han demostrado que las vacunas basadas en vectores virales, deficientes en su replicación, logran inducir respuestas inmunes fuertes y amplias, y que este tipo de vacunas constituyen la mejor herramienta para desarrollar vacunas frente a infecciones por diversos patógenos como también contra algunos tipos de cáncer [31]. En particular en el campo de HIV, el interés por el desarrollo de vacunas basadas en poxvirus se reforzó luego de los resultados del ensayo RV-144 de Tailandia, donde se aplicó un vector ALVAC [32]. A lo largo de los últimos años, se han desarrollado numerosos ensayos clínicos con vacunas basadas en vectores poxvirales, entre los cuales ALVAC y MVA han sido y continúan siendo, los más utilizados [33]. En la sección 4.3 se detallan los ensayos clínicos que involucran vectores basados en poxvirus.

2. POXVIRUS: ASPECTOS GENERALES

Los poxvirus son una familia de virus ADN de gran tamaño y complejidad, capaces de infectar tanto especies de vertebrados como de invertebrados. En 1957, *Fenner* y *Burnet* publicaron una descripción de los poxvirus de vertebrados, que ha constituido la base de las clasificaciones posteriores en cuanto a los criterios utilizados y las subdivisiones realizadas [34]. Las características básicas de la familia *Poxviridae* son los grandes viriones en forma de ladrillo o con forma ovoide, con un genoma que consta de una sola molécula lineal de ADN doble cadena, de entre 130 y 220

kilobases (kb) de longitud. A diferencia de la mayoría de los virus con genoma ADN, los poxvirus replican exclusivamente en el citoplasma de la célula hospedadora. La familia *Poxviridae* se subdivide en dos subfamilias, *Chordopoxvirinae* y *Entomopoxvirinae*, cuyo rango de huésped involucra vertebrados e insectos, respectivamente. Los virus de la subfamilia *Chordopoxvirinae* se subdividen en ocho géneros [35], de los cuales la mitad (orthopoxvirus, parapoxvirus, molluscipoxvirus, yatapoxvirus) son capaces de infectar humanos ya sea de manera exclusiva o zoonóticamente [36].

Dentro del género de los Orthopoxvirus, se encuentra el virus de la viruela (*smallpox* o VARV) que tiene al hombre como único hospedador y que fue el agente causante de la enfermedad que lleva su nombre, con una alta tasa de mortalidad y contagio, situándola en una de las enfermedades más devastadoras en la historia del hombre [37, 38]. Dentro de este género también se encuentran otros virus que comprenden al virus *Cowpox* (CPXV), *Monkeypox* (MPXV) y al virus Vaccinia (VACV) [38].

El virus Vaccinia (VACV) es el prototipo de la familia *Poxviridae* y, tal como se mencionó anteriormente (sección “Origen de las vacunas”), fue el virus que se utilizó para combatir la epidemia de viruela. En 1979, luego de una ardua campaña de vacunación, la viruela se declaró erradicada. Una de las razones que se cree, contribuyó al éxito de este programa de erradicación es el hecho de no haber encontrado aún reservorios animales para el virus de la viruela [36]. En la siguiente sección se realizará una descripción más detallada de las características de este virus.

3. VIRUS VACCINIA (VACV)

3.1 Origen

Por mucho tiempo se consideró que el virus VACV, utilizado para la vacunación de humanos en contra de la viruela o *smallpox* se originó a partir del virus zoonótico *Cowpox*, introducido como práctica de inmunización por Edward Jenner en 1796. Sin embargo, en el siglo XX se encontró que estos virus diferían significativamente y, luego de la secuenciación del genoma completo del virus

Horsepox (HSPV), se encontró que VACV estaba más relacionado con este último. Teniendo en cuenta que Jenner especificó que su "vacuna" se había originado a partir de una infección que presentaban los caballos en sus talones, y que resultaba más adecuada para ser utilizada en humanos luego de un pasaje en vacas, se sugirió que el virus VACV podría haber surgido a partir de HSPV y que, naturalmente, persistieron simultáneamente con CPXV [39]. El reservorio natural del virus es desconocido, lo cual dificulta aún más la dilucidación del origen. De hecho, muchos miembros de la comunidad científica creen que este reservorio natural realmente no existe, y que el virus es mantenido, actualmente, solo en cepas de laboratorio [40].

El VACV no solo ha contribuido mundialmente a nivel de salubridad en la erradicación de la viruela, sino que ha aportado al desarrollo de una parte importante de la virología moderna, ya que fue el primer virus animal visualizado al microscopio electrónico, crecido en cultivos celulares, purificado físicamente y analizado químicamente [41].

3.2 Estructura y Morfología

El virus Vaccinia es un virus de gran tamaño (aproximadamente 350 x 270 ηm), con una morfología ovalada o con forma de ladrillo (Figura 2). Su genoma, al igual que el resto de los poxvirus es de ADN lineal doble cadena, y codifica para alrededor de 200 genes.

El *core* es una zona central electrodensa con forma de disco bicóncavo que contiene el ADN genómico y varias proteínas virales asociadas formando un complejo núcleo-proteico [42]. Los cuerpos laterales están situados a ambos lados del *core*. Se ha propuesto que estos cuerpos laterales son zonas de contacto de la membrana externa con el *core* viral [43, 44].

Existen dos formas del virus que tienen la capacidad de infectar células: el virus maduro intracelular o IMV (*Intracellular Mature Virus*) y el virus extracelular envuelto o EEV (*Extracellular enveloped virus*).

El virus maduro intracelular o IMV se caracteriza por tener una membrana externa lipídica (5-6 ηm de grosor), debajo de la cual hay dos cuerpos laterales constituidos por material heterogéneo sin estructura aparente, y más internamente un nucleoide o *core* rodeado por dos capas que tienen un grosor de unos 18-19 ηm; la más externa con proyecciones de espículas agrupadas en forma hexagonal, y la más interna es consistente con una membrana.

Algunas partículas virales presentan una envuelta lipídica adicional que envuelve al virión maduro, y estos virus son los que se denominan como Virus Extracelular Envuelto o EEV.

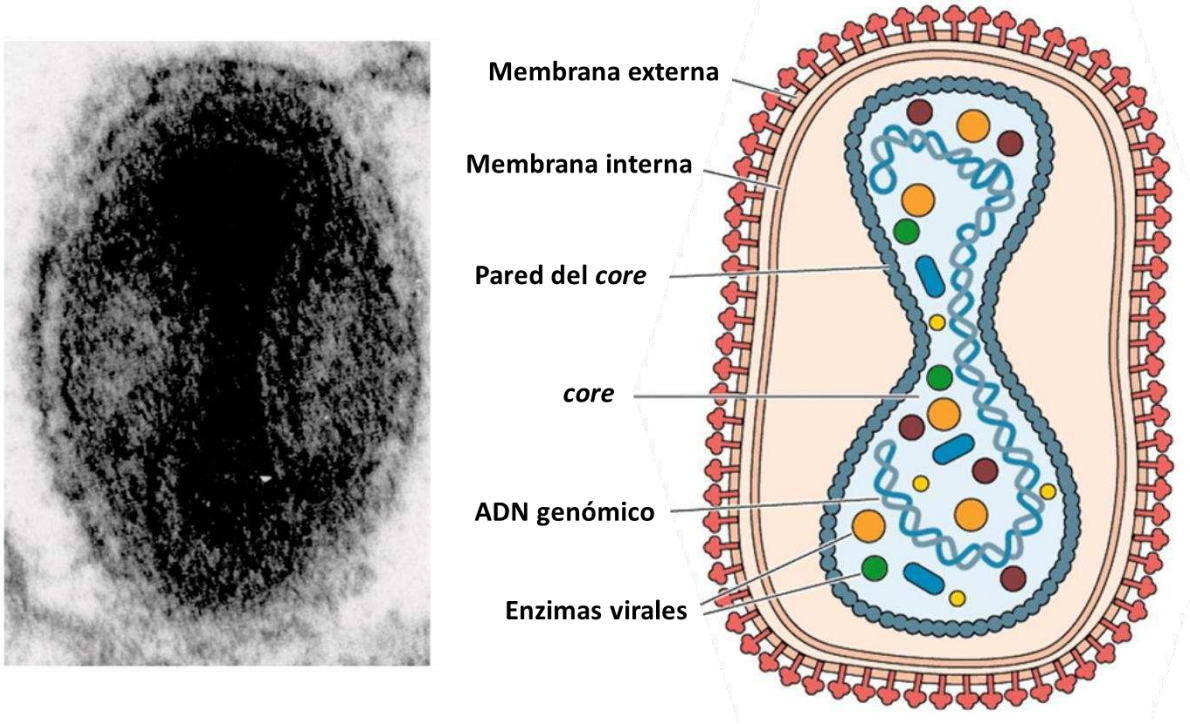

Figura 2. Morfología del virus Vaccinia. A la izquierda, micrografía electrónica de IMV (corte transversal). La imagen de la derecha es un esquema representativo de Poxvirus. Traducido y adaptado de *Harrison* y colaboradores [45].

Tanto la membrana externa del IMV como la envuelta del EEV presentan una composición lipídica diferente a la de las membranas de la célula hospedadora y están enriquecidas con proteínas virales [46, 47].

El virus replica enteramente en el citoplasma de la célula hospedadora, por lo cual codifica todas las enzimas y proteínas estructurales necesarias para transcribir su genoma, replicar el ADN viral, y ensamblar la partícula viral, sin necesidad de una contribución activa desde el núcleo celular [48].

3.3 Ciclo de Replicación

El ciclo de replicación ha sido ampliamente estudiado en Vaccinia, prototipo de la familia, pero se encuentra altamente conservado entre otros poxvirus [36]. Como en la mayoría de otras clases de virus, los poxvirus coordinan los procesos de replicación del genoma y ensamblado a través de la regulación en el tiempo de la expresión de los distintos genes virales [49]. Este ciclo está compuesto por una serie de eventos complejos que, como se mencionó anteriormente, transcurren enteramente en el citoplasma, siendo esto posible debido a que el virión porta las enzimas y factores de transcripción necesarios para la síntesis de los ARN mensajeros de las proteínas de expresión temprana.

A continuación, se describen las distintas etapas que componen el ciclo replicativo de Vaccinia (Figura 4):

1- *Unión y entrada*: El ciclo comienza con la unión a la superficie celular y la subsiguiente fusión del virus a la membrana. Como se mencionó anteriormente, existen dos formas de partículas virales capaces de iniciar un ciclo infectivo: virus maduro intracelular (IMV) y virus envuelto extracelular (EEV), que al diferir en el número de membranas que los envuelven y en las glicoproteínas de superficie que poseen, utilizan mecanismos diferentes para ingresar a la célula huésped.

La unión de la partícula viral está determinada por numerosas proteínas del virus como H3, D8 y A27 [50-52] que median principalmente la unión a glicosaminoglicanos (GAGs) presentes en la superficie de la célula huésped o también A26, que se une a la laminina de la matriz extracelular [53].

Posteriormente el virus entra por dos mecanismos (Figura 3): en condiciones de pH normales, ingresa mediante la fusión con la membrana plasmática mientras que frente a un pH bajo se favorece la entrada por vía endosomal [54].

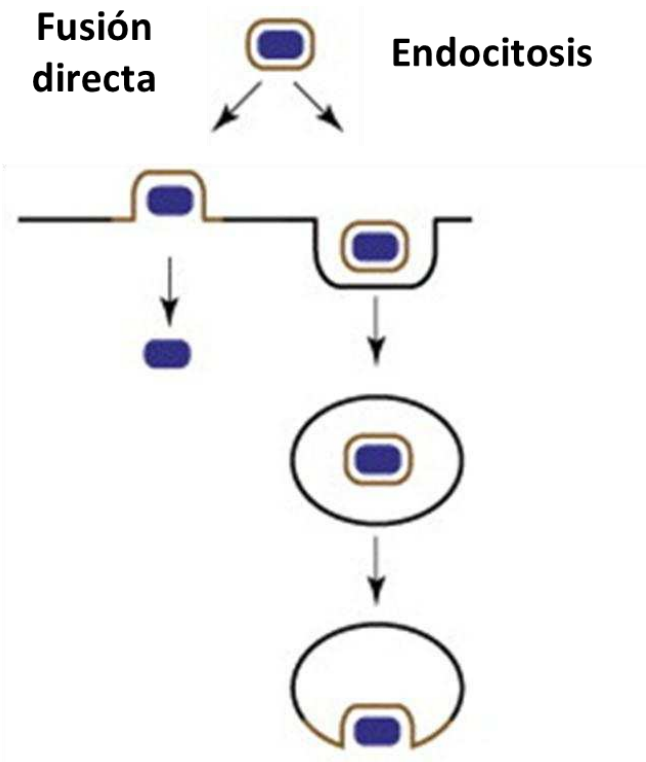

Figura 3. Mecanismos de entrada de poxvirus. Representación esquemática de los mecanismos de entrada de poxvirus. Adaptado de *Roberts* & *Smith* [55].

2- *Transcripción de genes tempranos*: luego de la remoción de la membrana del IMV o de ambas membranas del EEV, la estructura remanente del virión infectivo, o *core*, entra a la célula y es transportado por microtúbulos al citoplasma, precisamente a la región perinuclear. En esta zona se desensambla parcialmente para permitir la transcripción de los genes tempranos gracias a la ARN Polimerasa dependiente de ADN que el virus porta consigo [55].

Las proteínas que se traducen en esta etapa son las que sirven para replicar el ADN viral en etapas posteriores como también para modificar los mecanismos celulares en beneficio del virus y escapar a la respuesta inmune innata del huésped [55].

3- *Desnudamiento y replicación*: Luego, por un proceso que aún no se conoce muy bien, se desnuda completamente el genoma y se libera al citoplasma, donde puede ser utilizado como templado para la replicación.

4- *Expresión de genes intermedios y tardíos*: La síntesis de *novo* de la ARN polimerasa es requerida para las subsiguientes rondas de transcripción [49]. Entre las proteínas generadas por los genes tempranos se encuentran los factores de transcripción necesarios para sintetizar las proteínas intermedias. Lo mismo ocurre en el caso de las proteínas tardías, cuyos factores de transcripción son sintetizados a partir de los genes intermedios. Las enzimas y factores de transcripción necesarios para los genes tempranos que forman parte del virión son sintetizados con las proteínas tardías [55].

5- *Morfogénesis y liberación*: la formación de la progenie viral comienza en áreas citoplasmáticas llamadas "fábricas de virus", en donde las organelas celulares están excluidas. A medida que se acumula el producto de los genes tardíos, las partículas virales se van ensamblando en una estructura ovalada para conformar el *core*. El genoma de ADN doble cadena es ensamblado dentro de este virión inmaduro y las enzimas proteolíticas virales se encargan de clivar las proteínas del *core* y transformar el virión en su forma característica de IMV. La morfogénesis de la mayoría de los viriones culmina en este punto, y los IMV son liberados al ambiente extracelular cuando la célula se lisa. Las partículas virales remanentes son transportadas hacia afuera de estas fábricas, a través de microtúbulos, y se envuelven con membrana derivada del aparato de Golgi para formar virus intracelular envuelto (IEV, *intracellular enveloped virus*). Esta última partícula pierde una membrana cuando se fusiona con la membrana celular y forma el virus asociado a la membrana celular (CEV, *cell associated enveloped virus*), que se disemina a células vecinas por colas de actina, o se libera como EEV [36, 55].

Se cree que las formas CEV y EEV son particularmente importantes para una rápida propagación célula a célula, mientras que la forma IMV probablemente contribuya a la diseminación en estadios tardíos luego de la muerte celular y ruptura de la membrana [36].

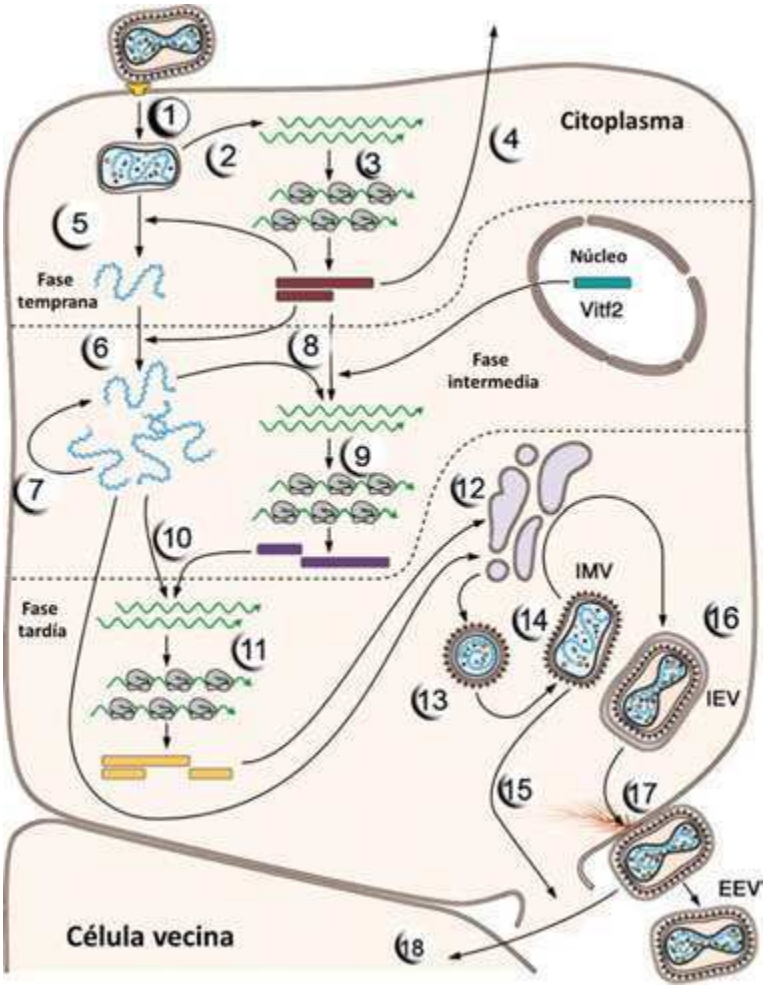

Figura 4. Ciclo replicativo de Poxvirus. Esquema representativo de las etapas del ciclo viral de los Poxvirus: 1) Entrada, 2) Liberación al citoplasma y síntesis de ARNm tempranos, 3) Traducción a proteínas por maquinaria celular, 4) Secreción de algunas proteínas tempranas, 5) Liberación del genoma, 6) Replicación del genoma viral, 7) Nuevas rondas de replicación, 8) Transcripción de genes virales intermedios, 9) Traducción de ARNm intermedios, 10) Transcripción de genes tardíos, 11) Síntesis de proteínas tardías, 12) Ensamblado de partículas, 13) Formación del virión inmaduro, 14) Maduración del virión a IMV, 15) Liberación de algunos IMV, 16) Adquisición de doble membrana del IEV, 17) Fusión de IEV con membrana y formación de CEV, 18) Disociación del CEV de la membrana (EEV) o transferencia a células vecinas. Traducido y adaptado de *Harrison* y colaboradores [45].

Los poxvirus expresan una serie de proteínas moduladoras que modifican tanto el entorno intracelular como el extracelular de la célula infectada. Estas proteínas codificadas por el virus modulan una amplia gama de respuestas de defensa antiviral, desencadenadas por la propia infección viral, y que incluyen importantes vías, como la apoptosis, inducción de la respuesta a interferón, el estrés inducido por cascadas de señalización, restricción en la presentación de antígeno por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) y

factores pro-inflamatorios en respuesta a la infección [36]. Algunas de estas funciones se han perdido en cepas atenuadas como MVA (Ver siguiente sección).

4. VIRUS VACCINIA ANKARA MODIFICADO: MVA (*MODIFIED VACCINIA VIRUS ANKARA*)

4.1 Generación de MVA

MVA es un virus de laboratorio atenuado desarrollado en 1975 por el profesor Anton Mayr, a partir de la cepa parental *Chorioallantois Vaccinia Ankara* (CVA) [56]. Luego de 571 pasajes en fibroblastos de embrión de pollo (FEPs) se obtuvo lo que actualmente se conoce como MVA. Estudios a nivel genómico mostraron que, como consecuencia de estos pasajes a largo plazo, el genoma viral se redujo en un 13-15% con respecto al virus original (de 192 kb que poseía el virus original, a 178 kb), perdiendo en este proceso numerosos genes, entre ellos algunos relacionados con el rango de huésped y la evasión al sistema inmune [57]. Como resultado de esta importante modificación, MVA perdió la habilidad de producir progenie viral infectiva en casi todas las líneas celulares de mamíferos, incluyendo las humanas, y restringiendo su replicación activa a células aviares [58-60]. Debido a esto, en la mayoría de las células, MVA logra producir proteínas de expresión temprana, intermedia y tardía pero solo es capaz de generar viriones inmaduros [61]. De todas maneras, pese a las grandes deleciones de su genoma, ha logrado mantener una buena inmunogenicidad [62, 63].

La secuencia nucleotídica de CVA predice 229 marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frames*), de los cuales 16 se encuentran duplicados. MVA comparte con su cepa original 195 ORFs, de los cuales sólo 71 son los que efectivamente predicen productos de genes. Los 124 restantes codifican para productos de genes con alguna modificación en sus aminoácidos o presentan inserciones/deleciones comparados con los productos especificados en los ORFs de CVA [62, 63]. En el trabajo de *Meisinger-Henschel* y colaboradores [63] se evaluaron las similitudes entre CVA, MVA y otros genomas de distintas cepas de VACV, en donde se vio que las secuencias de ADN

de MVA y CVA mostraban la relación filogenética más cercana, confirmando que CVA es efectivamente el antecesor de MVA (Figura 5).

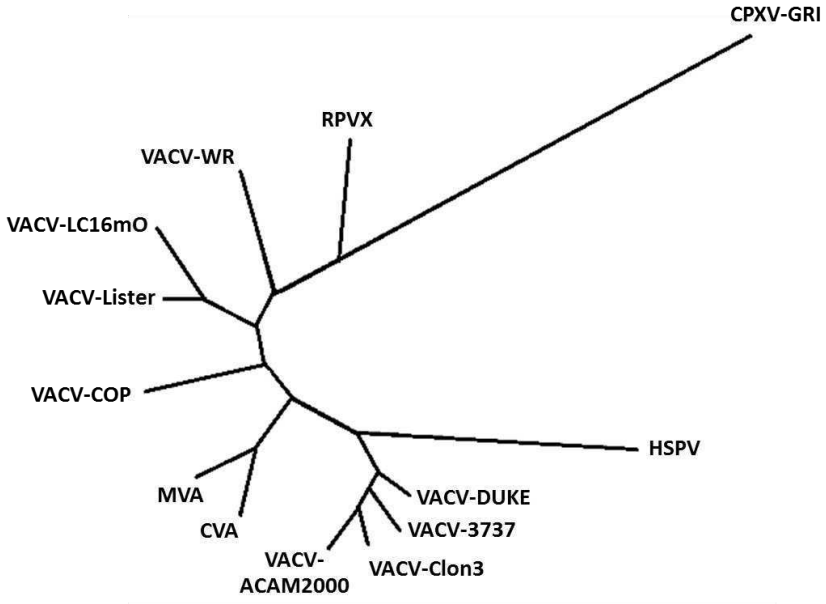

Figura 5. Análisis filogenético de CVA. Estudio de la región genómica central de CVA, que se encuentra conservada, la cual cubre los genes ortólogos en VACV-COP: K2L a A50R. Figura adaptada de *Meisinger-Henschel* y colaboradores [63].

El grupo de *Meyer* y colaboradores [59] identificó seis grandes deleciones en el genoma de MVA, que fueron en gran medida las responsables de la mayor reducción de tamaño. Estas deleciones se numeraron del I al VI, y se ubican en los extremos terminales del genoma (Figuras 6 y 7).

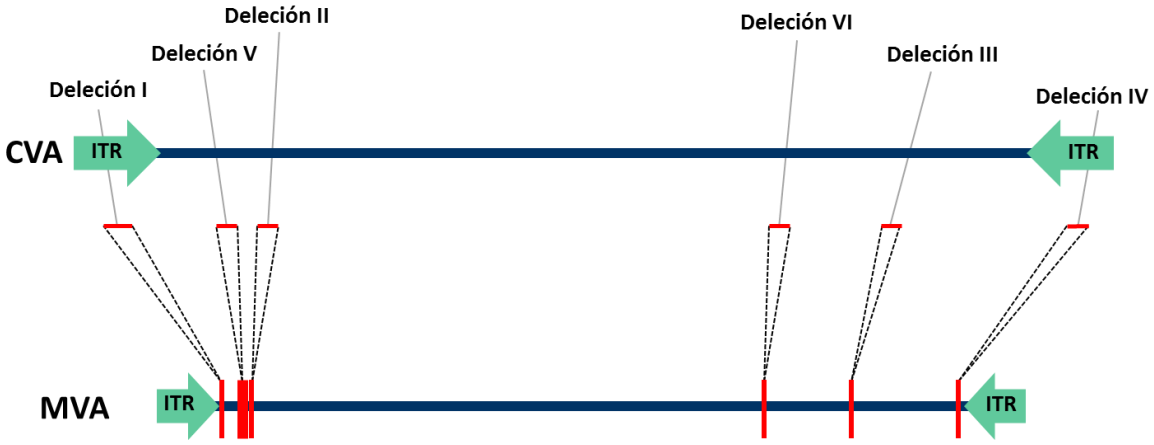

Figura 6. Representación esquemática de las deleciones de MVA. En el esquema se muestra la posición y longitud relativa de las 6 deleciones mayores que presenta MVA en su genoma. Adaptado de *Meisinger-Henschel* y colaboradores [63].

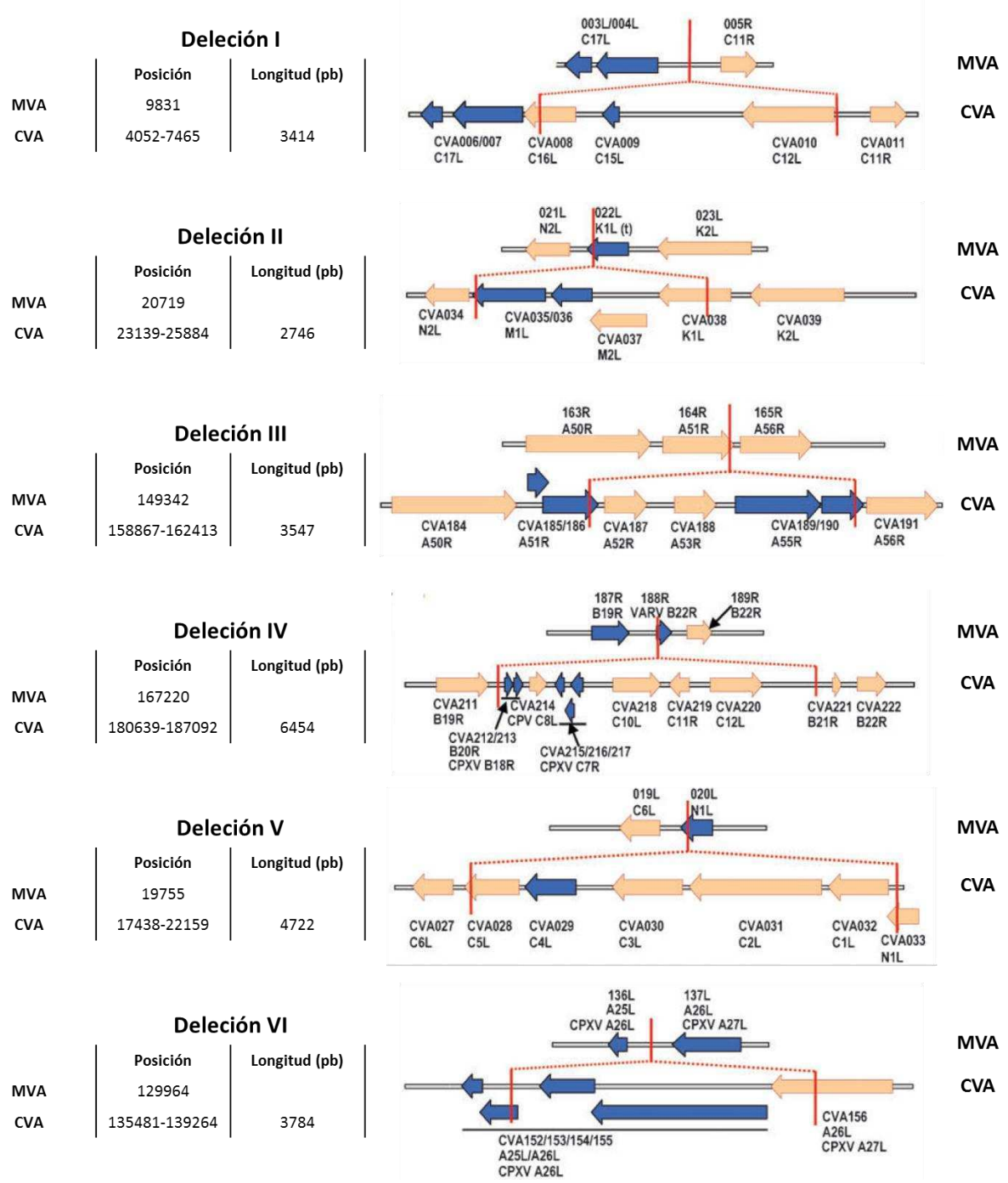

Figura 7. Mapa de las seis deleciones en MVA y CVA. Se representan los ORF mediante flechas de color naranja, y los ORFs fragmentados por flechas azules. Las posiciones de las deleciones se indican con líneas rojas. Figura adaptada de *Meisinger-Henschel* y colaboradores [63].

Varios trabajos en los que se realizaron comparaciones de secuencias entre los genomas de CVA y MVA indican que además de las seis grandes deleciones que posee el MVA, también presenta

mutaciones en más del 60% de los marcos abiertos de lectura, que resultaron en fragmentación y/o truncamiento de genes, deleciones internas cortas o incluso cambios de aminoácidos [57, 60, 63]. Es probable que muchas de estas mutaciones, sino todas, hayan contribuido a generar el fenotipo atenuado de MVA. Sin embargo, aún no está completamente dilucidado cómo estas múltiples alteraciones genéticas presentes en el genoma de MVA limitan o restringen su replicación en células de mamíferos y determinan su falta de patogenicidad *in vivo* [63, 64].

4.2 Genes inmunomoduladores

Los poxvirus poseen numerosos genes destinados a interferir con la acción de los mediadores primarios de la respuesta inmune innata, y además son capaces de manipular vías de señalización intracelular que pueden inhibir desde el desarrollo de vías pro-inflamatorias hasta la apoptosis de la célula huésped. Los productos de estos genes destinados a modular la respuesta inmune del huésped pueden involucrar proteínas de unión a interleuquinas y/o quimioquinas o citoquinas, receptores homólogos a los del hospedador hasta ligandos que mimetizan a los del huésped [65]. CVA contiene genes inmunomoduladores como *B19R* (receptor soluble y de superficie celular para interferón α/β) o *A53R* (receptor para TNF-α), cuyos genes ortólogos en MVA están ausentes o codifican para proteínas no funcionales. Este tipo de deleciones se cree son una de las causas del mantenimiento de la alta inmunogenicidad del vector, a pesar de haber perdido su capacidad de replicar activamente en mamíferos.

Teniendo en cuenta el proceso "natural" de atenuación que sufrió CVA, producto de los sucesivos pasajes en FEPs y observando los resultados en cuanto a la alta inmunogenicidad que mantenía el MVA, surge la idea de que la deleción dirigida y racional de genes inmunomoduladores aun conservados en el genoma de MVA podría optimizar esta característica del virus y aumentar su potencial como vector vacunal. En las siguientes secciones se desarrollará este concepto más

ampliamente (ver sección 5.2 “Optimización de vectores virales: deleción de genes inmunomoduladores”).

4.3 El MVA en ensayos clínicos humanos

Los virus recombinantes basados en poxvirus (MVA, NYVAC o ALVAC, por citar los más relevantes), han sido utilizados de manera satisfactoria en combinaciones homólogas o heterólogas en la prevención y tratamiento de enfermedades humanas y veterinarias [66].

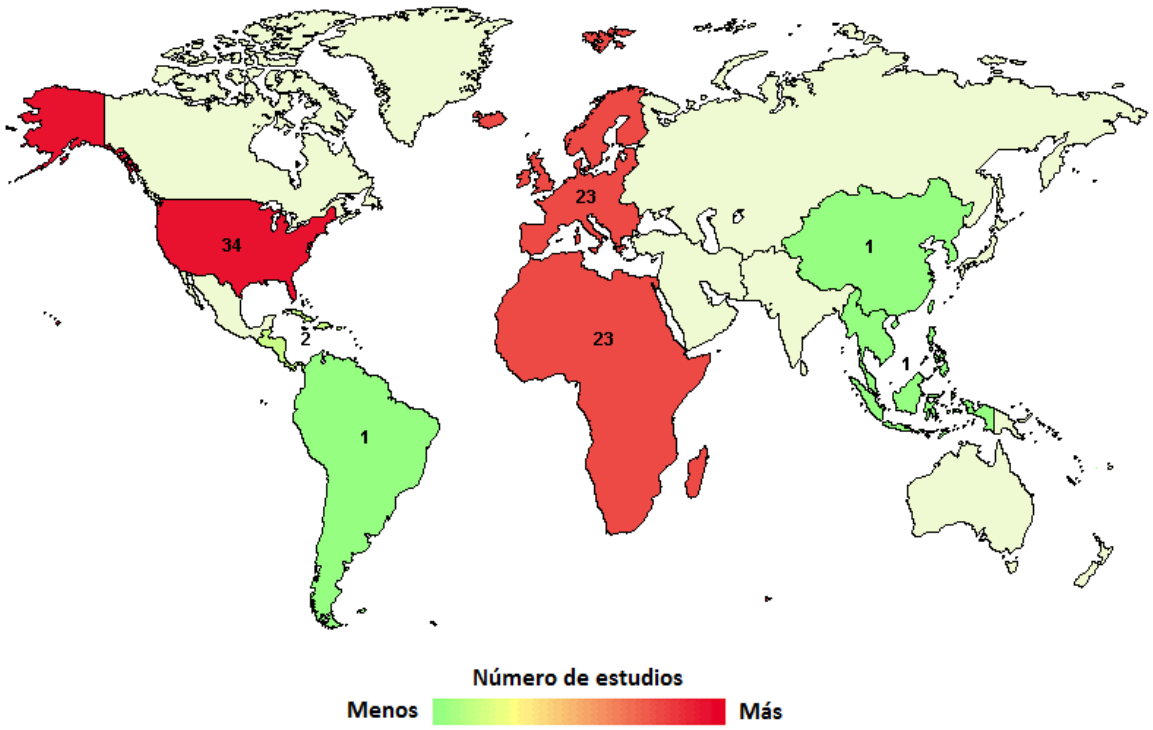

Figura 8. Distribución de los ensayos clínicos con MVA a nivel mundial. Se representan en graduación de colores el número de ensayos clínicos por país o región, que contienen al vector MVA dentro de su diseño vacunal. Verde representa un menor número de estudios hasta el rojo que indica un mayor número de ensayos. Imagen tomada de https://clinicaltrials.gov/ [67].

Múltiples recombinantes de MVAs se han generado expresando antígenos virales, provenientes de parásitos, bacterianos o tumorales frente a un amplio rango de enfermedades infecciosas como HIV/SIDA, influenza, hepatitis B y C, malaria, tuberculosis y cáncer.

La mayoría de los ensayos clínicos que involucran el uso de MVA en combinación con otros vectores son consistentes en cuanto al uso de este vector como *prime* (o primera dosis) en combinación con proteínas y adyuvantes para potenciar la respuesta B frente a un antígeno, o como un *boost* (o segunda dosis/refuerzo), en caso que se quiera incrementar la magnitud de la respuesta T [68, 69].

Al momento de escritura de esta tesis, 75 ensayos clínicos que incluían al MVA como parte de su plataforma vacunal, se registraron a nivel mundial, entre ensayos activos, en reclutamiento y finalizados, considerando los últimos 15 años. En la figura 8 se representa el número de ensayos clínicos realizados por país, siendo América del Norte, África y Europa los que lideran la lista.

Actualmente, el mayor desarrollo está centrado en vacunas que puedan prevenir la infección por el virus del Ébola, como se puede apreciar en la tabla 2, debido al más reciente brote en 2014 situado en África Occidental. Sin embargo, los esfuerzos por desarrollar vacunas contra tuberculosis, HIV/SIDA y malaria siguen aún vigentes, como también vacunas contra diversos tipos de cáncer.

Tabla 2. Ensayos clínicos de los últimos 6 años que involucran el uso de MVA como vector vacunal

Título del ensayo clínico	Estado	Fase	N[§]	Inicio
Long-term Safety Follow-up of Participants Exposed to the Candidate Ebola Vaccines Ad26.ZEBOV and/or MVA-BN-Filo	Reclutando	4	5500	2016
A Phase I Trial to Evaluate the Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of MVA-BN Yellow Fever Vaccine with and Without Montanide ISA-720 Adjuvant in 18-45-Year-Old Healthy Volunteers	Reclutando	1	90	2016
Staged Phase 3 Study to Assess the Safety and Immunogenicity of Ebola Candidate Vaccines Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo During Implementation of Stages 1 and 2	Reclutando	3	728	2015
A Study to Evaluate a Range of Dose Levels of Ad26.ZEBOV and MVA-BNFilo in Healthy Adult Participants	Reclutando	3	525	2015
A Study to Evaluate the Immunogenicity, Safety and Tolerability of Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo in Healthy Adult Participants	Activo, sin reclutamiento	3	329	2015
Multi-antigen CMV-MVA Triplex Vaccine in Reducing CMV Complications in Patients Previously Infected with CMV and Undergoing Donor Hematopoietic Cell Transplant	Reclutando	2	115	2015
Safety, Tolerability and Immunogenicity Study of 3 Prime-boost Regimens for Ebola Vaccines Ad26.ZEBOV/MVA-BN-Filo in Healthy Adults, Children and Human Immunodeficiency Virus Positive (HIV+) Adults	Reclutando	2	1188	2015
VRC 208: Dose, Safety and Immunogenicity of a Recombinant MVA Ebola Vaccine, VRC-EBOMVA079-00-VP (MVA-EbolaZ), Administered Alone or as a Boost to cAd3-Ebola Vaccines in Healthy Adults	Activo, sin reclutamiento	1	64	2015
p53MVA Vaccine and Gemcitabine Hydrochloride in Treating Patients with Recurrent Ovarian Epithelial Cancer	Reclutando	1	9	2015
Safety, Tolerability and Immunogenicity Study of 2 Prime-boost Regimens for	Reclutando	2	575	2015

Ebola Vaccines Ad26.ZEBOV/MVA-BN-Filo				
Safety and Tolerability of a Modified Vaccinia Ankara (MVA)-Based Vaccine Modified to Express Brachyury and T-cell Costimulatory Molecules (MVA-Brachyury-TRICOM)	Activo, sin reclutamiento	1	38	2014
Trial to Investigate the Effect of Schistosoma Manzoni Infection on the Response to Vaccination with MVA85A in BCG-vaccinated African Adolescents	Completo	2	36	2014
Safety, Tolerability, and Immunogenicity Study of Homologous Ad26 Mosaic Vector Vaccine Regimens or Heterologous Ad26 Mosaic and MVA Mosaic Vector Vaccine Regimens with Glycoprotein 140 (gp140) for Human Immunodeficiency Virus (HIV) Prevention	Activo, sin reclutamiento	2	396	2014
Evaluating the Safety and Immune Response to Three Different DNA HIV Vaccines Administered With a MVA-CMDR Boost Vaccine in Healthy, HIV-Uninfected Adults	Activo, sin reclutamiento	1	105	2014
Randomized, Open-label Phase II Trial to Assess the Safety and Immunogenicity of MVA-BN Smallpox Vaccine in Immunocompromised Subjects with HIV Infection	Activo, sin reclutamiento	2	90	2014
Study Evaluating Aerosol and Intradermal Administration of a Candidate TB Vaccine, MVA85A, to Increase Immune Response and Avoid Anti-Vector Immunity	Reclutando	1	37	2013
Phase I Trial Evaluating Safety and Immunogenicity of MVA85A-IMX313 Compared to MVA85A in BCG Vaccinated Adults	Reclutando	1	30	2013
Safety and Immunogenicity of ChAdV63.HIVconsv and MVA.HIVconsv Candidate HIV-1 Vaccines in Recently HIV-1 Infected Individuals	Reclutando	1	48	2012
Safety and Immunogenicity of MVA85A Prime and BCG Boost Vaccination	Reclutando	2	248	2012
A Phase II Trial to Assess the Safety and Immunogenicity of DNA Priming Administered by the ID Zetajet With or without ID DermaElectroporationFollowed by IM MVA Boosting in Healthy Volunteers in Tanzania and Mozambique	Reclutando	2	198	2012
Safety Study of an Additional MVA Vaccine in Volunteers Who Received 3 DNA Vaccines Followed by 2 MVA Vaccines (HIV IS 06)	Reclutando	1|2	20	2012
Efficacy of Malaria Vaccines in Kenyan Adults	Reclutando	2	120	2012
Efficacy of Candidate Malaria Vaccines in Senegalese Adults	Reclutando	2	120	2012
Phase IIB/III of TG4010 Immunotherapy in Patients with Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer	Activo, sin reclutamiento	2|3	1000	2012
Evaluating the Safety and Immune Response of a Prime-Boost HIV Vaccine Regimen in Healthy, HIV-Uninfected, Vaccinia-Naive Adults	Activo, sin reclutamiento	1	48	2012
Efficacy Against TB Disease, Safety, and Immunogenicity of MVA85A/AERAS-485 in HIV-Infected Adults (C-030-485)	Completo	2	650	2011
A Study of AdCh63 AMA1 Alone and With MVA AMA1	Completo	1	16	2010
Evaluating the Safety of and Immune Response to an HIV Vaccine Followed by Booster, Administered by Two Devices, in HIV-Uninfected Adults	Completo	1	92	2010

[§]Número de participantes. La información completa y detallada puede encontrarse en https://clinicaltrials.gov/[67]

La tabla 3 resume los principales estudios que utilizaron al MVA como vector vacunal recombinante en los últimos años, frente a HIV/SIDA, malaria, tuberculosis, influenza y dengue. Con el objetivo de inducir respuestas inmunes eficaces, diferentes estrategias han sido ensayadas, aunque en la

mayoría de los casos todas comparten el uso de regímenes de vacunación heterólogos de tipo *prime-boost* [70].

Tabla 3. Ensayos clínicos en humanos que involucran vacunas basadas en el vector viral MVA

Patógeno	Vacuna	Antígeno	Estrategia	Fase	Año de culminación	Inmunogenicidad	Eficacia
HIV-1*	MVA-CMRD	Env/Gag/Pol	Triple dosis	1	2008	Inmunogénico (T-CD4$^+$ y CD8$^+$)	sd
			DNA/MVA	1/2	2006	Altamente inmunogénico (T-CD4$^+$ y CD8$^+$)	sd
	MVA-B	Env (gp120)/ Gag/Pol/Nef	Triple dosis	1	2010	Altamente inmunogénico (T-CD4$^+$ y CD8$^+$) Débil respuesta de Ac. neutralizantes	sd
	TBC-M4	Env/Gag/ Rev/ Tat/Nef/RT	Triple dosis	1	2010	Moderadamente inmunogénico	sd
			DNA/MVA	1	2010	Moderadamente inmunogénico	sd
	ADMVA	Env/Gag/Pol/ Nef/Tat	Triple dosis	1	2007	Moderadamente inmunogénico, fuerte respuesta de Ac. neutralizantes	sd
	MVA62	Gag/Env/ PR/RT	DNA/MVA	1	2008	Altamente inmunogénico (T-CD4$^+$ y CD8$^+$)	sd
Malaria	MVA-CS	CS	RTS, S/AS02A/MVA	sd	sd	Fuerte respuesta de Ac.	Protección parcial (33%)
	MVA-ME TRAP	ME-TRAP	ChAd63/NVA	1	2011	Altamente inmunogénico (T-CD4$^+$ y CD8$^+$)	sd
	MVA-MSP1	MSP1	ChAd6/MVA	2a	2011	Altamente inmunogénico (respuesta cellular T y de Ac.)	Sin protección
Influenza A	MVA-NP +M1	NP + M1	Simple dosis	2a	2010	Altamente inmunogénico	Eficacia 60%
TB[£]	MVA85A	85ª	BCG/MVA	2b	2012	Altamente inmunogénico	Sin protección
HBV[§]	MVA.HBs	HBsAg	DNA/MVA	sd	2004	Variable y no específico	Sin protección
Dengue virus	MVA-DEN2	Proteína E	Triple dosis	Pre-clínico	1999	Inducción de Ac. Neutralizantes	Protección

Adaptado y traducido al español de *Quinán* y colaboradores [70]. *Virus de la Inmunodeficiencia humana (HIV-1, *Human Immunodeficience Virus*), [£]Tuberculosis, [§]*Hepatitis B Virus,* ChAd63: Adenovirus de chimpancé 63, Ac: anticuerpos, RTS,S/AS02A: adyuvantes, sd: sin datos

4.4 Uso de MVA en medicina veterinaria

Del mismo modo, en el área veterinaria, las vacunas se han vuelto esenciales tanto para prevenir enfermedades, mantener la salud y el bienestar de los animales como el de la población en general, como también la buena calidad de alimentos, tratando de reducir o prevenir la trasmisión zoonótica de enfermedades [70]. En este contexto, la aplicación de vacunas basadas en vectores virales ha sido más exitosa en el área de sanidad animal, con numerosos ensayos clínicos basados en poxvirus y con algunas vacunas ya licenciadas para su uso en ganado y animales domésticos [69].

Tabla 4. Vacunas recombinantes basadas en VACV para uso veterinario

Enfermedad	Vector
Gripe aviar	**Virus *Fowlpox*¤**
Enfermedad de Newcastle	
Gripe equina	**Virus *Canarypox* atenuado¤**
Enfermedad de West Nile	
Rabia felina	
Leucemia felina	
Moquillo canino	
Rabia (lobos, coyotes) ¤	**VACV (Cepa: Copenhagen)**
Fiebre del Valle Rift	
Tuberculosis Bovina	**MVA**
Enfermedades asociadas a Herpesvirus Bovino	
Bluetongue disease	
African horse sickness	
Leishmaniasis	
Peste de pequeños rumiantes	

¤Vacunas ya licenciadas. Tabla traducida al español y adaptada de *Quinán* y colaboradores [70].

El primer vector que se licenció para ser utilizado como vacuna en animales estuvo basado en VACV, y consistió en una vacuna recombinante conteniendo el gen de la glicoproteína de superficie del virus de la rabia. La vacuna fue autorizada en Francia (1995), Bélgica y Luxemburgo (1996) y en Estados Unidos (1997/2002) para ser utilizada en coyotes, mapaches y lobos [70, 71].

Hasta el momento, hay por lo menos ocho vectores poxvirales que ya están licenciados para ser utilizados como prototipos vacunales, incluyendo vectores basados en *canarypox* (frente a influenza equina, virus del Nilo Occidental, rabia, leucemia felina), VACV (rabia) y *fowlpox* (Influenza aviar y enfermedad de Newcastle) (Tabla 4).

A su vez, se están realizando estudios que incluyen al MVA como vector vacunal en numerosas enfermedades, pero principalmente en tuberculosis bovina, enfermedad de la lengua azul (*Bluetongue disease*) y peste equina africana (*African horse sickness*) (Tabla 4).

4.5 Perspectivas en cuanto al uso de MVA como vacuna frente a HIV

Uno de los ensayos clínicos de mayor repercusión de los últimos años dentro del área de desarrollo de vacunas frente a HIV/SIDA fue el ensayo de eficacia RV-144 [32], llevado a cabo en Tailandia, estableciendo la primer evidencia de que una vacuna contra HIV era capaz de proveer protección contra la adquisición del virus en grupos de bajo riesgo (31,2% de eficacia). El régimen de vacunación, que consistió en una primera dosis o *prime* con ALVAC (*canarypox* no replicativo) expresando diversos antígenos de HIV y un refuerzo o *boost* de AIDSVAX (vacuna bivalente para la proteína de envoltura gp120 subtipos B/E) resultó seguro y bien tolerado.

Este hallazgo de protección, si bien modesto, permitió identificar correlatos inmunes de riesgo como también la presencia de anticuerpos dirigidos contra epítopes de la proteína de envoltura. Lejos de desalentar a la comunidad científica, estos descubrimientos demuestran la necesidad de acrecentar los esfuerzos en el desarrollo de nuevos diseños de vacunas y ensayos clínicos, haciendo hincapié en

la optimización de la respuesta inmune inducida por la vacunación [72]. Tal es así que en el último congreso de prevención de HIV (HIVR4P 2016) llevado a cabo en Chicago, en octubre de 2016, se presentaron numerosos trabajos que involucraron el uso de poxvirus como vectores vacunales, incluyendo al MVA. Un trabajo en el que vacunaron macacos hembra de manera subcutánea con MVA-HIV, siguiendo un esquema *prime-boost*, mostró que se inducían células T-CD8^{+} específicas para MVA polifuncionales en la mucosa genital como también anticuerpos de tipo IgG e IgA y asimismo, una respuesta celular específica frente a HIV en sangre y ganglios linfáticos [73]. Además se están llevando a cabo ensayos clínicos en humanos de fase I y II que incluyen al MVA como vector vacunal, con resultados prometedores en el campo de HIV [74].

5. ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACIÓN DE VECTORES

5.1 El MVA como vector vacunal

Es indiscutido el gran avance que se ha dado en los últimos años tanto en las áreas de Inmunología y Virología, como también en el campo del desarrollo de vacunas. Sin embargo, los abordajes implementados hasta el momento no han dado resultados alentadores en ciertas áreas donde aún hay una imperiosa necesidad de generar vacunas efectivas, como es el caso de enfermedades como HIV/SIDA, Malaria y Tuberculosis.

Se está desarrollando una nueva generación de vacunas basadas en vectores virales capaces de expresar antígenos recombinantes, entre los cuales el MVA está considerado como uno de los más prometedores para cumplir con este objetivo a nivel de salud mundial.

Muchas de las características innatas del vector lo convierten en un excelente candidato para ser utilizado como plataforma para el desarrollo de vacunas. El gran tamaño que posee el genoma de MVA lo vuelve altamente susceptible de ser transducido con múltiples insertos codificantes y con tamaños prácticamente ilimitados (de hasta 25 kpb) [75], capaces de promover una respuesta

inmune adaptativa de larga duración. A su vez, la presencia de promotores virales fuertes, ya sean del propio vector o introducidos por ingeniería genética, permite una alta y eficiente expresión de antígenos recombinantes [76]. Otra característica importante a la hora de pensar en el desarrollo de vacunas reside en que el riesgo de integración del genoma viral al genoma del huésped es prácticamente nulo, ya que la replicación se da en el citoplasma de la célula hospedadora [62]. Durante la campaña de vacunación contra viruela, MVA fue administrado en Alemania a más de 120 mil individuos, entre ellos personas de alto riesgo, con desórdenes del sistema nervioso o inmunodeficiencias, alergias o enfermedades de la piel, enfermedades crónicas e incluso niños, sin reportarse efectos adversos serios; contrariamente a lo que se había observado con otras cepas de Vaccinia [62]. Esto demostró la inocuidad del vector, incluso para ser utilizado en personas inmunocomprometidas. Desde entonces, MVA ha sido intensamente evaluado en numerosos estudios, tanto en humanos como en modelos animales, confirmando su seguridad y demostrando mantener su inmunogenicidad, sin desarrollo de enfermedad clínica alguna [77]. Las características y ventajas de MVA se resumen en la tabla 5.

5.2 Optimización de vectores vacunales: deleción de genes inmunomoduladores

Como se mencionó brevemente en la sección 4.2 (“Genes inmunomoduladores”) la eliminación de genes relacionados al rango de huésped o evasión del sistema inmune, de manera dirigida, como estrategia para la optimización de vectores vacunales, es un recurso que se utiliza hace ya varios años y que ha mostrado resultados muy positivos. Uno de los primeros trabajos que demostró que este tipo de estrategia era adecuada, fue realizado por *Staib* y colaboradores [78]. Por técnicas de biología molecular delecionaron el gen *B15R* que codifica para un receptor soluble de la citoquina IL-1β. Esta proteína es capaz de modular la respuesta aguda del huésped “secuestrando” la IL-1β e impidiendo que ejerza su acción pro-inflamatoria como principal pirógeno del cuerpo. Luego de inocular ratones con el vector delecionado para *B15R*, no solo observaron un aumento en la

respuesta de células T-CD8^{+} de memoria, en relación al MVAwt, sino que estos animales presentaron mayores niveles de protección frente al desafío con una cepa virulenta de Vaccinia.

Tabla 5. Breve descripción de las características de MVA y las ventajas que ofrece como vector vacunal

***MODIFIED VACCINIA ANKARA* (MVA)**	
Familia	*Poxviridae*
Género	Orthopoxvirus
Virión	300 x 250 ηm, envuelto, formas: IMV, IEV, CEV y EEV
Genoma	178 kb DNA doble cadena, 193 ORFs y 177 genes (25 pseudogenes)
Ventajas	- Gran capacidad de empaquetamiento (hasta 25 kpb) de ADN recombinante - Ausencia de persistencia y/o integración en el genoma del huésped - Alta inmunogenicidad como vector vacunal, capaz de inducir respuestas inmunes humorales y celulares - Facilidad de manipulación, producción y administración - Inocuidad/seguridad para ser utilizado incluso en personas inmunocomprometidas

Numerosos trabajos continuaron con esta línea observando resultados semejantes en cuanto al incremento de la inmunogenicidad del vector. Al delecionar el gen *A41L* del genoma de VACV se observó un aumento en la inmunogenicidad del vector. Si bien el ligando correspondiente específicamente a *A41L* no se ha dilucidado aún, se sabe que tiene similitud con proteínas de otros poxvirus involucradas con unión a quimioquinas y otros ligandos [79]. Por su parte, *Rehm* & *Roper* reportaron en 2011 [80] que la deleción del gen *A35R* del genoma de MVA, cuyo producto es una proteína involucrada en la inhibición de la presentación antigénica [81], contribuyó a incrementar ambos perfiles de la respuesta inmune tanto humoral como celular, ya que aumentó la producción de inmunoglobulinas de tipo IgG como así también el número de células específicas productoras de

IFN-γ. Además, el vector delecionado logró conferir protección en ratones luego de un desafío intranasal con la cepa replicativa de VACV *Western Reserve* (WR).

Como estos, existen otros tantos genes inmunomoduladores que aún se conservan en el genoma de MVA y cuya deleción ha demostrado un aumento en la inmunogenicidad del vector. Por citar como ejemplo al gen *M2L*, que fosforila una proteína involucrada en la activación de la vía de NF-Kβ, inhibiendo consecuentemente su acción [82]; o el gen *F1L* como inhibidor de apoptosis [83]. De igual forma los genes *B19R*, *B8R* o *N2L* que actúan inhibiendo alguna etapa de las vías de señalización de IFN de tipo I y II [84-86]; como también, los productos de genes *C6L* y *K7R*, inhibidores de las vías de señalización de interferones de tipo I [87, 88]. *García-Arriaza* y colaboradores [89] construyeron un vector vacunal recombinante para HIV utilizando como vector el MVA al cual le habían delecionado de manera simultánea estos dos genes. Este grupo demostró que la respuesta inmune adaptativa y de memoria frente a epítopes de HIV se vio optimizada, en el modelo murino estudiado, en relación a la respuesta generada por el MVAwt recombinante.

Nuestro grupo de investigación describió en el trabajo de *Falivene* y colaboradores [90] la deleción del gen *C12L* del genoma de MVA. Este gen codifica para una proteína de unión a IL-18 (IL-18bp, del inglés *IL-18 binding protein*) [91, 92], citoquina pro-inflamatoria asociada típicamente al desarrollo de respuestas Th1 como también al estímulo de respuestas citotóxicas T-CD8^{+}. Esta citoquina, en conjunto con IL-2, IL-12, y en presencia de antígenos y mitógenos induce finalmente la producción de un mediador soluble característico de respuestas pro-inflamatorias como es el IFN-γ [93]. La presencia de una proteína capaz de unir IL-18 y bloquear la unión a su correspondiente receptor, impide que se desencadenen estas vías de señalización. Al eliminar este gen del genoma de MVA se evidenció un aumento en la inmunogenicidad frente a antígenos propios del vector y más importante aún, frente a antígenos de HIV cuando se construyó un vector delecionado recombinante para la proteína Nef del subtipo BF [90].

Dentro de los otros genes inmunomoduladores que están presentes en el genoma de MVA, se encuentran los genes *A46R* y *A44L*, los cuales se describirán más en detalle a continuación.

5.2.1 Gen *A46R*

El gen *A46R* codifica para una proteína que inhibe numerosas vías de señalización pro-inflamatorias, disparadas por la activación de receptores de tipo Toll (TLR, del inglés *Toll Like Receptors*). Estas vías se caracterizan por la activación de cascadas de MAP-quinasas (MAP, del inglés, *Mitogen Activated Protein*) como también de factores de transcripción como NF-κβ o IRF3/IRF7 y que conducen en última instancia, a la producción de interferones de tipo I, citoquinas pro-inflamatorias como IL-1β, IL-6, IL-12, entre otras; como así también la estimulación de células T [94-96] (Figura 9).

La proteína A46 presenta similitud de secuencia aminoacídica con el dominio TIR (*Toll/IL-1 Receptor*), homólogo a la región citoplasmática del receptor para IL-1. Este dominio, presente en todos los receptores tipo Toll, a excepción del TLR3, es requerido para la transducción de señales de estos receptores, y le permite establecer interacciones homotípicas con proteínas adaptadoras que posean a su vez este dominio: MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β*), TIRAP/Mal, TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) y SARM (*Sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein*) [97]. Como se mencionó previamente, la proteína A46 tiene un dominio homólogo al dominio TIR, esto le permite interactuar con las proteínas adaptadoras mencionadas, específicamente MyD88, TRIF y TRAM, interfiriendo con la cascada de señalización río abajo que involucra vías de MAP-quinasas y activación del factor NF-Kβ [96, 98].

Muchos estudios han demostrado que la deleción de este gen favorece la atenuación del virus. En 2005, *Stack* y colaboradores delecionaron este gen de la cepa WR de VACV (vΔA46R) y lo inocularon en ratones por vía intranasal. Los animales que recibieron este vector mostraron menores signos de

enfermedad en términos de reducción del peso corporal, en relación al grupo de ratones que recibió el vector salvaje (vWT-A46R) o el mutante revertante (v-A46R-REV) como también una diferencia en la cinética de respuesta del hospedador, en donde el grupo de vΔA46R permitió un mayor reclutamiento de células a pulmón [96].

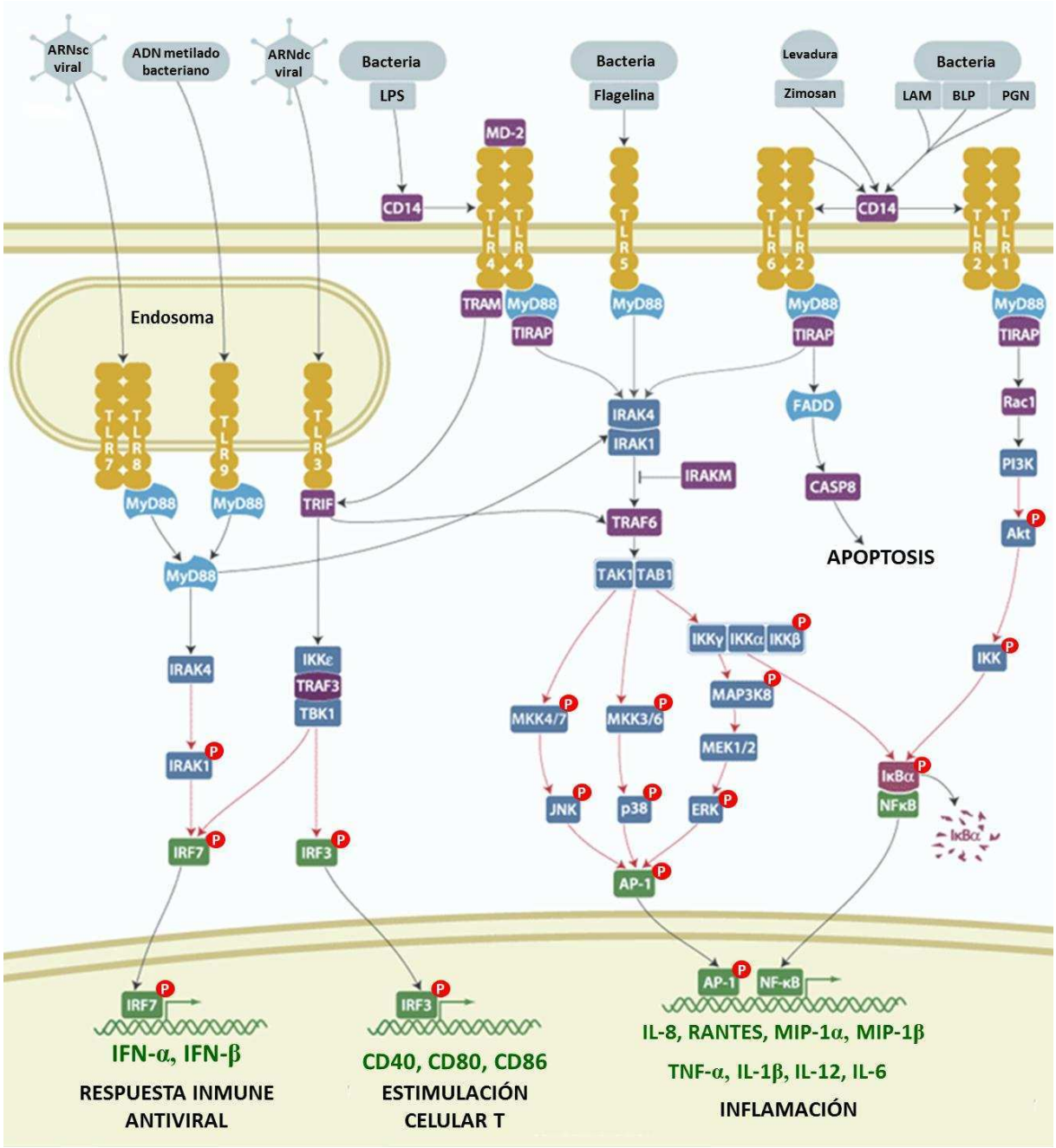

Figura 9. Esquema de las diferentes vías de señalización mediadas por receptores Toll. Se representan las principales vías de señalización que desencadenan las respuestas pro-inflamatorias indicadas. En cada una de las vías se indica la participación de proteínas adaptadoras como es el caso de MyD88, susceptibles de ser inhibidas por proteína virales. Adaptado y traducido al español de https://www.thermofisher.com/ar/es/ [99].

En concordancia con estos resultados, otro grupo de investigación publicó un artículo en el que eliminaron este mismo gen, pero en este caso del genoma de NYVAC, otro vector derivado del virus Vaccinia, específicamente de la cepa Copenhagen [21]. Generaron un vector recombinante que expresaba los antígenos Env, Gag, Pol y Nef de HIV-1 subtipo C (NYVAC-C-ΔA46R) y observaron que la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, frente a estos epítopes recombinantes se vio optimizada en relación a la respuesta generada por el vector salvaje recombinante (NYVAC-C) [100].

Por otro lado, y de manera controversial, otros trabajos reportaron que la deleción de este gen en el contexto del genoma de MVA no lograba aumentar la inmunogenicidad del vector [101, 102]. Cabe destacar que en estos últimos trabajos se utilizó la tecnología del cromosoma artificial bacteriano o BAC (por sus siglas en inglés, *bacterial artificial chromosome*) como método para la generación de vectores poxvirales recombinantes.

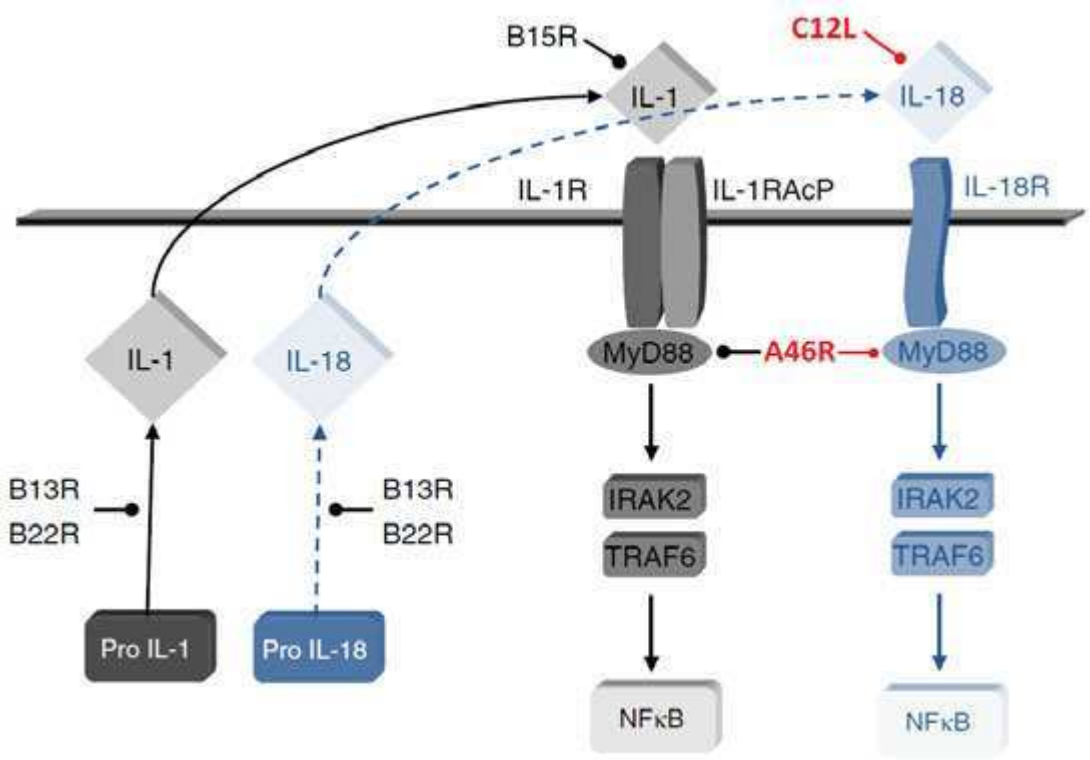

Figura 10. Inhibición de vías pro-inflamatorias por proteínas de VACV. Esquema representativo de dos vías pro-inflamatorias inhibidas a distintos niveles por proteínas codificadas por virus VACV. En el esquema se resalta en azul la vía de IL-18, y en rojo los productos de los genes C12L y A46R que bloquean la activación del factor de transcripción NF-κβ, ya sea antes de la unión de la IL-18 a su receptor (C12), o posteriormente bloqueando la unión de la proteína adaptadora MyD88 (A46). Esquema adaptado de *Haga* & *Bowie*, 2005 [103].

Es importante destacar, además, que el producto del gen *A46R* se inter-relaciona con la proteína de unión a IL-18, codificada por el gen *C12L* y descripta previamente. En la figura 10 se puede ver esquemáticamente como los productos de estos genes inhiben a distintos niveles, la vía de señalización de IL-18, una de las tantas vías pro-inflamatorias del hospedador que culminan en la activación del factor de transcripción NF-κβ. Esta estrategia en la que se combinan múltiples proteínas virales, tanto intracelulares como secretorias, constituye uno de los mecanismos de evasión del sistema inmune ampliamente utilizado por VACV y sus derivados [103].

5.2.2 Gen *A44L*

A44L es un gen que está presente en el genoma de MVA y codifica para una enzima que posee 31% de similitud con la 3β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa/Δ5-4 isomerasa humana (3β-HSD, por sus siglas en inglés *3β-Hydroxysteroid dehydrogenase/Δ5-4 isomerase*), encargada de transformar los Δ5-3β-hidroxi-esteroides en Δ4-3 ceto-esteroides, paso esencial en la biosíntesis de todas las clases de hormonas esteroides: mineralocorticoides, glucocorticoides, y hormonas sexuales (Figura 11) [104-106].

Las hormonas esteroideas juegan un papel muy importante en el desarrollo, diferenciación y crecimiento de numerosos tejidos pero además, muchas de ellas son consideradas potentes agentes inmunosupresores y anti-inflamatorios, capaces de inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias y a su vez estimular la producción del factor de crecimiento transformante β o TGF-β (por sus siglas en inglés, *transforming growth factor β*) en ciertas células [107]. Incluso, estas hormonas también pueden regular la migración y citotoxicidad de células inmunes. Limitan, por ejemplo, el acceso de los linfocitos a los sitios de inflamación, inhiben la adhesión de neutrófilos a células endoteliales y antagonizan la diferenciación de macrófagos inhibiendo además otras funciones como expresión de MHC-II, liberación de citoquinas y producción de prostaglandinas y leucotrienos, entre otras [108].

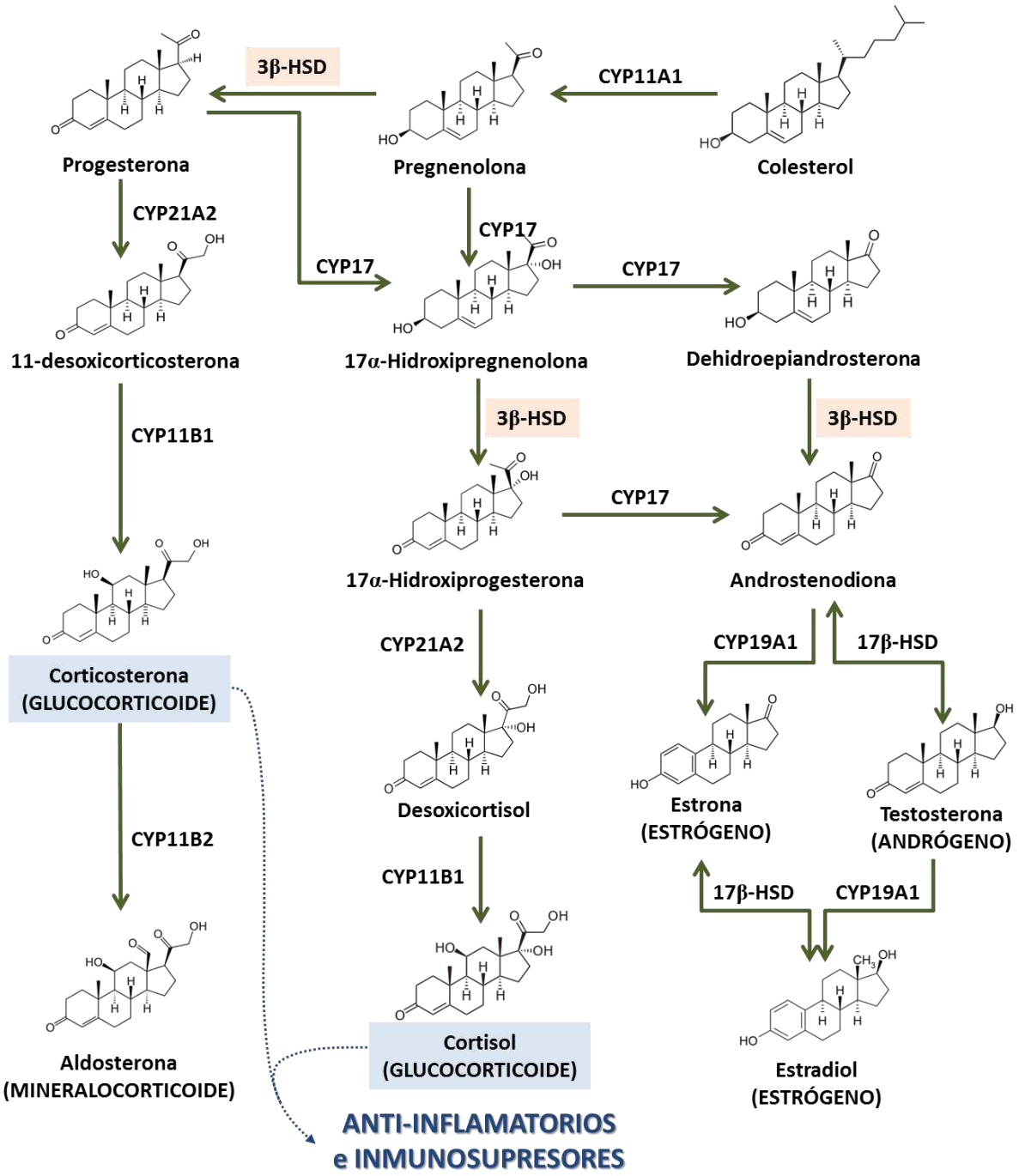

Figura 11. Representación esquemática de las vías de señalización de hormonas esteroides. Se muestran las vías de señalización y las enzimas participantes para la síntesis de hormonas esteroideas. La imagen es una modificación de la imagen original propiedad de © 2009 QIAGEN, todos los derechos reservados. La misma se puede encontrar en [109].

En 1992, *Moore* & *Smith* [110], observaron que la deleción de este gen de la cepa WR de VACV no afectaba la replicación *in vitro*, pero sí su virulencia *in vivo*, describiéndolo como un nuevo factor de virulencia. Más tarde, este mismo grupo comprobó que efectivamente la presencia de esteroides

generados por esta enzima contribuía a suprimir la respuesta inflamatoria generada por el huésped, en un modelo *in vivo* [105]. Inmunizaron ratones por vía intranasal con un vector derivado de la cepa WR, al cual le delecionaron el gen *A44L* (vΔA44L), y compararon los niveles de corticoesteroides en sangre y pulmón, en relación a ratones inmunizados con el vector salvaje (vA44L) o el revertante para el gen (vA44L-rev). Los niveles de esteroides hallados en estos grupos fueron mayores a los encontrados en el grupo vΔA44L, el cual mostró a su vez una menor pérdida de peso corporal (como signo de enfermedad) y una mejor respuesta inmune pulmonar en términos de mayor reclutamiento de células T-$CD4^+$ y $CD8^+$ y mayor actividad citotóxica.

De igual forma, otros grupos de trabajo demostraron este concepto de virulencia por parte del gen *A44L* en modelos murinos, luego de inocular a los animales por vía intracerebral [111] o intradérmica [112]. No obstante, otros trabajos describen que la deleción de este gen tampoco produjo aumentos en la inmunogenicidad del vector [101, 102].

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Lo último que uno sabe, es por dónde empezar.

- Blaise Pascal

En base a lo expuesto en la Introducción, la Hipótesis de trabajo planteada establece que **la deleción dirigida de tres genes específicos del genoma de MVA, relacionados con la evasión de la respuesta inmune, aumentará su potencial como vacuna**.

En base a esto, el Objetivo General consistió en realizar la **caracterización de vectores vacunales optimizados basados en el virus MVA tras la deleción de genes con funciones relacionadas a la evasión del sistema inmune del hospedador**. Los vectores MVA delecionados que se estudiaron fueron: MVAΔA44L-A46R (con deleción simultánea de los genes *A44L* y *A46R*) y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (deleción de *A44L, A46R* y *C12L*).

Frente a este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos (OE):

OE1: Caracterización *in vitro* de los nuevos vectores MVA delecionados en cuanto a la presencia/ausencia de los genes virales seleccionados y/o sus productos, y en cuanto a la capacidad replicativa *in vitro* de los vectores.

OE2: Desarrollo y puesta a punto de los ensayos biológicos *in vitro* con el fin de evaluar la presencia/ausencia de actividad biológica atribuida a los genes virales que fueron delecionados.

OE3: Estudio del impacto de la utilización de los vectores MVA delecionados: MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R en relación a su potencial para la generación de inmunidad específica adaptativa.

OE4: En base a los resultados obtenidos en el OE3 seleccionar al vector MVA delecionado que haya mostrado la mejor *performance* vacunal, para luego realizar un análisis exhaustivo sobre la calidad de respuesta innata generada por dicho vector en comparación con la inducida por el MVAwt.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los que aseguran que es imposible no deberían interrumpir a los que estamos intentándolo.

- Thomas Alva Edison

1. REACTIVOS BIOLÓGICOS

1.1 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron: BHK-21, BSC-40 y THP-1. Las células BHK-21 (ATCC Cat Nº CCL-10) son fibroblastos de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*), en las que se describió hace varios años que MVA es capaz de realizar infecciones productivas [113], lo que permite, entre otras cosas, utilizarlas para la generación de *stocks* virales. Las células BSC-40 (ATCC Cat Nº CRL-2761) derivan de epitelio de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) y presentan una morfología epitelial. Las células THP-1 (ATCC Cat Nº TIB-202) son monocitos humanos de sangre periférica, y pueden ser diferenciados a macrófagos adherentes en presencia de determinados estímulos. Las líneas celulares BHK-21 y BSC-40 son adherentes, mientras que las THP-1 se crecen en suspensión hasta su eventual diferenciación. Todas las líneas fueron mantenidas a 37ºC en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2. En el caso de las BHK-21 y BSC-40, se utilizó como medio de cultivo 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), 0,1 mg/ml estreptomicina (GIBCO BRL) y 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor) (DMEMc 10%). Las células THP-1 se mantuvieron en RPMI-1640 (GIBCO BRL) suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml estreptomicina, 1 mM de piruvato de sodio (GIBCO BRL), 55 μM de β-mercaptoetanol (GIBCO BRL) y 10% de suero fetal bovino (RPMIc 10%). Para su mantenimiento, se realizaron pasajes en los medios de cultivo correspondientes. Las THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos adherentes (macrófagos derivados de THP-1) luego de incubar las células en presencia de 50 ηg/ml de forbol-12 miristato-13 acetato (PMA, *phorbol-12-myristate-13-acetate*, Sigma-Aldrich) durante 3 días.

Para la generación de los vectores delecionados se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEPs), generados por la Sección de Cultivo de Tejidos del Instituto de Virología del INTA Castelar. Estos cultivos primarios, se componen a partir de huevos embrionados de 10-11 días,

certificados como libres de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés *Specific Pathogen Free*), adquiridos en el Instituto Rosenbusch. Estas células son permisivas para la replicación tanto de Virus Vaccinia como de MVA. Estos cultivos son mantenidos en Medio *Earle* 199 1X (Gibco) suplementado con 2,95 mg/ml de caldo triptosa fosfato (Difco), 2,2 mg/ml de $NaHCO_3$ (ICN), 0,3 mg/ml de L-glutamina (Gibco), 50 μg/ml de gentamicina, 66 μg/ml de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina más 2 % SFB (Internegocios), antibiótico/antimicótico 1X (Gibco), 25 mM Hepes (ácido 4-(2-hidroximetil)1-piperazin-etán-sulfónico, Sigma) a 37ºC en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2.

1.2 Virus

1.2.1 Generación de los vectores MVA delecionados

Para la generación de los vectores virales delecionados MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, se utilizó la estrategia de infección-transfección descripta por *Falivene* y colaboradores [90] y *Ferrer* y colaboradores [114], basada en la técnica original de *Earl* y colaboradores [115]. A continuación, se describirán brevemente los pasos más relevantes de la técnica que son de importancia para comprender el origen y verificar la calidad de los vectores. Cabe destacar que esta parte del trabajo fue realizada enteramente por la Dra. M. Paula del Médico-Zájac, que forma parte del grupo de la Dra. Gabriela Calamante, de INTA Castelar. En la figura 12 se muestra de manera ilustrativa un esquema de la ubicación de los genes *C12L*, *A44L* y *A46R* dentro del genoma de MVA.

En primer lugar, se generó un vector intermedio que contenía las regiones flanqueantes al segmento a ser delecionado. Posteriormente, un gen reportero fue subclonado dentro de estas regiones, obteniéndose lo que se denomina vector de transferencia. Este vector es transfectado en células previamente infectadas con MVAwt o algún MVA delecionado, y de esta manera, dentro de las células se da lugar a la recombinación homóloga entre el vector de transferencia y el genoma viral, logrando el reemplazo de los genes *wild type* por un *cassete* de algún gen reportero.

Figura 12. Representación esquemática de la ubicación de los genes delecionados. Esquema del genoma de MVA donde se posicionaron de manera esquemática los genes delecionados. En rojo se indican las seis grandes deleciones que posee con respecto al genoma parental CVA (para más detalles ver figura 6 de la Introducción). El gen *C12L* se encuentra en la región izquierda, entre las deleciones I y V; mientras que el segmento *A44L-A46R* se encuentra sobre la región derecha, precisamente entre las deleciones IV y III. La dirección de las flechas indica el sentido de expresión de los genes. Esquema adaptado de *Meisinger-Henschel* y colaboradores [63]

En este trabajo, se generó en primer lugar un vector intermedio denominado pBS-A44L-A46R. Para ello, la región río arriba del gen *A44L* y la región río abajo del gen *A46R*, cuya posición nucleotídica de acuerdo al GeneBank (ID: U94848.1) es: 142215-142569 y 144651-144994 respectivamente, se amplificaron por PCR y fueron clonados en el vector pBlueScript (Stratagene). Los *primers* utilizados fueron los siguientes (Tabla 6):

Tabla 6. *Primers* utilizados para generar pBS-A44L-A46R.

Primer	Secuencia (5'-3')	Región genómica
157iF	AGAGCTCGGATAAAATCAAAATTACGGTTG	Región *upstream A44L*
157iR	AGCGGCCGCCGAACACGGAAATGGCTAGA	
159dF	CGGATCCGATGATTCGTCTACATGTTC	Región *downstream A46R*
159dR	AGAATTCGCCCACATAAATGCGTTGGAG	

Se detallan las secuencias en 5´-3' de los *primers* utilizados.

A continuación, el gen *uidA*, codificante para la enzima β-glucuronidasa (GUS) bajo el promotor poxviral H6 (disponible en el laboratorio de la Dra. Calamante) fue subclonado dentro del plásmido

pBS-A44L-A46R obteniendo así el vector de transferencia denominado pΔA44L-A46R. La identidad de todos los plásmidos fue verificada por secuenciación (Genetic Analyzer 3500 XL, Applied Biosystems). Posteriormente, cultivos de FEPs previamente infectados con el MVAwt (MVA-F6) [58] o el MVAΔC12L [90] se transfectaron con el vector de transferencia para obtener los vectores MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, respectivamente (Figura 13).

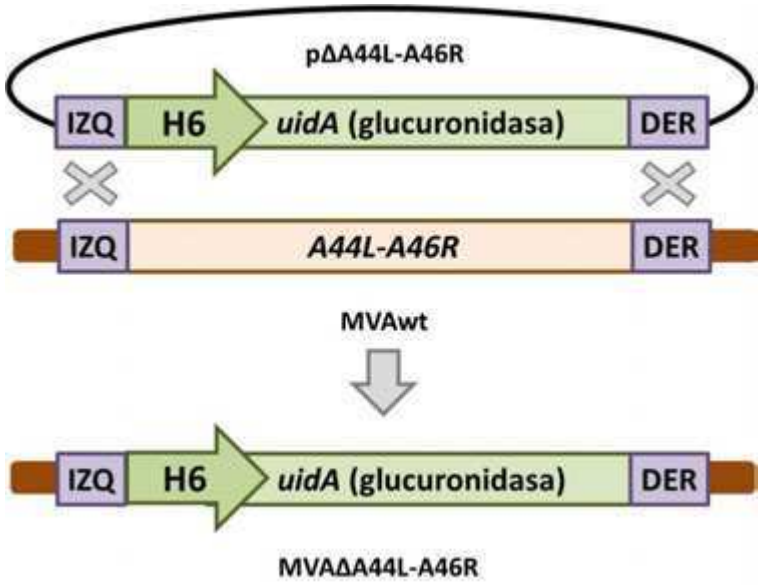

Figura 13. Generación de los MVA delecionados. Esquema representativo de la generación del MVAΔA44L-A46R mediante recombinación homóloga entre el vector de transferencia pΔA44L-A46R y el MVAwt. FEPs infectadas con el vector MVAwt fueron transfectadas con el vector de transferencia que contiene el gen reportero y los extremos flanqueantes a la región A44L-A46R, para que se lleve a cabo la recombinación. El virus recombinante producido fue seleccionado por su capacidad para producir placas de lisis de color azul en presencia del sustrato específico. Esta técnica de infección-transfección también fue utilizada para generar el vector MVAΔC12L/ΔA44L-A46R.

Los cultivos infectados-transfectados se incubaron a 37ºC con atmósfera de 5% de CO_2 hasta la aparición de efecto citopático. Cada uno de los virus recombinantes producidos se seleccionaron por su capacidad de producir placas de lisis azules en presencia del sustrato específico para la enzima GUS (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide cyclohexylammonium salt*, X-gluc, Inalco) en un cultivo agarizado. Luego de 10 ó 6 rondas de purificación, los vectores MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, resultaron libres de virus *wild-type*, respectivamente. La pureza de estos clones fue verificada a su vez por PCR utilizando *primers* específicos. Para ello, se utilizó 1 µl de ADN

copia, *buffer* correspondiente a la enzima Taq ADN polimerasa GreenGo Taq (Promega), dNTPs 200 mM, 100 ηg de *primers forward* y *reverse* correspondientes a cada gen que se deseaba amplificar y 1 unidad de enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen) en un volumen final de 12,5 µl.

De manera de confirmar la deleción de los genes *C12L*, *A44L* y *A46R* se utilizaron las siguientes estrategias. Para el caso del gen *C12L*, se utilizó un set de *primers* lindante a la secuencia completa del gen. El tamaño esperado del producto de amplificación, en caso que el gen esté presente, es de 1000 pares de bases aproximadamente. La ausencia de amplificación es un indicativo de que el gen fue reemplazado efectivamente por el *cassete* reportero que expresa la enzima β-galactosidasa (gen *LacZ*).

En el caso del segmento *A44L-A46R*, el *primer forward* hibridiza con un gen interno (gen *A45R*) y el *primer reverse* con la región lindante al gen *A46R*. El producto de amplificación esperado, si los genes están presentes, es de aproximadamente 1400 pares de bases. La ausencia de amplificación indica la inserción del gen reportero, que en este caso codifica para la enzima glucuronidasa (*uidA*).

Se utilizó además como control de amplificación el gen de la hemaglutinina (*HA*), presente en todos los casos y con un producto de amplificación de 890 pares de bases, aproximadamente.

Los *primers* utilizados se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. *Primers* utilizados para verificar la correcta deleción de los genes.

Primer	Secuencia (5'-3')	Gen
A45R-F	TAATAGACCACGATAATATC	***A44L-A46R***
A46R-r-R	AGAATTCGCCCACATAAATGCGTTGGAG	
C12L-l-F	GAATTCGTTGTTTACTCAAAACG	***C12L***
C12L-r-R	GAGCTCCTATAATGATTATATAG	
HA1	TCCCCGCGGATGACACGATTACCAATA	***HA***
HA4	GGGGTACCAGAATATTGCCACGGCCG	

Se detallan las secuencias en 5´-3' de los *primers* utilizados para amplificar las zonas lindantes a los genes delecionados, y además un par de *primers* para amplificar un gen control.

1.2.2 Análisis de la expresión de ARNm de los genes *C12L, A44L* y *A46R* en los vectores delecionados

Para llevar a cabo la caracterización molecular de los virus MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, se realizó la extracción de ARN a partir de células FEP crecidas en placas de 60 mm (p60) infectadas con MVAwt o los virus delecionados (MVAΔA44L-A46R, MVAΔC12L/ΔA44L-A46R y MVAΔC12L como control) a una multiplicidad de infección (MOI) = 1. A las 24 horas post-infección se descartó el sobrenadante y las células infectadas se cosecharon en 1 ml de Trizol (Invitrogen). Se incluyeron como control negativo células sin infectar. El ARN se guardó a -80ºC hasta su uso.

El ARN extraído fue tratado con la enzima DNAsaI (*DNAseI*, Invitrogen) para eliminar cualquier traza de ADN genómico e impedir posibles contaminaciones. Para la RT, se utilizaron hexámeros al azar como *primers* (50 ηg/μl), la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (Promega) y dNTPs (5 mM de cada uno). El ADN copia obtenido se almacenó a -20ºC hasta su utilización.

Los genes *A44L*, *A46R*, *C12L* y *TK* (*Thymidine Kinase*) fueron amplificados a partir del ADN copia generado, con los siguientes primers (Tabla 8):

Tabla 8. *Primers* utilizados para amplificar el ADN copia de cada uno de los genes.

Primer	Secuencia (5'-3')	Fragmento
159intF	CTTAAAGTAGACTCCGATTC	*A46R*
159STOP5	TTATACATCCGTTTCCCTG	
157intF	GGAAATGCTTACTTTTGCTA	*A44L*
157STOP	TTATTCTGATTCTTCTAGCC	
008L-F	ATGAAAATCCTATTTCTCATCGC	*C12L*
008L-R	CTACTTCAGCCAAATATTCT	
TK1	TCCCCGCGGTGAACGGCGGACATATTC	*TK*
TK4	GGGGTACCTTATGAGCCGACGTAACA	

Se detallan las secuencias en 5´-3' de los *primers* utilizados para la amplificación del ADN copia.

Se realizaron, además, los controles de amplificación correspondientes incluyendo un control de amplificación sobre el ARN total purificado tratado con DNAsa, excluyendo la retrotranscripción, de manera de poder verificar la ausencia de amplificación a partir de ADN genómico viral remanente. En cada amplificación además se incluyó el control negativo de amplificación (sin poner templado) para determinar la presencia de posibles contaminaciones. Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y visualizados a través de un transiluminador UV.

2. PREPARACIÓN DE LOS *STOCKS* VIRALES

2.1 Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA)

2.1.1 Infección de células

Células BHK-21 crecidas y adheridas en placa con 80% de confluencia, fueron infectadas con los distintos vectores MVA diluidos en DMEM sin suero (para permitir la adsorción de los virus) e incubadas durante una hora a 37ºC en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 para permitir la adsorción del virus. Posteriormente, se retiró el inóculo viral, se agregó DMEMc con 2% de SFB y se mantuvo el cultivo el tiempo necesario, hasta observar efecto citopático avanzado en la totalidad de la monocapa (48 a 72 horas). Finalmente, se recogieron las células infectadas en el caso de la generación de un *stock* viral (ver sección 2.1.2 "Generación de los *stocks* virales") o se fijaron con metanol:acetona, en el caso de realizar la titulación por *immunostaining* (ver sección 2.1.4 "Titulación por *immunostaining*").

2.1.2 Generación de los *stocks* virales

Los distintos vectores MVA se crecieron a gran escala infectando células BHK-21 en 20 a 25 placas de 150 mm de diámetro a baja MOI (de aproximadamente 0,1) (ver sección 2.1.1 de Materiales y

Métodos "Infección de células"). Las células infectadas se recogieron luego de 48 horas cuando se evidenció un efecto citopático casi completo, fueron resuspendidas en 9 ml de *buffer* Tris (10 mM, pH 9), y se almacenaron a -80ºC hasta su posterior purificación.

2.1.3 Purificación de los *stocks* virales para inmunizar

Cada uno de los virus fue liberado de las células BHK-21 por sonicación. Para ello, las células mantenidas en hielo fueron sometidas a un primer ciclo de sonicación que consistió en 3 pulsos de 10 segundos de sonicación y 10 segundos de descanso. Luego, se centrifugaron a 1500 rpm, a 4ºC durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante. El *pellet* resultante se resuspendió en 4 ml de buffer Tris (10 mM, pH 9) para realizar 2 ciclos más de sonicación. Una vez culminados los 3 ciclos de sonicación, se juntaron todos los sobrenadantes. Luego, se sembraron 3,5 ml de cada sobrenadante sobre 10 ml de un colchón de sacarosa 45% previamente sembrado en tubos de ultracentrífuga (Beckman Coulter). Luego de sellar los tubos, se ultracentrifugaron a 30.000 rpm, a 4ºC durante 1 hora. Finalizado esto, se retiró la sacarosa, los *pellets* de cada uno de los virus se resuspendieron en 2 ml de buffer Tris (10 mM, pH 9), se alicuotaron y guardaron a -80ºC hasta su titulación y/o utilización.

2.1.4 Titulación por *immunostaining*.

La titulación de los *stocks* virales se realizó por *immunostaining* [116]. Para esto, células BHK-21 fueron infectadas como se describió anteriormente (ver sección 2.1.1 de Materiales y Métodos "Infección de células") en placas de 6 pocillos, con diferentes diluciones, seriadas al décimo. A las 48 horas se lavaron y fijaron con una solución de metanol: acetona (1:1). Luego de un lavado con PBS se incubaron con un anticuerpo policlonal hecho en conejo, que reconoce las proteínas B5 y A33 de Vaccinia (US Biological) a una dilución 1:1000 en PBS 3% SFB (1,5 horas 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 horas 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 H_2O_2 y 0,03% de sulfato de níquel. 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:

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

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. En la figura 14 se muestra una foto de una titulación por esta técnica.

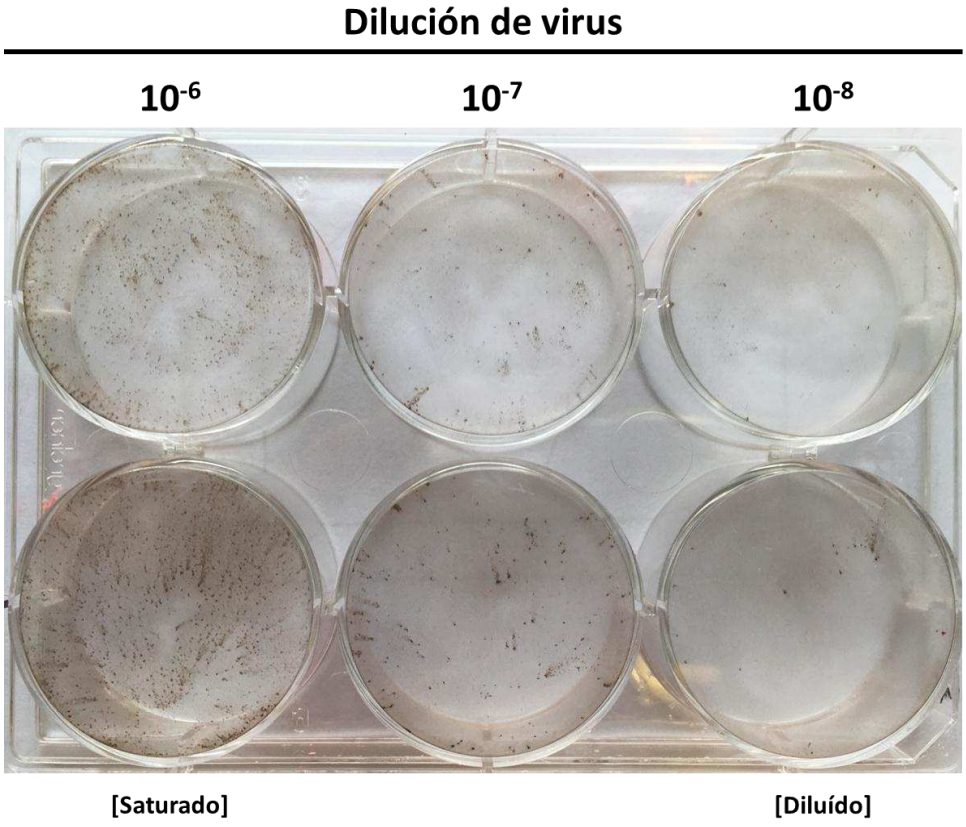

Figura 14. Imagen representativa de una titulación viral por *immunostaining*. En la figura se muestra un ejemplo de una titulación de MVA donde células BHK-21 fueron infectadas con diluciones de virus de $1x10^{-6}$, $1x10^{-7}$ y $1x10^{-8}$.

3. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO*

3.1 Evaluación de la cinética de crecimiento de los vectores MVAwt y MVA delecionados

Cultivos de células BHK-21 crecidos en placas de 6 pocillos (70-80% de confluencia) fueron infectados, en ensayos independientes, con MVAwt o los MVA delecionados a una MOI = 0,01. Luego de 60 minutos de adsorción a 37ºC, se removió el inóculo de las placas y se agregó DMEMc suplementado con 2% SFB (Natocor), para permitir el mantenimiento de las células. Las placas fueron incubadas a 37ºC en presencia de una atmósfera de 5% de CO_2 y a distintos tiempos post-infección (0, 24, 48 y 72 horas post-infección, hpi) se obtuvieron las fracciones intra y extracelular de cada uno de los virus. La fracción extracelular se obtuvo por centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos del sobrenadante de cultivo de las células infectadas, mientras que las células que quedaron adheridas en la placa fueron cosechadas en 1 ml de DMEMc y constituyeron la fracción intracelular (esta fracción se sometió a tres ciclos de congelado/descongelado a -70ºC para liberar las partículas virales intracelulares). Las fracciones intracelular y extracelular fueron tituladas en células BHK-21 por *immunostaining*. Cada tiempo se evaluó por duplicado.

3.2 Ensayos de actividad biológica

3.2.1 Ensayo funcional de IL-18 bp

Para evaluar el efecto de la ausencia de la proteína C12 (análoga a la IL-18bp) en estos nuevos vectores delecionados, se realizó el ensayo descripto previamente por *Falivene* y colaboradores [90, 91] con algunas diferencias. Brevemente, monocapas de BHK-21 cultivadas en placas de 6 pocillos, fueron infectadas con los distintos MVAs a una MOI = 10. A las 24 hpi, se recogieron los sobrenadantes correspondientes y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4ºC descartándose el *pellet*. Por último, se removieron las partículas virales por centrifugación a 17000

rpm durante 1,5 horas a 4ºC, y posterior pasaje a través de un filtro de 0,22 μm. Los sobrenadantes de BHK-21 clarificados se guardaron a -20ºC hasta su utilización.

Para evaluar la inhibición de IL-18 mediada por la IL-18bp de MVA, la IL-18 murina fue pre-incubada durante 1 hora a temperatura ambiente con los sobrenadantes clarificados equivalentes a 10^5 células BHK-21 infectadas. Esto permite que la IL-18 bp presente, o no (dependiendo del vector utilizado), en los sobrenadantes provenientes de células infectadas, pueda unirse y "secuestrar" a la IL-18r.

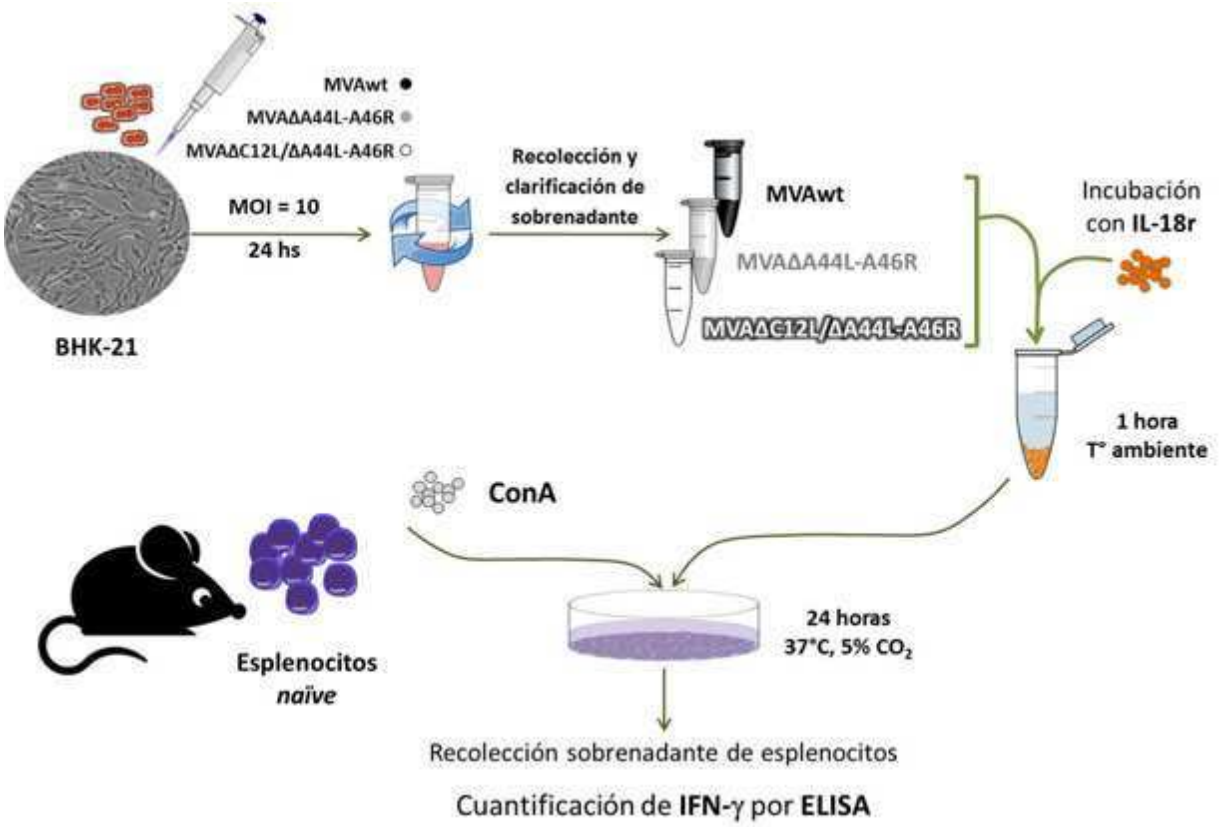

Figura 15. Ensayo biológico para *C12L*. Esquema representativo del protocolo empleado para evaluar la actividad biológica de la proteína C12 o IL-18bp. Por un lado, células BHK-21 fueron infectadas con los distintos MVAs a una MOI = 10. Luego de 24 horas, se recolectaron los sobrenadantes y se clarificaron, y estos fueron incubados con IL-18r murina. Por otro lado, esplenocitos de ratones *naïve* fueron estimulados con Concanavalina A (ConA) sola, o en combinación con IL-18r (preincubada con los sobrenadantes de células infectadas). Luego de 24 horas, se tomó el sobrenadante y se cuantificó el IFN-γ por ELISA.

Conjuntamente, se obtuvieron esplenocitos de ratones C57Bl/6 *naïve* que se cultivaron en medio RPMIc 10% SFB y se estimularon con Concanavalina A (0,2 μg/ml) sola o en combinación con IL-18 murina recombinante (10 ηg/ml, Invitrogen), previamente pre-incubada con los sobrenadantes de

células infectadas, durante 24 horas a 37ºC 5% CO_2. Como se detalló en la Introducción, cuando la IL-18 se une a su receptor, induce la producción de IFN-γ. En el caso que la IL-18 haya sido inhibida por la proteína C12, la producción de este mediador se verá disminuida. El IFN-γ producido se cuantificó mediante un kit de ELISA, siguiendo las especificaciones del fabricante (*Mouse IFN-γ Elisa Set OptEIA*, BD BioSciences). En la figura 15 se muestra un esquema representativo del protocolo empleado.

3.2.2 Actividad de la enzima 3β-HSD

Para la determinación de la actividad de la enzima codificada por el gen *A44L* (3β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa) se siguió el protocolo descripto por *Moore* & *Smith*, con algunas diferencias [110]. Este ensayo se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Andrea Bruttomesso, de la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos Aplicados a Química Orgánica (UMYMFOR), perteneciente al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Brevemente, células BSC-40 fueron infectadas con los distintos MVA a una MOI = 10. Dieciocho horas más tarde, las células fueron lavadas con PBS y se incubaron por 1 hora a 37ºC en agitación con *Buffer* A (HEPES 100 mM, Glucosa 170 mM, Sacarosa 80 mM, BSA 250 mg/ml) [110], 0,66 mM β-Nicotinamida Adenina dinucleótido (NAD, Sigma) y 4 mM 5-pregnen-3β-ol-20-ona (Sigma). Seguidamente, las células fueron permeabilizadas con saponina 1% (diluida al 50% en etanol) por 1 hora a 37ºC, la reacción se detuvo por el agregado de HCl 1,2N y cada uno de los pocillos se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Una vez realizado este proceso, se tomaron los sobrenadantes y se agregó a cada uno de ellos una cantidad conocida (0,1 ηmoles) de acetato de 5-pregnen-16-metilen-3β,17-diol-20-ona (control interno). Este control interno se utiliza para chequear la eficiencia del proceso de extracción. Dado que se agrega luego del tratamiento con HCl, las células ya no están metabólicamente activas, y no pueden metabolizar este sustrato, por lo cual se considera que la cantidad obtenida luego de la extracción, es un indicativo de qué tan eficiente logró ser el proceso.

Finalmente, luego del agregado del control interno, se realizó una extracción de esteroides con acetato de etilo. Para ello, a los sobrenadantes se les agregó 500 µl de acetato de etilo y se vortexeó vigorosamente durante 30 segundos. Se dejó reposar hasta que ambas fases se separaran, y se tomó la fase orgánica. Se repitió el proceso dos veces sobre la fase acuosa remanente, y posteriormente se juntaron las tres fases orgánicas obtenidas.

Seguidamente, se agregaron 150 mg de $NaSO_4$ por cada 1,5 ml de fracción orgánica obtenida para deshidratar la muestra, y se realizaron dos lavados con acetato de etilo. Posteriormente, el solvente fue evaporado. Los esteroides obtenidos fueron redisueltos en 1,5 ml de metanol, filtrados con filtros de HPLC, y evaporados en *speedvac*. Finalmente, las muestras liofilizadas, fueron enviadas a la ciudad de Rosario, al Servicios de Espectrometría de Masas InMet S.A. y fueron cuantificadas mediante cromatografía líquida en combinación con espectrometría de masas (LC-MS/MS, por sus siglas en inglés, *liquid chromatography–mass spectrometry*).

En la figura 16 se muestra un esquema resumido del protocolo utilizado. La principal diferencia con respecto al protocolo de *Moore* & *Smith* radica en el método de detección de la progesterona como producto final, ya que ellos se valieron de la cuantificación de progesterona marcada radiactivamente, el cual se sabe que es un método extremadamente sensible. En nuestro caso, al no utilizar marcas radiactivas, los niveles de sustrato utilizados finalmente resultaron mayores a los descriptos por estos autores, y se debió realizar una puesta a punto de la técnica para determinar la mejor condición del ensayo. Se ensayaron tres condiciones distintas de sustrato: 0,04; 0,4 y 4 mM, en cultivos sin infectar y en cultivos infectados con MVAwt, de manera de probar la mayor diferencia posible entre las dos condiciones, ya que el cultivo sin infectar no tendría la enzima A44 mientras que el cultivo infectado con MVAwt tendría la enzima aportada por el vector. Tanto en el caso de 0,4 mM de sustrato como 4 mM, se vio una diferencia entre el cultivo sin infectar y el infectado con MVAwt en cuanto a la producción de progesterona. Sin embargo, se optó por esta última condición, ya que la eficiencia de extracción fue mayor y eso se trasladó a su vez, en que los niveles de esteroides

obtenidos también fueran mayores y de esta manera quedaran dentro de los parámetros confiables brindados por las curvas de calibración realizadas por el InMET.

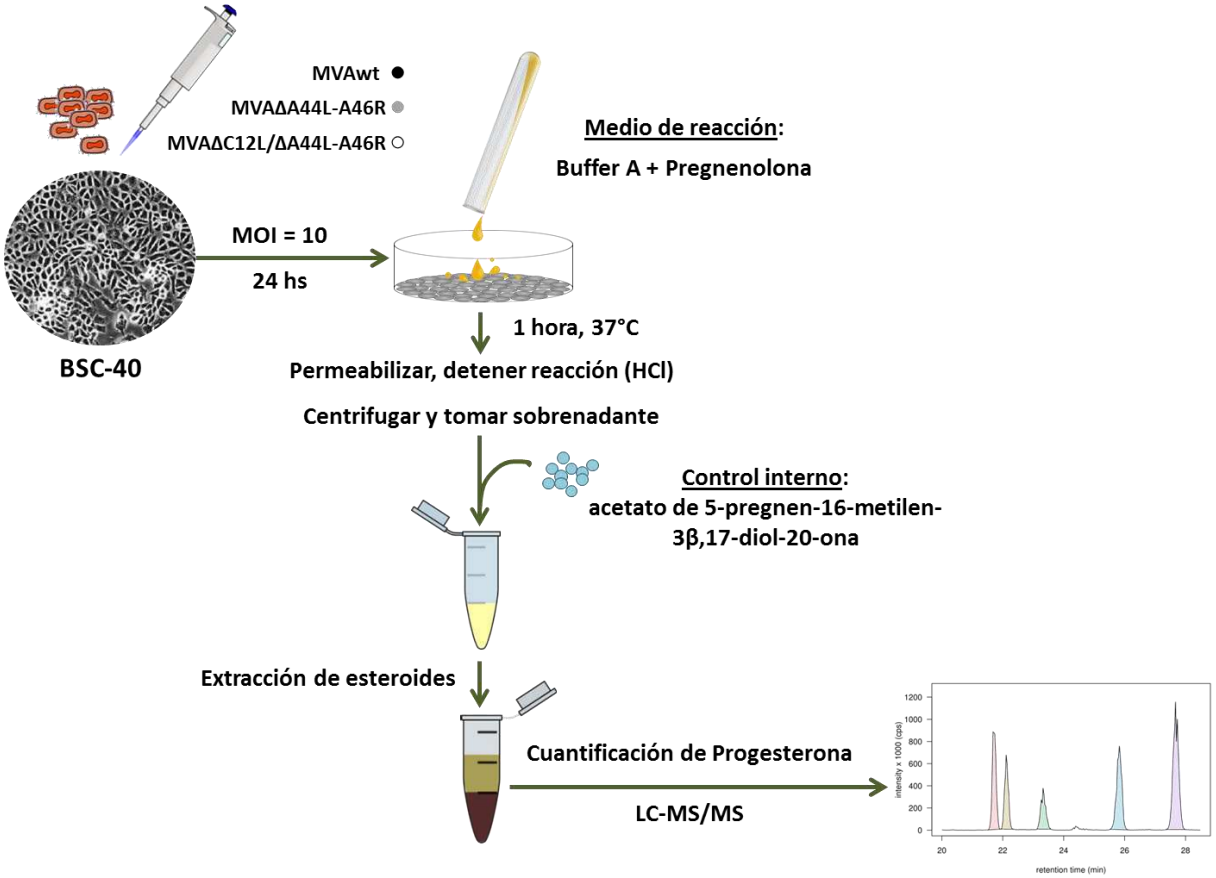

Figura 16. Ensayo biológico para *A44L*. Esquema general del protocolo realizado para evaluar la actividad biológica del producto del gen *A44L*. Células BSC-40 fueron infectadas con los distintos MVAs a una MOI = 10. Luego de 24 horas, las células fueron lavadas y se incubaron por 1 hora a 37ºC en presencia de pregnenolona, sustrato de la enzima 3β-HSD. Transcurrido el tiempo de reacción, se permeabilizaron las células, se detuvo la reacción, y se tomó el sobrenadante, al cual se le agregó una cantidad conocida de esteroide metilado (control interno). Posteriormente se extrajeron los esteroides y se cuantificó la progesterona producida por Cromatografía Líquida en combinación con Espectrometría de Masas (LC-MS/MS).

3.2.3 Infección de THP-1 y cuantificación de citoquinas producidas

Las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos adherentes como se explicó anteriormente (ver sección 1.1 de Materiales y Métodos "Líneas celulares"), y se infectaron con los distintos MVA a una MOI = 5. Como control negativo, se utilizaron células sin infectar (*mock*). A distintos tiempos post-infección, se colectaron los sobrenadantes, los cuales fueron centrifugados para eliminar cualquier resto celular, y se guardaron a -80ºC hasta su utilización. Se cuantificaron las citoquinas IL-1β, TNF-α,

IL-6, IL-8 e IL-12 mediante kits comerciales de ELISA (*Human IL-1β, IL-6, IL8 ELISA Max Deluxe*, BioLegend; *Human IL-12, TNF OptEIA ELISA Kit*, BD) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

4. INMUNIZACIONES Y MANEJO DE ANIMALES

4.1 Ratones y manejo de animales

Ratones hembra C57Bl/6 (*H-2*^{b}), libres de patógenos específicos 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).

4.2 Inmunizaciones

4.2.1 Inmunización Intramuscular

Los vectores vacunales fueron diluidos en PBS estéril de manera que cada dosis tenga un volumen final de 100 µl. Debido a que la práctica no es invasiva, los ratones no fueron anestesiados. Los vectores fueron inoculados en las patas traseras, inyectando 50 µl en el músculo aductor de cada pata, impactando en los ganglios inguinales, cercanos al sitio de inoculación. Esta ruta de inoculación es la vía utilizada más frecuentemente para administrar vectores poxvirales en ensayos clínicos, y se

prefiere antes que las vías subcutánea o intradérmica ya que minimiza las reacciones adversas asociadas a la inyección [117].

4.2.2 Inoculación intravenosa por el seno retro-orbital

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 abajo y se procedió con la inoculación por ruta intravenosa, ingresando por el seno retro-orbital, con una jeringa de tuberculina y una aguja de calibre 27G. El volumen máximo a inocular es de 100 μl por ojo (200 μl en total).

4.3 Esquema de Inmunización

Los animales fueron inmunizados por las vías indicadas previamente (según correspondiera) y se sacrificaron a los 7 días post-inmunización (dpi), en el caso de analizar la respuesta aguda adaptativa o a los 45 días, en caso de estudiar la respuesta adaptativa de memoria.

En los ensayos en los que se evaluó la respuesta inmune innata, los animales fueron inoculados y sacrificados a tiempos cortos post-inmunización, tal como se indica en los experimentos pertinentes.

4.4 Toma de muestras

Siete o 45 días luego de la inmunización, se procedió a la toma de muestras. Para ello, previamente se anestesió a los animales con una mezcla de xilacina/ketamina (inyección intraperitoneal de 100 mg de ketamina y 10 mg de xilacina/kg ratón).

Primero se obtuvo la muestra de sangre por punción cardíaca y, luego del sacrificio por dislocación cervical, se extrajeron los ganglios inguinales y el bazo.

4.4.1. Suero

La sangre de cada uno de los ratones en forma individual se mantuvo durante 4 horas a temperatura ambiente para permitir la formación del coágulo. Luego de esto, se dejó a 4ºC toda la noche. A continuación, se separó el suero y se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm para eliminar la presencia de eritrocitos. Las muestras de suero de los ratones individuales fueron guardadas a -20ºC.

4.4.2. 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 NH_4Cl 0,1 M en agua destilada, utilizando 4 ml por bazo, durante 4 minutos en hielo. Luego de 2 lavados con medio RPMI-1640 conteniendo 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (Gibco BRL), 2 mM L-glutamina (Gibco BRL), 0,01M HEPES (Gibco) y 0,055 mM β-Mercaptoetanol (Gibco) (RPMIc), con 5% SFB (Natocor) (RPMIc 5% SFB), las células fueron resuspendidas en RPMIc con 10% de SFB (RPMIc 10% SFB) y se contaron en una cámara de Neubauer con el colorante de exclusión vital azul de tripán. El rendimiento obtenido fue entre 60 y 70 millones de células por ratón.

4.4.3 Ganglios inguinales: Obtención de linfocitos

Los linfocitos de ganglios inguinales fueron aislados 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 fue entre 2,5 y 7,5 millones de células por ratón.

5. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

5.1 Estímulos para evaluar respuesta inmune

5.1.1 Péptidos

Se utilizaron los péptidos de Vaccinia previamente caracterizados como específicos de respuesta T-$CD8^+$ (Péptido B8R) [118] y $CD4^+$ específicos (E9L, H3L y L4R) [119]. El péptido B8R (TSYKFESV), es parte del gen de expresión temprana B8R que codifica para una proteína tipo receptor de IFN-γ involucrada en la modulación de la respuesta antiviral. El péptido E9L (PSVFINPISHTSYCY) corresponde al gen del mismo nombre, es de expresión temprana y codifica para la ADN polimerasa. El péptido H3L (PGVMYAFTTPLISFF) pertenece al gen H3L de expresión tardía que codifica para una proteína de unión superficial a heparina del IMV, y L4R (ISKYAGINILNVYSP) pertenece al gen del mismo nombre, de expresión tardía y que codifica para una proteína de ensamblado del *core* viral y la transcripción [119]. Los péptidos (8 a 15 aminoácidos) fueron sintetizados por la empresa JPT Peptide Technologies (Berlín, Alemania). Los péptidos liofilizados fueron resuspendidos en DMSO a 2,5 µg/µl y conservados a -20ºC hasta su uso.

5.1.2 Virus Vaccinia inactivado

Se inactivaron 500 µl de virus de la cepa *Western Reserve* (WR) mediante tratamiento con luz UV, en una placa de 60 mm (p60), por 15 min con agitación constante y a una distancia de 30 cm de la lámpara. Para determinar si la inactivación resultó efectiva, se infectaron células BSC-40 y se realizó una tinción por cristal violeta. Como control positivo se utilizó un virus WR sin inactivar.

Luego de determinar la ausencia de partículas virales infectivas, se cuantificó la cantidad de virus Vaccinia inactivado mediante absorbancia a 260 ηm y se determinó la concentración teniendo en cuenta las siguientes relaciones: $1OD_{260}$= $1.2x10^{10}$ partículas/ml y $5x10^{8}$ partículas/ml = 1 µg proteína/ml [120].

5.2 Análisis de la respuesta inmune celular

5.2.1 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 descripto previamente [121]. 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 4ºC. Las células fueron sembradas en los pocillos por duplicado o triplicado, entre 0,125 × 10^{6} a 1 x 10^{6} células por pocillo, junto con los péptidos de Vaccinia 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 suplir la proporción aportada por los péptidos (diluyente de las soluciones *stock* de los péptidos). Como control positivo se usó el estímulo inespecífico ConA en una concentración de 1 µg/ml (Sigma-Aldrich).

Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37ºC en una atmósfera de 5% CO_2 y luego se lavaron 2 veces con agua tridestilada dejando de 3 a 5 minutos cada lavado, seguidos por 3 lavados con PBS con 0,05 % de Tween-20 (PBS-T). Posteriormente se incubaron las placas durante 16 horas a 4ºC con el anticuerpo de detección conjugado a biotina (*BD ELISPOT mouse IFN-γ o IL-2 ELISPOT pair,* según correspondiera) diluido en PBS 10% SFB. Al día siguiente se lavó e incubó la placa durante 1 hora 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 H_2O_2. 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 *InmunoSpot 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-2/10^6 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. En la figura 17 se ve una foto representativa de un ensayo de ELISPOT.

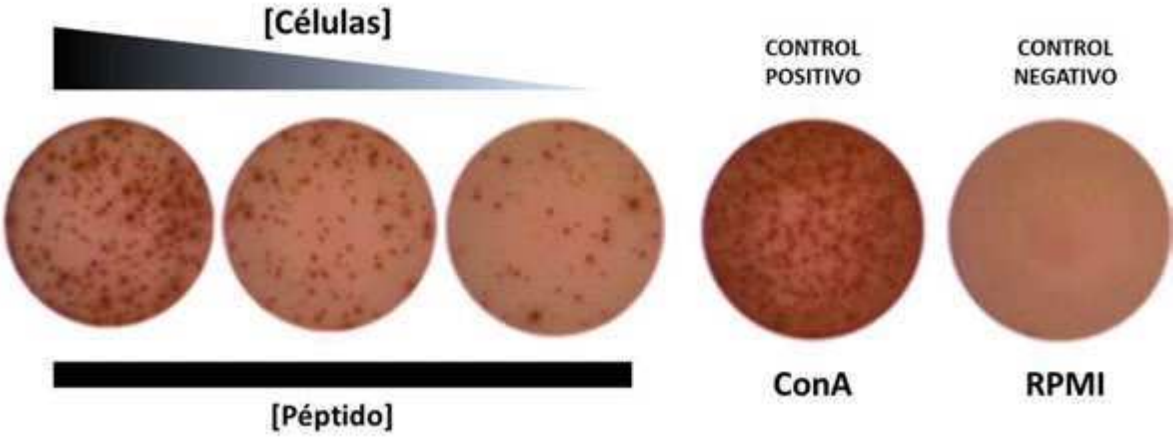

Figura 17. Imagen representativa de un ELISPOT para IFN-γ. Esplenocitos de ratón fueron sembrados en diluciones crecientes y estimulados con una concentración constante de péptido de VACV. Se indican además los pocillos para los controles positivo (estimulado con Concanavalina A) y negativo (estimulado con RPMI).

5.2.2 Cuantificación de la producción de citoquinas

Las células de ratón (células de bazo o de ganglio inguinales) fueron estimuladas en RPMIc 10% SFB en placa de 96 pocillos fondo en U por triplicado (10^6 células/pocillo) con los péptidos de Vaccinia (2 µg/ml). Para los controles positivos y negativos, se utilizaron células estimuladas con ConA (1 µg/ml), y medio RPMIc con el porcentaje de DMSO equivalente, respectivamente. Luego de 72 horas de incubación a 37ºC en 5% CO_2, se centrifugaron las placas y se recolecatron los sobrenadantes de los cultivos, los cuales fueron guardados a -80ºC.

La cuantificación de citoquinas (IL-2, IFN-γ, TNF-α) en los sobrenadantes de células se realizó mediante ELISA (*Mouse IL-2 ELISA Set, Mouse IFN-γ ELISA Set, Mouse TNF-α ELISA Set*, BD Biosciences) o mediante el kit de CBA (*Cytometric Bead Array*, BD) según se indique. El kit de CBA (Figura 18) cuantifica citoquinas de ratón pertenecientes a un perfil Th1 o Th2 (IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-5) mediante citometría de flujo, utilizando perlas o *beads* que identifican cada una de las citoquinas como una población determinada. El producto fue utilizado siguiendo las indicaciones del fabricante. La adquisición de datos se realizó en el citómetro de flujo (FACS Canto, BD). Para ambas técnicas, se consideró 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.

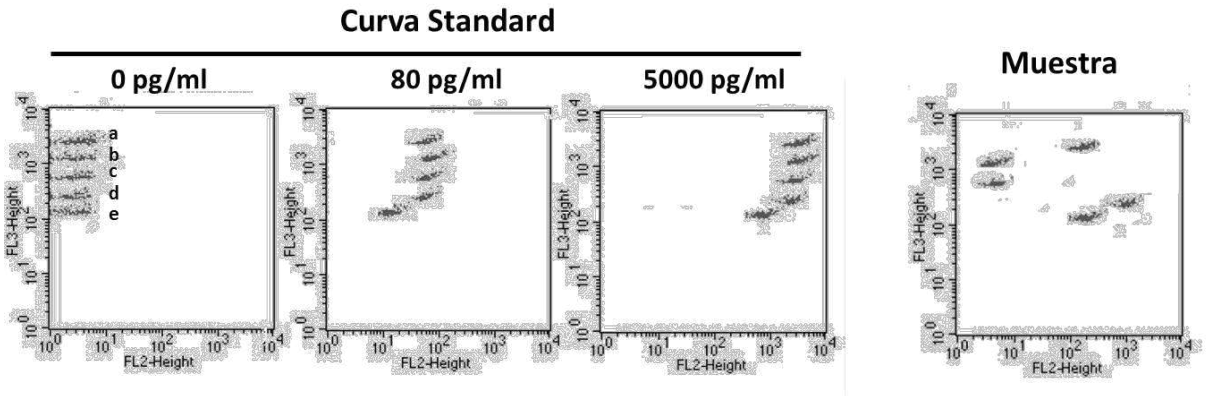

Figura 18. Cuantificación de citoquinas por CBA kit. Se cuantificaron las citoquinas IL-2 (a), IL-4 (b), IL-5 (c), IFN-γ (d) y TNF-α (e), la identidad de las citoquinas se define por su intensidad de fluorescencia en el canal de APC (FL3), y la intensidad de fluorescencia en PE (FL2) es proporcional a la cantidad de citoquina. Se realiza una curva estándar que cubre un rango de 0 a 5000 pg/ml. En el panel derecho se muestra un ejemplo de una muestra cuantificada por este método.

5.2.3 Ensayo simultáneo de marcación intracelular de citoquinas y actividad citotóxica

Células de ratón provenientes de bazo fueron estimuladas con el péptido B8R o con VACV inactivado en una concentración de 4 μg/ml y 2,5 μg/ml respectivamente, durante 5 horas en una placa de 96 pocillos fondo en U (10^6 células/pocillo) a 37ºC en 5% de CO_2 en presencia del anticuerpo co-estimulatorio anti-CD28 (1 ηg/ml; BD Pharmingen), los inhibidores del tráfico intravesicular brefeldina A (1 μl/ml, *GolgiPlug*, BD) y monensina (0,7 μl/ml, *GolgiStop*, BD) y además, con los

anticuerpos monoclonales anti-CD107a y anti-CD107b, ambos conjugados a FITC (CD107a/b-FITC; BD Pharmingen), fueron agregados en los experimentos indicados. Los controles negativos y positivos, consistieron en células estimuladas con RPMIc + 0,08% DMSO, o PMA/ionomicina (10 ηg/ml PMA + 250 ηg/ml ionomicina, Sigma-Aldrich) respectivamente. Luego, las células fueron lavadas e incubadas durante 30 minutos a 4ºC con los anticuerpos de superficie: CD3-APC y CD8-PerCP (BD Pharmingen) y con un colorante para distinguir las células vivas y 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 utilizó el anticuerpo anti-IFN-γ-PE (BD, Pharmingen) incubando durante 30 minutos a 4ºC en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, y mantenidas a 4ºC hasta la adquisición de datos en el citómetro de flujo (FACSCanto, BD).

El análisis de los datos fue realizado con el programa BD FACSDiva 3.0. El ajuste de los valores de voltaje del instrumento y la compensación de fluorescencia fueron realizados cada vez que se realizaba un experimento, utilizando células sin marcar y con marcas simples de superficie. A su vez, los controles de isotipo correspondientes fueron incluidos en cada experimento. En la figura 19 se muestra la estrategia de *gating* general utilizada.

5.2.4 Evaluación de proliferación celular específica mediante tinción con CFSE

Se siguió la metodología descripta anteriormente por *Quaj* y colaboradores [122]. Esplenocitos de cada grupo de ratones fueron resuspendidos en PBS con 1% de SFB a una concentración final de 40 x 10^6 células/ml. Las células fueron teñidas con 1,25 µM de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (Invitrogen, USA) a 37ºC durante 8 minutos. La reacción fue detenida con el agregado de SFB, en un volumen equivalente al volumen en el que se encontraban las células con el CFSE.

Posteriormente, las células fueron lavadas con RPMIc y se resuspendieron en RPMIc 10% SFB a una densidad de 5 × 10^6/ml. Los esplenocitos ya teñidos con la sonda, se cultivaron en una placa de 12 pocillos (10^7 células por pocillo) durante 4 días a 37ºC en una atmósfera de 5% de CO_2 y estimuladas con 4 µg/ml de péptido o 2,5 µg/ml de VACV inactivado, o en ausencia de estímulo (RPMIc 10%, control negativo). Células estimuladas con ConA fueron utilizadas como control positivo. Luego de los 4 días de estimulación, los linfocitos fueron recogidos de la placa, contados y lavados con RPMIc para posteriormente marcarlos con anticuerpos de superficie (CD3-APC y CD8-PerCP o CD4-PerCP). Las células viables fueron identificadas con el colorante *Live*/*Dead*.

Las células fueron adquiridas en el citómetro de flujo (FACSCanto, BD), y se analizaron los datos con el software BD FACS Diva 3.0. el porcentaje de células que proliferaron se calculó en base a aquellos esplenocitos que presentaban una baja marca de CFSE (Figura 19).

5.2.5 Caracterización de las poblaciones celulares T de memoria

Las células previamente marcadas con CFSE, luego de 4 días de estimulación (ver sección 5.2.4 de Materiales y Métodos) fueron recogidas de la placa, contadas y lavadas con RPMIc. Como se explicó en la sección anterior, se separaron 10^6 células para marcar con anticuerpos de superficie anti-CD3-APC, CD8-PerCP o CD4-PerCP; pero además se evaluaron marcadores de memoria, para lo cual se marcaron además con: CD44-PE-Cy7 y CD62L-APC (BD, Pharmingen). Conjuntamente, se agregó el marcador de viabilidad *Live/Dead* (Figura 19). Las células fueron incubadas con los anticuerpos durante 30 minutos a 4ºC. Finalmente, se lavaron con PBS y se mantuvieron a 4ºC hasta la adquisición de datos en el citómetro de flujo (FACS Canto, BD). El análisis de los datos fue realizado con el programa BD FACSDiva 3.0.

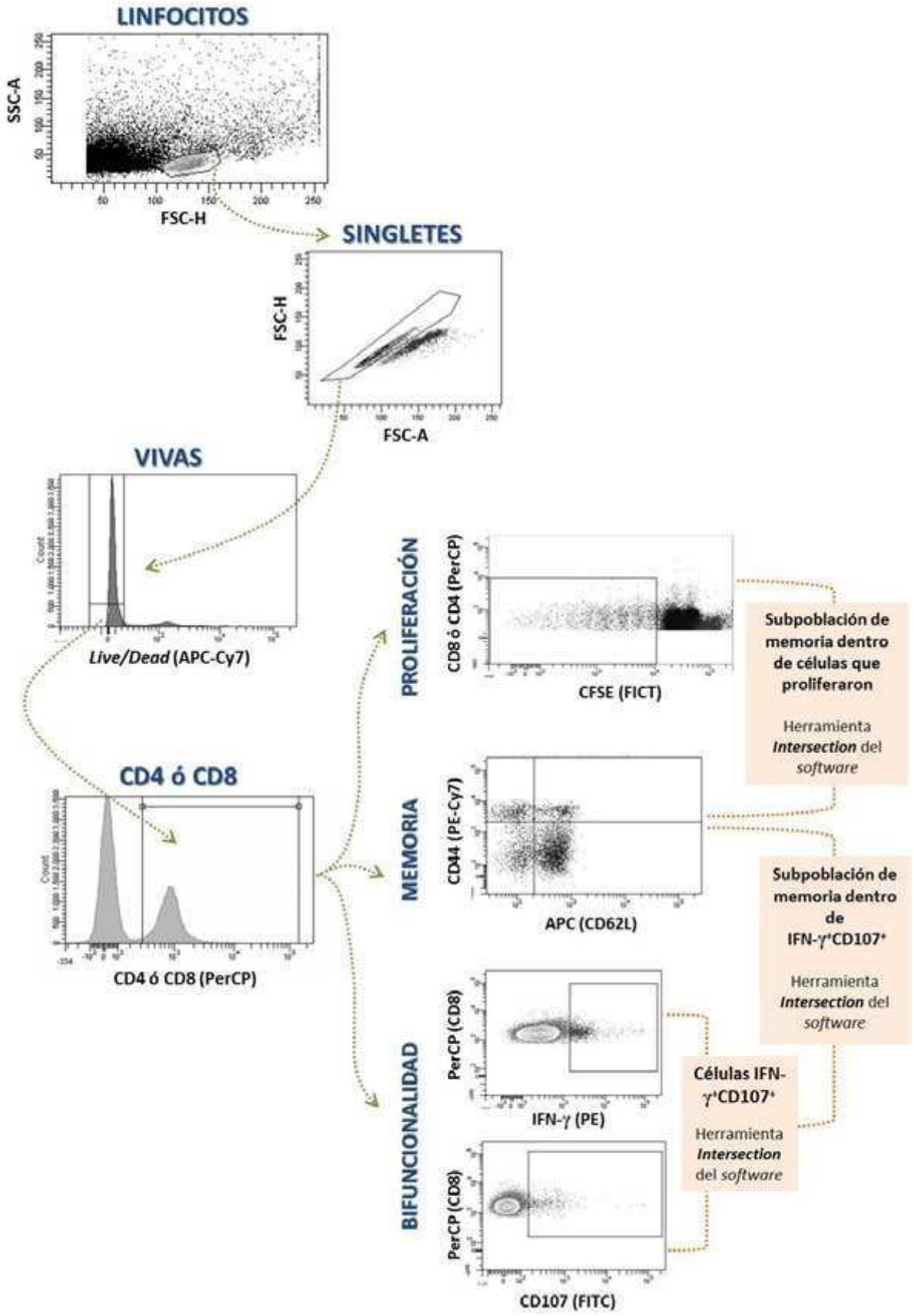

Figura 19. Estrategia de *gating* general. (Leyenda en la siguiente página)

Figura 19. Estrategia de *gating* general. Se esquematiza de manera representativa la estrategia de *gating* utilizada. En primera medida se seleccionan por FSC y SSC los linfocitos, luego se eliminan los dobletes, y posteriormente se seleccionan las células vivas por tinción con *Live/Dead*. Luego se escogen los linfocitos T-$CD4^+$ o $CD8^+$ (según el anticuerpo que se haya utilizado). Tanto en $CD4^+$ como $CD8^+$ se determina la población de memoria (con los marcadores CD44 y CD62L) y la proliferación (marcación con CFSE). Solo en la población $CD8^+$ se realiza la marcación para IFN-γ y CD107. Posteriormente, utilizando la herramienta "*Intersection*" que brinda el *software* se obtienen las células $CD107^+$IFN-γ^+, como también el análisis de las subpoblaciones de memoria dentro de las células bifuncionales, y dentro de las células que proliferaron. (Figura en la página anterior).

5.3 Cuantificación de inmunoglobulinas en suero

La presencia de anticuerpos específicos contra VACV en suero se determinó mediante ELISA tal como se describió en el trabajo de *Ramírez* y colaboradores [123]. Para ello, placas de ELISA de 96 pocillos (*ELISA Plates Microlon High Binding, GREINER*) se incubaron con VACV inactivado a una concentración final de 5 µg/ml, en *buffer* carbonato pH= 9,5 a 4ºC durante toda la noche, para permitir el pegado de los antígenos a las placas. Posteriormente, se lavaron los pocillos con PBS más 0,05% de Tween (PBS-T), y se realizó un bloqueo por 1 hora a 37ºC con PBS más 10% de SFB (Solución de bloqueo). Transcurrido este tiempo, se lavaron nuevamente los pocillos, se agregaron los sueros provenientes de los ratones, diluidos en solución de bloqueo y se incubaron las placas a 37ºC por 2 horas. Seguidamente se lavaron los pocillos (3 veces) y se agregó el anticuerpo de detección correspondiente diluido en solución de bloqueo (1/4000): anti IgG de ratón (Jackson Immuno Research, Baltimore), anti IgG1 y anti IgG2a (Santa Cruz Biotechnology, Dallas), todos hechos en cabra y conjugados a la enzima peroxidasa. Se realizó una incubación a 37ºC por 1 hora, se lavaron 3 veces los pocillos y se agregó el sustrato TMB de la enzima peroxidasa por 5 minutos (Sigma-Aldrich). La reacción se detuvo por el agregado de H_2SO_4 2N, y se midió la absorbancia a 450 ηm en un lector de placas de ELISA (Labsystems, Chicago, Illinois).

5.4 Evaluación de citotoxicidad

5.4.1 *In vivo*

El ensayo de citotoxidad *in vivo* fue realizado como previamente se describió en el trabajo de *Maeto* y colaboradores [124], con algunas modificaciones. Por un lado, grupos de 4 ratones hembra SPF de la cepa C57Bl/6 fueron inoculados con el virus MVAwt, MVA∆C12L/∆A44L-A46R o sin infectar (grupo *naïve*). A los 7 días post-inoculación, una mezcla de esplenocitos de ratones *naïve* fueron resuspendidos a una concentración de $40x10^6$ células/ml en PBS 1% SFB. Luego fueron divididos en dos poblaciones (de igual cantidad de células) que se tiñeron con dos concentraciones finales diferentes de CFSE (Invitrogen, USA): 1 µM ($CFSE_{bajo}$) y 8 µM ($CFSE_{alto}$). La marcación se realizó a 37ºC durante 8 minutos en oscuridad y fue detenida con igual volumen de SFB. Luego de lavar con RPMIc 10% SFB, las células $CFSE_{alto}$ fueron pulsadas con el péptido B8R en una concentración final de 5 µg/ml durante 30 minutos a 37ºC. Posteriormente se realizaron 3 lavados, se juntaron las células de cada población: $CFSE_{bajo}$ y $CFSE_{alto}$, y $20x10^6$ células fueron inyectadas por ruta intravenosa en el seno retro-orbital en los diferentes grupos de ratones: *naïve*, MVAwt y MVA∆C12L/∆A44L-A46R (ver sección 4.2.2 de Materiales y Métodos "Inoculación intravenosa por el seno retro-orbital") . A las 16 horas luego de la inyección, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los bazos, los cuales fueron procesados para obtener los esplenocitos (tal como se describió en la sección 4.4.2 de Materiales y Métodos "Bazos: obtención de esplenocitos") y se analizaron por citometría de flujo de forma individual. El porcentaje de citotoxicidad *in vivo* fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 100 \times \left[1 - \left(\frac{\text{Relación } \textit{naïve}}{\text{Relación Inmune}} \right) \right]$$

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

5.4.2 *In vitro*

El ensayo de citotoxicidad *in vitro* fue realizado acorde al protocolo descripto por *Nakagawa* y colaboradores, con algunas modificaciones [125].

Grupos de 3 ratones hembra SPF de la cepa C57Bl/6 de 6-8 semanas fueron inoculados por vía intramuscular con $2x10^7$UFP de MVAwt o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, a los 7 dpi fueron sacrificados y se les extrajeron los bazos, los cuales fueron procesados por métodos de rutina, como se explicó anteriormente (ver sección 4.4.2 de Materiales y Métodos). Los esplenocitos provenientes de estos grupos constituyeron la población de células "efectoras".

Por otro lado, esplenocitos de ratones *naïve* de la misma cepa (población de células blanco), fueron resuspendidos a una concentración de $4x10^7$ células/ml en PBS 1% SFB y posteriormente se separaron en dos poblaciones para marcar con diferentes concentraciones de CFSE (Invitrogen): 1 μM ($CFSE_{bajo}$) y 8 μM ($CFSE_{alto}$). La marcación se realizó a 37ºC durante 8 minutos en oscuridad y fue detenida con igual volumen de SFB. Luego de lavar con RPMIc 10% SFB, las células $CFSE_{alto}$ fueron pulsadas con el péptido B8R en una concentración final de 5 μg/ml durante 30 minutos a 37ºC. Luego de realizar 3 lavados con RPMIc, las células de cada población ($CFSE_{bajo}$ y $CFSE_{alto}$) se resuspendieron a una concentración final de $5x10^5$ células/ml.

Seguidamente, se co-incubaron las células blanco ($CFSE_{bajo}$ o $CFSE_{alto}$, por separado) con las células efectoras por 4 h a 37ºC, abarcando un amplio rango de relación células efectoras: células blanco. La cantidad de células target permaneció fija ($5x10^4$ células/pocillo), mientras que la cantidad de células efectoras varió desde $2,5x10^4$ células/pocillo a $5x10^5$ células/pocillo. De esta manera las relaciones de células efectoras: blanco ensayadas fueron: 0,5:1; 1:1; 2:1; 4:1 y 10:1.

Una vez transcurridas las 4 horas, se agruparon las células $CFSE_{alto}$ y $CFSE_{bajo}$ correspondientes a cada relación ensayada, se realizó un lavado con PBS y se adquirieron las células en el citómetro FACSCanto (BD, Biosciences).

El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ lisis} = \frac{[\#\text{ células blanco pulsadas}]_{\text{Control}} - [\#\text{ células blanco pulsadas}]_{\text{Citotox}}}{[\#\text{ células blanco pulsadas}]_{\text{Muestra Control}}}$$

Donde "Control" hace referencia a células blanco incubadas en ausencia de células "efectoras", mientras que "Citotox", se refiere a células blanco incubadas en presencia de células "efectoras".

6. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INNATA

6.1 Esquema de inmunización y obtención de muestras

Grupos de cuatro a seis ratones hembra SPF de la cepa C57Bl/6 fueron inmunizados por vía intramuscular con $2x10^7$ UFP de los vectores MVAwt o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, inoculando 50 µl por pata (músculo tibial) en ambas patas traseras (100 µl de inóculo total). Se realizaron diferentes experimentos en los que en su totalidad se evaluaron distintos tiempos tempranos post-inmunización: 4, 6, 16, 20 horas y 30 hpi en los que se obtuvieron las muestras (ganglios inguinales y sangre) por métodos de rutina. Para el caso de ganglios inguinales, los mismos fueron congelados inmediatamente luego de su extracción en un baño de nitrógeno líquido, o en una atmósfera generada por la combinación de etanol y hielo seco, y posteriormente almacenados a -80ºC. Esto se realizó principalmente para preservar el ARN en el caso de aquellas muestras que se utilizarían con este fin.

Cada uno de los tiempos fue evaluado al menos dos veces, y las muestras de ganglios obtenidas se destinaron ya sea para cuantificación de citoquinas o expresión de ARN mensajero (ver siguiente sección). En base a los resultados que se obtuvieron en estas determinaciones, y luego de un análisis preliminar, en algunos casos los tiempos evaluados fueron agrupados en un mismo grupo. Para los

análisis realizados en homogenato de ganglio, se agruparon los tiempos de 4 y 6 horas; y en el caso de los análisis en suero, los tiempos de 4 y 6 horas, y 16 y 20 horas.

6.2 Procesamiento de muestras y cuantificación de mediadores

6.2.1 Muestras para determinaciones proteicas

La obtención del suero se realizó como se explicó anteriormente (ver sección 4.4.1 de Materiales y Métodos). Cada par de ganglios inguinales (correspondiente a cada ratón) fue procesado con un homogeneizador (UltraTurrax, IKA) por 15 segundos, en PBS con Inhibidor de proteasas más EDTA (Pierce) e inmediatamente transferidos a hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, para precipitar todos los restos celulares. Los sobrenadantes obtenidos fueron almacenados a -80ºC hasta su utilización. Las citoquinas IFN-γ, IL-12, IL-1β, TNF-α, IL-10 e IL-6 fueron cuantificadas por kits comerciales de ELISA (ELISA para detectar IFN-γ, IL-12, IL-1β, TNF-α, IL-10 e IL-6 de ratón, BD Pharmigen).

6.2.2 Muestras para determinaciones de ARN

La extracción de ARN se realizó utilizando TRIzol en combinación con un kit comercial de extracción de ARN (*Pure Link RNA Mini Kit*, Ambion), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

El ARN obtenido, se cuantificó por absorbancia a 260 ηm (Multiskan GO microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher), y también se evaluó la calidad mediante las mediciones a 280 y 320 ηm.

Posteriormente, 5 µg de RNA total, se trataron con la desoxirribonucleasa *DNAseI* (Promega) para eliminar cualquier resto de contaminación con ADN. Seguidamente, el ARN se retrotranscribió con la enzima M-MLV (Promega), utilizando *random primers* (oligonucleótidos de secuencia al azar) de

manera de cubrir un amplio rango de secuencias y obtener un ADN copia altamente representativo. Finalmente, se realizó una PCR cuantitativa de las muestras, utilizando *primers* específicos para los ARNm de IFN-β y de β-actina (gen de expresión constitutiva o *housekeeping*), y SYBR Select Master Mix (Life Technologies). El ciclo de amplificación consistió en un paso de desnaturalización a 95ºC por 15 segundos y un paso de *annealing*/extensión a 60ºC por 1 minuto, repetido por 40 ciclos. El ciclado se realizó en un equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Los primers utilizados fueron los siguientes (Tabla 9):

Tabla 9. *Primers* utilizados para amplificar el ADN copia de cada uno de los genes.

Primer	Secuencia (5'-3')	Gen
IFN-β F	GCACTGGGTGGAATGAGACT	**IFN-β**
IFN-β R	AGTGGAGAGCAGTTGAGGACA	
β-actin F	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT	**β-actina**
β-actin R	AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA	

Se detallan las secuencias de los *primers* utilizados para realizar la PCR cuantitativa de IFN-β y β-actina.

Para corroborar que luego de la reacción se estaba obteniendo solamente un producto de PCR, y que además este producto era del tamaño esperado, como también para verificar la ausencia de contaminación, se realizó una corrida electroforética de los amplicones obtenidos luego de la reacción de amplificación.

En la figura 20 se puede ver que en los controles negativos NTC (por sus siglas en inglés *Non Template Control*) donde no se agrega templado, no hay amplificación, demostrando la ausencia de productos contaminantes en las reacciones. Y en las calles correspondientes a β-actina e IFN-β se visualiza solo una banda, indicando la amplificación de solo un producto de PCR, y de los tamaños esperados (78 y 134 pares de bases, respectivamente).

Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado. La expresión de IFN-β fue normalizada a la expresión de β-actina, expresada en unidades arbitrarias (U.A.) y a su vez, cada uno de los grupos fue relativizado al grupo sin infectar o *naïve*. El cálculo de los valores relativos de expresión se realizó mediante el Método de la Curva Standard [126].

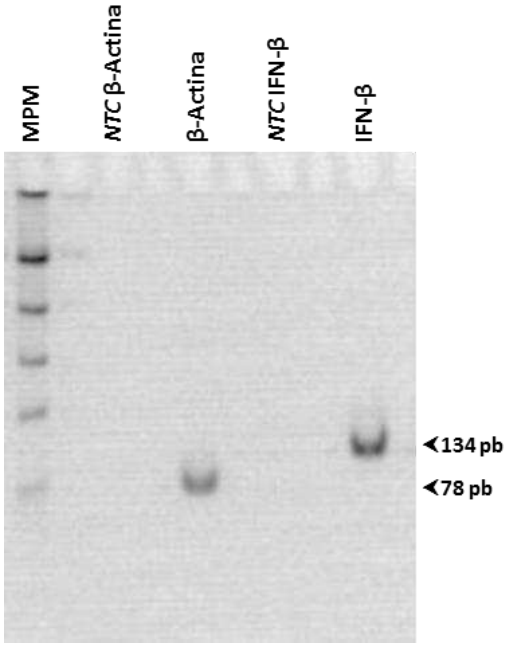

Figura 20. Corrida electroforética de productos de PCR cuantitativa. Se corrieron los productos de PCR en un gel de poliacrilamida al 8% para verificar la ausencia de contaminación, como el tamaño y singularidad de los productos. MPM: Marcador de Peso Molecular, NTC: control negativo sin templado (NTC: *Non Template Control*).

7. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los análisis estadísticos para comparar la respuesta entre grupos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 5. Se emplearon pruebas estadísticas paramétricas (ANOVA de una o dos vías con la corrección de Bonferroni para realizar comparaciones múltiples) 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.

IV. RESULTADOS

No tengo talentos especiales, pero sí soy profundamente curioso.

- Albert Einstein
[En una carta a Carl Seelig, 1952]

1. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LOS VECTORES MVA LUEGO DE LA DELECIÓN DE LOS GENES *A44L, A46R Y C12L*

1.1 Estudios moleculares

La remoción de los genes *A44L*, *A46R* y *C12L* del genoma de MVA fue confirmada en primera instancia por PCR específica a partir del genoma de MVA como molde, tal como se detalló en la sección 1.2.1 de Materiales y Métodos ("Generación de los vectores MVA delecionados"). Para confirmar la deleción del gen *C12L* del genoma de MVA, se diseñaron *primers* que alinearon por fuera de la región del gen. Teniendo en cuenta la estrategia utilizada para la deleción, si el gen está presente el producto de PCR obtenido es de 1000 pares de bases, mientras que, cuando el gen se encuentra interrumpido por el *casette* del gen reportero, no se obtiene producto de amplificación (ausencia de banda). Como se ve en el panel izquierdo de la figura 21, en las calles donde se sembró la amplificación a partir de MVAΔC12L y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R no hay banda de amplificación, mientras que en las calles donde se sembró MVAwt y MVAΔA44L-A46R, los cuales sí poseen el gen *C12L*, se observa la banda de aproximadamente 1000 pares de bases.

De la misma manera, para determinar la presencia del segmento *A44L-A46R*, se utilizó un par de *primers* que alinearon uno sobre el gen *A45R* y otro por fuera del gen *A46R*. En este caso, teniendo en cuenta que para el diseño de este vector delecionado, se reemplazó el fragmento completo por un gen reportero, si el reemplazo resultó exitoso, el *primer forward* no puede pegarse al gen *A45R* y no se observa amplificación. Esto se puede evidenciar en el panel central de la figura 21, donde las calles MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R no poseen banda de amplificación, mientras que en el MVAwt se puede ver la banda correspondiente al fragmento de amplificación. Como control de PCR se utilizó el gen viral *HA*, el cual se puede observar que está presente en todas las muestras de ADN utilizadas (Figura 21, panel derecho).

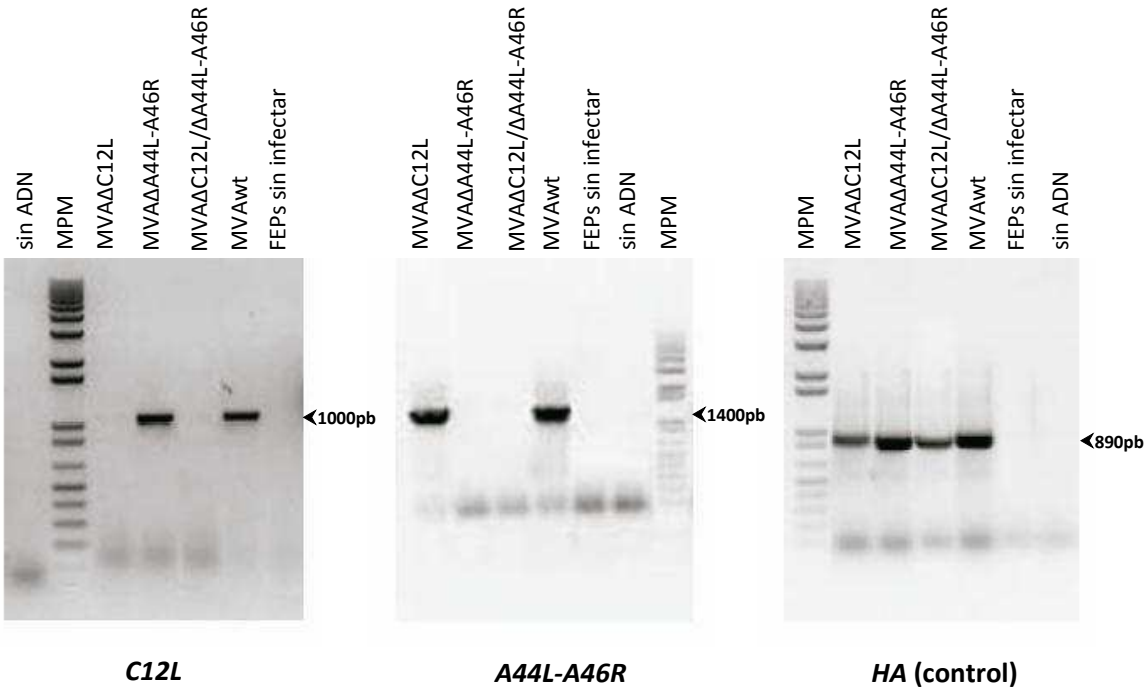

Figura 21. Verificación por PCR de la eliminación de los genes *C12L*, *A44L* y *A46R* del genoma de MVA. Se realizó una PCR a partir ADN genómico de MVA, con *primers* específicos diseñados especialmente para determinar la presencia/ausencia de los genes seleccionados. Se utilizó como control el gen de la hemaglutinina (*HA*). MPM: Marcador de Peso Molecular, FEP: fibroblastos de embrión de pollo.

Luego de haber comprobado la ausencia de los genes delecionados del genoma de los diferentes MVAs, el siguiente paso fue verificar la ausencia de la expresión de ARN mensajero (ARNm) de los diferentes genes. Para ello, se realizó una RT-PCR a partir de ARN extraído de FEPs infectadas con el virus parental o salvaje (MVAwt) o los delecionados (MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R). Los *primers* utilizados se especifican en la sección de Materiales y Métodos correspondiente (ver sección 1.2.2 "Análisis de la expresión de ARNm de los genes *C12L*, *A44L* y *A46R* en los vectores delecionados").

La figura 22 muestra la amplificación de los ARNm correspondientes a *A44L* (arriba izquierda) de 318 pares de bases y *A46R* (arriba derecha) de 321 pares de bases, los cuales solo están presentes en las células infectadas con el MVAwt. La amplificación del ARNm de *C12L* (abajo izquierda) de 363 pares de bases fue efectiva en células infectadas con el MVAwt y con el MVAΔA44L-A46R, pero no aquellas células infectadas con el MVAΔC12L/ΔA44L-A46R. En todos los casos se utilizó, como control positivo

de amplificación de ARN viral, el gen de Timidina Quinasa (*Thymidine Kinase*, *TK*), presente tanto en el MVAwt como en los vectores delecionados (Figura 22, abajo derecha), confirmando de esta manera que la ausencia de banda se debió efectivamente a la ausencia de expresión por parte del gen en los casos correspondientes.

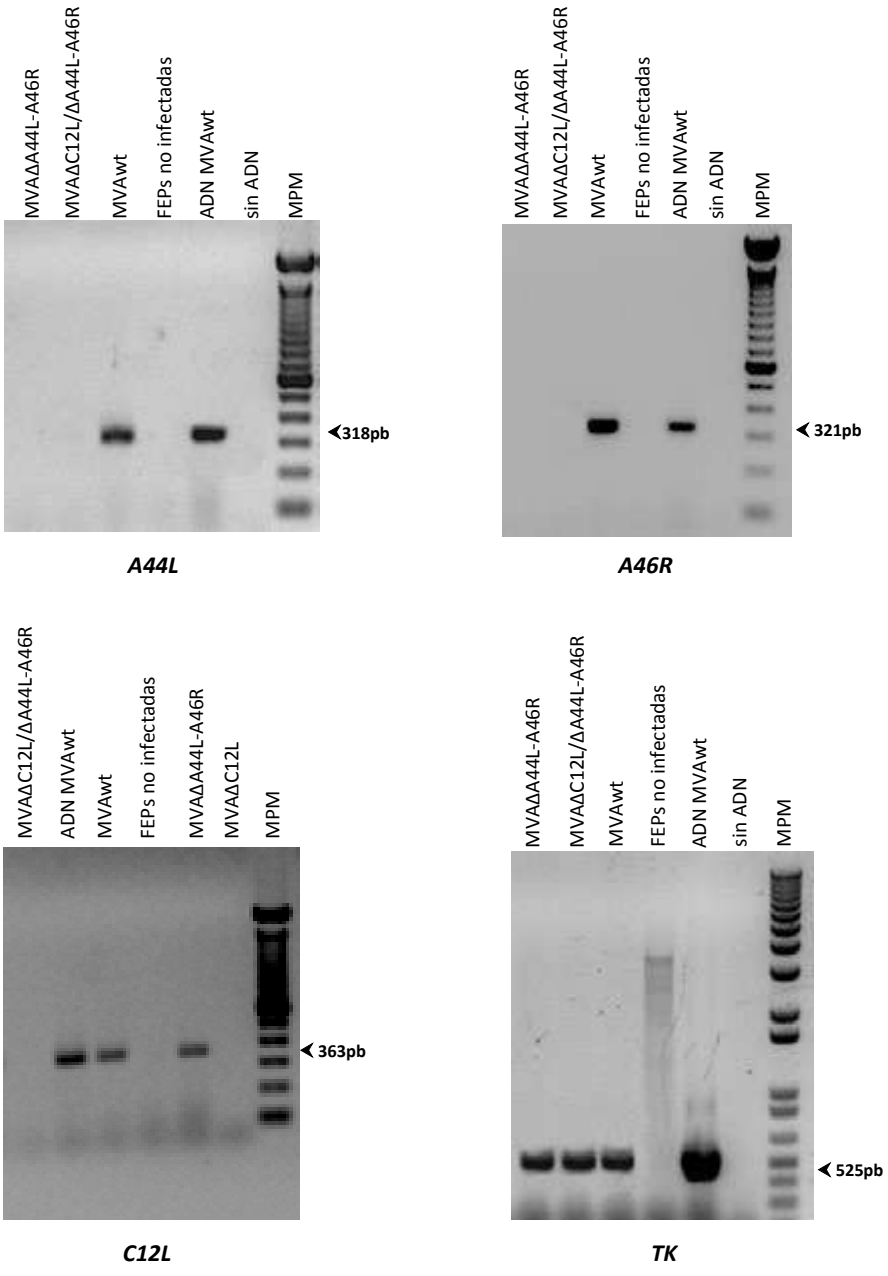

Figura 22. Verificación por RT-PCR de la ausencia de expresión de los genes *C12L*, *A44L* y *A46R*. Se realizó una RT-PCR a partir ADNc de cultivos celulares infectados con los distintos MVA. Como control se utilizó el gen de la Timidina Quinasa (*TK*). MPM: Marcador de Peso Molecular, FEPs: fibroblastos de embrión de pollo.

1.2 Estudios virológicos

Una vez realizada la caracterización molecular, en la cual se corroboró que la falta de expresión a nivel de ARNm de los genes *A44L*, *A46R* y *C12L* en los vectores delecionados, se debía efectivamente a la ausencia de dichos genes se decidió estudiar las características replicativas de los vectores delecionados en relación al MVAwt.

De acuerdo a la bibliografía previa, y conforme a lo descripto en la sección de Introducción (Sección 5.2.1 "Gen *A46R*" y 5.2.2 "Gen *A44L*"), los genes delecionados en este caso no se relacionan con la capacidad infectiva y/o replicativa del virus al menos en la cepa replicativa de VACV *Western Reserve* (WR) en donde fueron caracterizados inicialmente. Sin embargo, se decidió corroborar que esto efectivamente se cumplía cuando las deleciones se encuentran en el genoma de MVA, y que la ausencia de estos genes no comprometía ninguna de estas capacidades del virus.

Con el fin de analizar la cinética de replicación de los nuevos vectores MVA delecionados, se infectaron a baja multiplicidad de infección (MOI) células BHK-21, permisivas para MVA, con los distintos virus. A lo largo de 72 horas luego de la infección, específicamente cada 24 horas, se levantaron las células infectadas y los sobrenadantes correspondientes a cada condición, y se tituló por *immunostaining* el virus extracelular (correspondiente a la fracción "sobrenadante") y el intracelular (fracción celular) (ver sección 2.1.4 de Materiales y Métodos "Titulación por *immunostaining*").

Como se puede ver en la figura 23, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cinética de crecimiento tanto intracelular como extracelular, de los vectores delecionados en relación al MVAwt. De esta manera, se concluyó que los genes delecionados *A44L, A46R* y *C12L* no son esenciales para la replicación de MVA en células en cultivo, incluso si son delecionados de manera simultánea como es el caso del segmento *A44L-A46R*.

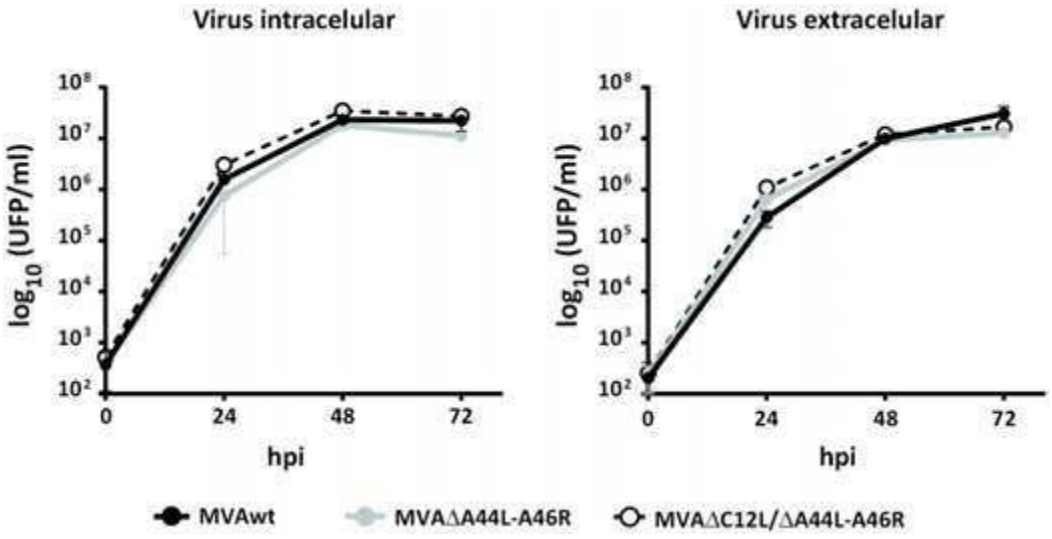

Figura 23. Curvas de crecimiento intracelular y extracelular de los distintos virus. Células BHK-21 fueron infectadas (MOI = 0,01) con el MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○). A distintos tiempos post-infección (horas post-infección, hpi), se recogieron las células (fracción intracelular) y el sobrenadante (fracción extracelular), y se tituló el virus presente mediante *immunostaining*. ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni.

Dada la importancia que poseen las células presentadoras de antígeno en la generación de la respuesta inmune en cuanto a las vías de presentación antigénica y en función de ello, el montaje de una respuesta celular, se analizó de manera cualitativa la capacidad de los distintos MVA de infectar este tipo de células. Para ello, células THP-1 correspondientes a una línea celular monocítica humana fueron diferenciadas a macrófagos adherentes e infectadas con los diferentes vectores utilizando una MOI = 5. A las 18 horas post-infección, se realizó una marcación para evaluar la presencia del virus por inmunofluorescencia, con un anticuerpo policlonal que reconoce las proteínas A33 y B5, ambas de expresión temprana/intermedia. Conforme a la figura 24, se puede observar de manera cualitativa que los tres vectores (MVAwt, MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R) son capaces de infectar células presentadoras de antígeno, ya que en los tres casos se visualiza una distribución uniforme de los focos de infección o fábricas virales donde se lleva a cabo el ciclo replicativo y ensamblaje del virus [127], sin hallar diferencias entre los MVA delecionados y el MVAwt.

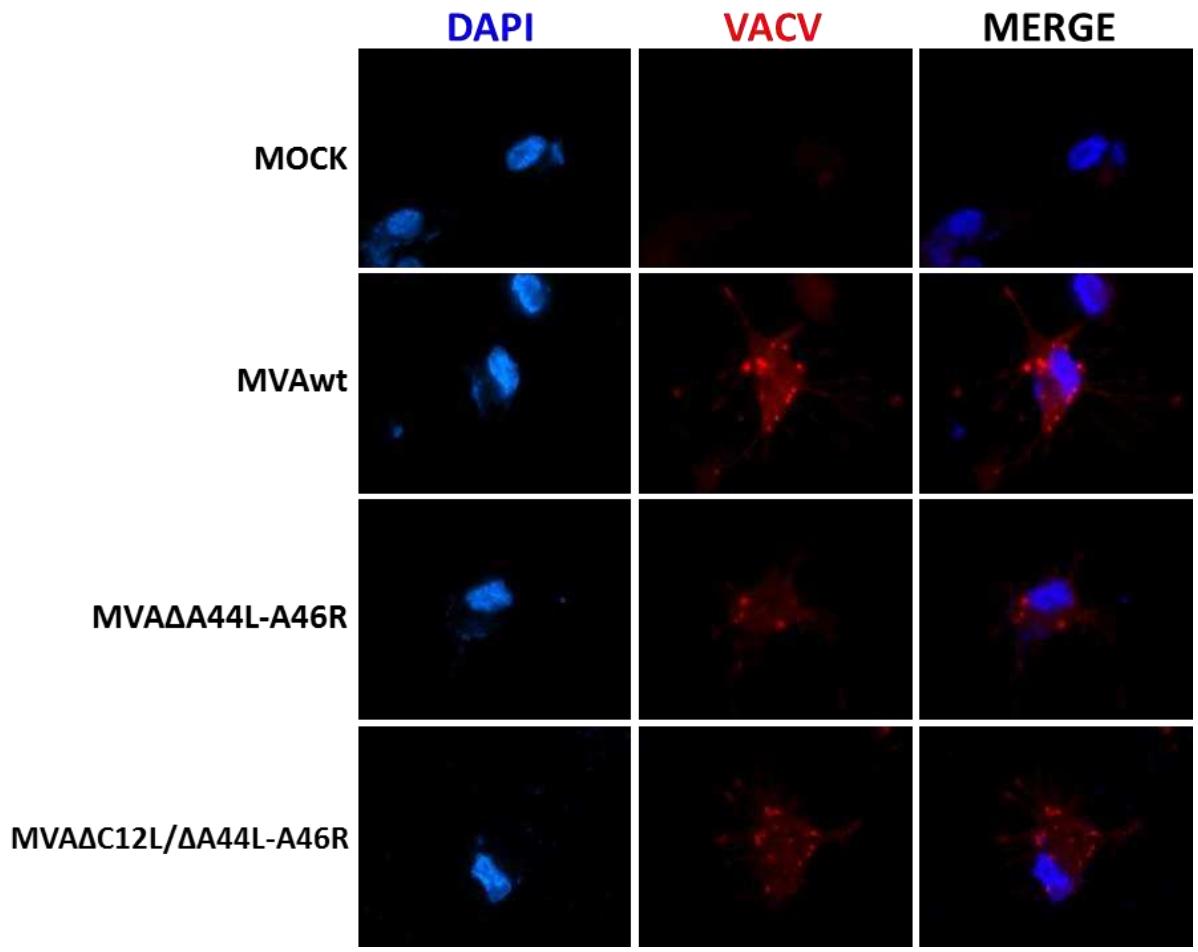

Figura 24. Inmunofluorescencia de células THP-1 infectadas con los distintos MVA. Células THP-1 sin infectar o infectadas con MVAwt, MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R se tiñeron con un anticuerpo primario policlonal anti A33 y B5 (hecho en conejo), y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa 488. Las proteínas virales se visualizan en rojo formando focos, y el núcleo de las células en azul por tinción con DAPI.

1.3 Estudios funcionales: análisis *in vitro* de la ausencia de los genes seleccionados

Luego de confirmar la ausencia de expresión de los genes virales *C12L*, *A44L* y *A46R* (a nivel de ADN y ARN mensajero), y de comprobar que no eran esenciales para la replicación de MVA, se estudió el impacto biológico que estas deleciones pudieran tener en células infectadas con los distintos virus. Para ello, se realizaron ensayos funcionales caracterizando el efecto producido por la presencia/ausencia de los mismos.

1.3.1 Gen *C12L*

En un trabajo previo de nuestro grupo, la Dra. Falivene caracterizó la deleción del gen *C12L* del genoma de MVA. Tal como se describió en la Introducción de este trabajo de tesis (ver sección 5.2 "Optimización de vectores vacunales: deleción de genes inmunomoduladores"), se sabe que la proteína de unión a IL-18, secuestra a la citoquina homónima impidiéndole la unión al receptor y bloqueando de esta manera la activación río abajo de cascadas de señalización pro-inflamatorias.

En el trabajo de *Falivene* y colaboradores [90], se analizó la capacidad de la proteína C12 de inhibir la actividad biológica de la IL-18 murina, utilizando sobrenadantes de células infectadas con MVAwt o MVAΔC12L. Teniendo este trabajo como antecedente, se estudió el efecto biológico de la ausencia del gen *C12L*, pero en este caso en el contexto de la deleción conjunta con el segmento *A44L-A46R*, como así también la presencia de este gen, en el vector MVAΔA44L-A46R.

Para llevar a cabo este objetivo, se trataron esplenocitos de ratones C57Bl/6 *naïve* con Concanavalina A (ConA, mitógeno inespecífico de linfocitos T) o ConA en combinación con IL-18 recombinante (IL-18r, ConA+IL-18r), todo esto en presencia de sobrenadantes de células BHK-21 infectadas con los distintos MVAs, tal como se explicó en la sección de Materiales y Métodos (sección 3.2.1 "Ensayo funcional de IL-18bp"). Veinticuatro horas más tarde se cuantificó el IFN-γ en los sobrenadantes de los esplenocitos en cultivo, como medida de la activación de la vía pro-inflamatoria por parte de IL-18.

Se encontraron niveles significativamente más altos de IFN-γ en los cultivos activados con ConA+IL-18r, en presencia de sobrenadantes de BHK-21 infectadas con MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, en comparación a aquellos que fueron incubados con sobrenadantes de MVAwt o MVAΔA44L-A46R (Figura 25). Esto sugiere que la proteína de unión a IL-18 (IL-18bp), producto del gen *C12L*, estaba ausente en los cultivos infectados con MVAΔC12L/ΔA44L-A46R.

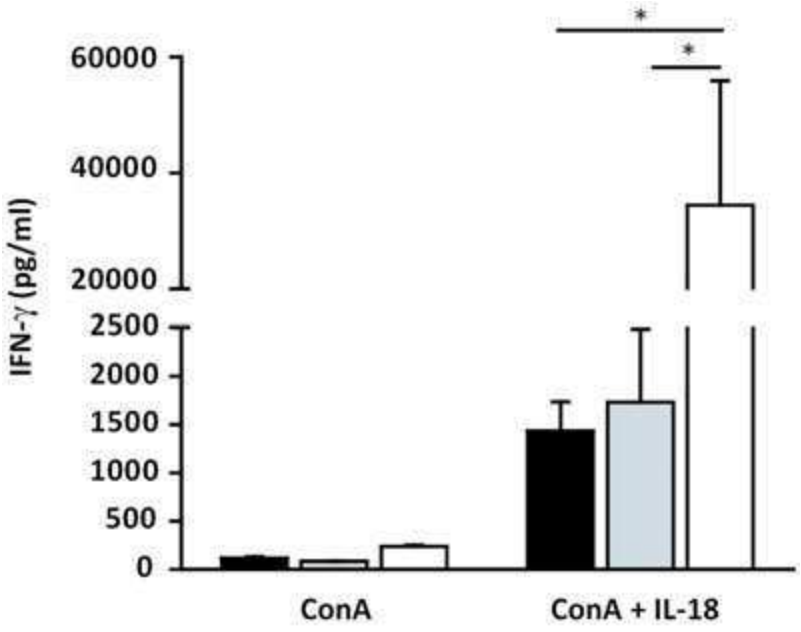

Figura 25. Ensayo de actividad biológica del gen *C12L*. Mediante ELISA se cuantificó el IFN-γ producido por esplenocitos incubados por 24 horas con los estímulos indicados: concanavalina A (ConA) o Concanavalina A más IL-18 recombinante (ConA + IL-18), previamente incubada con los sobrenadantes provenientes de BHK-21 infectadas con los diferentes MVAs: MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●), MVAΔC12L/ΔA44L-A46Rs (○). Los resultados están representados como la media + el desvío estándar. ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: *p<0,05.

1.3.2 Gen *A44L*

El producto del gen *A44L* es una enzima con un 31% de similitud con la 3β-HSD humana, relacionada con la síntesis de hormonas esteroideas [104-106]. En particular, esta enzima está involucrada en la generación de progesterona a partir de pregnenolona. De esta manera, el siguiente objetivo consistió en cuantificar la producción de esta hormona en un modelo *in vitro*, como medida de la presencia/ausencia del producto codificado por el gen *A44L*. Para realizar este ensayo, se infectaron células BSC-40 con los diferentes virus, y luego de permitir la expresión del gen en cuestión, se llevó a cabo la reacción enzimática en presencia de pregnenolona, tal como se describió en Materiales y Métodos (sección 3.2.2 "Actividad de la enzima 3β-HSD").

En la figura 26 se puede ver claramente que las células que fueron infectadas con el MVAwt, capaces de sintetizar la enzima 3β-HSD, alcanzaron niveles de progesterona superiores a aquellas infectadas con los vectores MVAΔA44L-A46R o MVAΔC12L/ΔA44L-A46Rs, cuya producción fue similar a la de las

células no-infectadas (las cuales no poseían el gen *A44L*). Esto demuestra que la capacidad de sintetizar progesterona ya no estaba presente en los vectores delecionados.

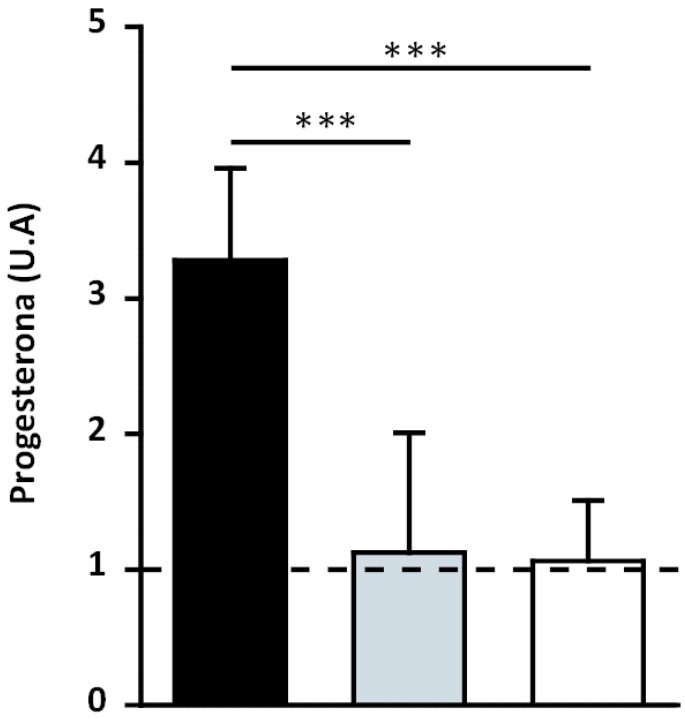

Figura 26. Ensayo de actividad biológica del gen *A44L*. Se infectaron BSC-40 con los distintos MVA: MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●), MVAΔC12L/ΔA44L-A46Rs (○). Luego de 18 horas post-infección, se agregó pregnenolona (sustrato de la enzima 3β-HSD) y se dejó que transcurriera la reacción enzimática, hasta obtener el producto y cuantificar el producto final, siguiendo los pasos detallados en Materiales y Métodos. Los esteroides fueron cuantificados por LC-MS/MS. La progesterona se relativizó al control de extracción interno, y se expresó en unidades arbitrarias (U.A.). Los valores obtenidos para cada grupo fueron relativizados a su vez a las células sin infectar (línea punteada). Los resultados están representados como la media + el desvío estándar. Test de Mann-Whitney. Diferencias estadísticamente significativas: ***p<0,001.

1.3.3 Gen *A46R*

Para poder evaluar la presencia/ausencia de actividad biológica mediada por la proteína A46 se utilizaron células THP-1 infectadas con los distintos vectores. Como se detalló en la Introducción, la proteína A46 bloquea la activación de receptores tipo Toll [96], que derivan finalmente en la activación de numerosas vías pro-inflamatorias. Estas vías llevan a la producción de diversos mediadores pro-inflamatorios. En estudios previos en los que se caracterizó la función de esta

proteína, describieron a la IL-1β como uno de los marcadores más significativos asociados a la funcionalidad de la proteína A46 de VACV [96].

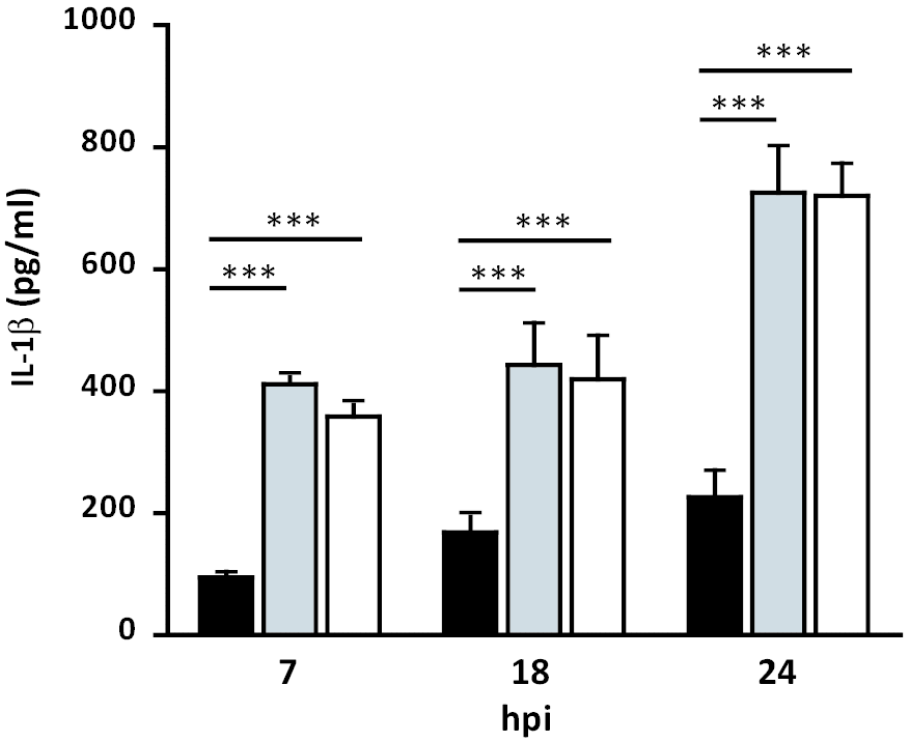

Figura 27. Ensayo de actividad biológica del gen *A46R*. Se infectaron células THP-1 con los diferentes MVAs: MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (◉) y MVAΔC12L/ΔA44L-A46Rs (○). A distintas horas post-infección (hpi, indicadas en la figura), se tomó el sobrenadante de cada condición y se cuantificó por ELISA la IL-1β producida por las células. El valor obtenido para células sin infectar fue restado en todos los casos. Los resultados están representados como la media + el desvío estándar de duplicados. ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: *** p<0,001.

Para evaluar la actividad de A46, células THP-1 crecidas en placas de 24 pocillos se infectaron a una MOI = 5, y a distintos tiempos post-infección, se cuantificaron los niveles de IL-1β en el sobrenadante de cultivo. En las células infectadas con MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, se encontraron niveles de IL-1β superiores a aquellas células infectadas con MVAwt, indicando que la inhibición de las vías de TLR en células infectadas con los MVA delecionados no fue efectiva debido a la ausencia de la proteína A46 (Figura 27).

Asimismo, se determinaron otros mediadores pro-inflamatorios que también aumentan su expresión luego de la activación de estas vías de señalización, la cual podría verse afectada por la

presencia/ausencia de la proteína A46, como IL-12, IL-6, IL-8 y TNF-α. En el caso de IL-12, los valores quedaron muy por debajo del límite de detección de la técnica utilizada, lo cual impidió cuantificar esta citoquina. Para el caso de IL-6 e IL-8, a pesar de encontrar valores que estaban contemplados dentro de la curva del método, se observó que los valores de las células sin infectar eran de la misma magnitud que las infectadas tanto con MVAwt como con los delecionados, e incluso en algunos casos superaban este valor. En este contexto, no se puede concluir que exista una modulación de la expresión de IL-6 o IL-8 mediada por la infección viral. En un trabajo publicado por *Park* y colaboradores [128] analizan en forma detallada la diferenciación de la línea monocítica THP-1 a macrófagos adherentes y establecen que a altas concentraciones de PMA la expresión de algunos mediadores se ve aumentada, como el caso de IL-8. En base a esto se puede suponer que tanto para el caso de IL-6 como de IL-8, la mera diferenciación de las células inducida por la activación con PMA podría explicar este aumento en estas citoquinas, que de alguna manera estaría enmascarando el efecto producido por los distintos MVAs.

Finalmente, en lo que respecta a TNF-α, sí logramos encontrar una cinética de modulación, pero en este caso solo pudo ser visible para el vector MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, como se puede ver en la figura 28.

Bowie y colaboradores [98] describieron que el producto del gen *A46R* expresado en células de mamífero interfiere específicamente con la vía de señalización de IL-1. Estimularon células transfectadas con A46, con IL-1 o TNF-α y midieron la activación/inhibición de una u otra vía mediante la activación de NF-κβ. Mientras que para la vía estimulada por IL-1 hallaron un efecto inhibitorio marginal por parte de A46 en la activación de NF-κβ, no observaron dicho efecto inhibitorio para el caso de TNF-α concordante con el hecho que esta citoquina activa vías de señalización distintas de IL-1 que no requieren de MyD88. En este contexto, y considerando los mecanismos autócrinos y parácrinos descriptos para la producción de IL-1 [129] como para TNF-α [130] en macrófagos, esta aparente discrepancia en cuanto a los resultados podría ser debida a la

presencia de mínimas cantidades de TNF-α en el cultivo que generarían una regulación positiva (no inhibida por A46) con incrementos indistinguibles entre MVAwt y MVAΔA46R.

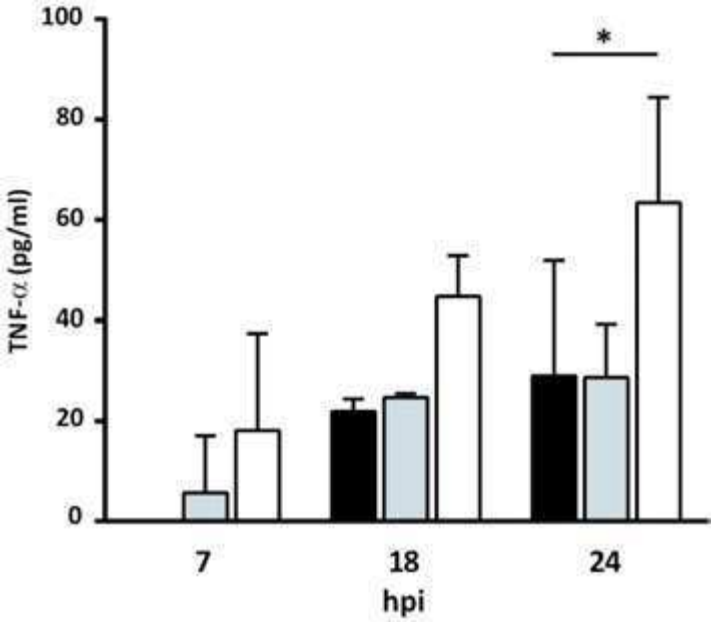

Figura 28. Cuantificación de TNF-α en sobrenadantes de THP-1. Se infectaron células THP-1 con los diferentes MVAs: MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) y MVAΔC12L/ΔA44L-A46Rs (○). A distintas horas post-infección (hpi, indicadas en la figura), se tomó el sobrenadante de cada condición y se cuantificó por ELISA el TNF-α producido por las células. El valor obtenido para células sin infectar fue restado en todos los casos. Los resultados están representados como la media + el desvío estándar de duplicados. ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: * p<0,05.

Los resultados más relevantes de esta primera sección demuestran que ambos vectores delecionados (MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R) poseen la misma capacidad replicativa que el virus parental. Por otro lado, además de corroborar la deleción de los genes *C12L*, *A44L* y *A46R* a nivel genómico y transcripcional se comprobó mediante ensayos *in vitro* que la función biológica de los genes delecionados estuvo ausente al menos, en los modelos estudiados.

2. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA *IN VIVO*: MODULACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR T ESPECÍFICA POR LOS VECTORES MVAΔA44L-A46R Y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R

2.1 Respuesta inmune adaptativa en etapa aguda

Una vez realizada la caracterización *in vitro* de los vectores, se estudió el efecto sobre el potencial inmunogénico de los vectores causado por la deleción de los genes inmunomoduladores seleccionados. Para ello, se realizaron estudios *in vivo* en ratones hembra C57Bl/6. Se inmunizaron grupos de cuatro ratones por vía intramuscular (im) con 10^7 UFP de los distintos vectores MVA y a los 7 días post-inoculación (dpi) se estudió la respuesta celular aguda generada evaluándola frente a péptidos específicos de VACV. Además, para cada uno de los grupos se emplearon los correspondientes controles positivo (estimulación con Concanavalina A) y negativo (estimulación con RPMIc). Se observó que ambos vectores delecionados generaron una mayor respuesta celular T en comparación al MVAwt, evaluada por ELISPOT en función del número de células T específicas secretoras de IFN-γ, frente a péptidos caracterizados previamente como de respuesta $CD4^+$ (L4R)[119] ($p<0,01$) como así también de respuesta $CD8^+$ (B8R) [118] ($p<0,001$) (Figura 29.A).

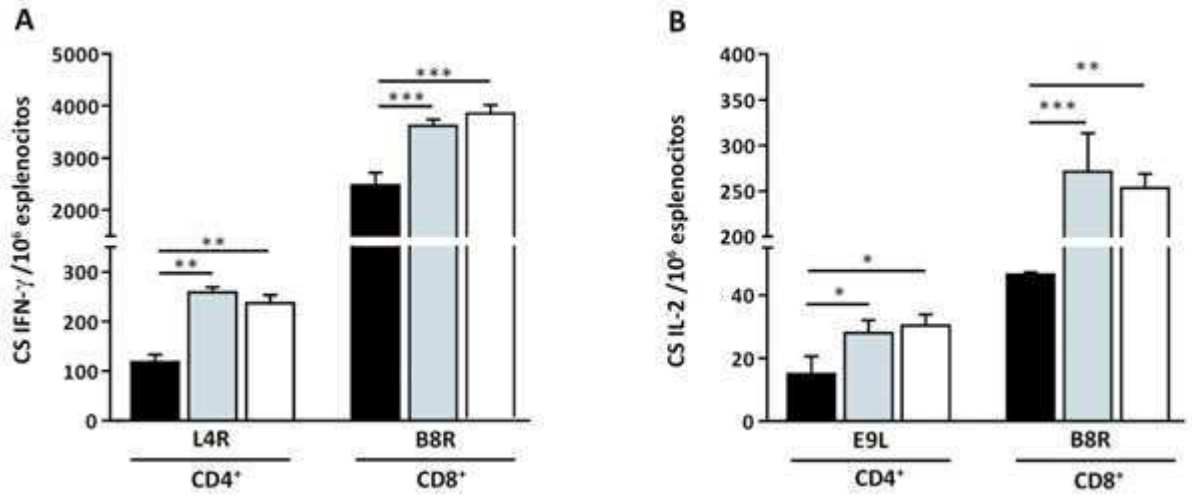

Figura 29. Análisis de la respuesta celular T en etapa aguda. Se cuantificaron por ELISPOT las células secretoras (CS) de IFN-γ (A) e IL-2 (B) en esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○), re-estimulados con los péptidos indicados. Los resultados están representados como la media + el desvío estándar de triplicados. ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: *p<0,05, ** p< 0,01 y *** p< 0,001. Resultados representativos de un total de 3 experimentos realizados.

En concordancia con estos resultados observamos una mayor cantidad de células secretoras de IL-2 cuando fueron estimuladas con los péptidos E9L ($p<0,05$ en el caso de ambos vectores delecionados

cuando se lo comparó en relación al MVAwt) y B8R (considerando una diferencia significativa con un $p<0,001$ al comparar MVAΔA44L-A46R versus MVAwt y de $p<0,01$ en el caso del MVAΔC12L/ΔA44L-A46R versus MVAwt) (Figura 29.B).

Por otro lado, se analizó la producción de citoquinas en sobrenadantes de esplenocitos provenientes de los diferentes grupos de ratones luego de una estimulación de 72 horas con los péptidos de VACV, siguiendo la metodología descripta en Materiales y Métodos (ver sección 5.2.2 "Cuantificación de producción de citoquinas"). Como se puede ver en la figura 30 (panel izquierdo), los esplenocitos de ratones inmunizados con MVAΔA44L-A46R o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R produjeron entre 1,5 y 2 veces más IFN-γ que el MVAwt ($p<0,05$ y $p<0,01$ respectivamente).

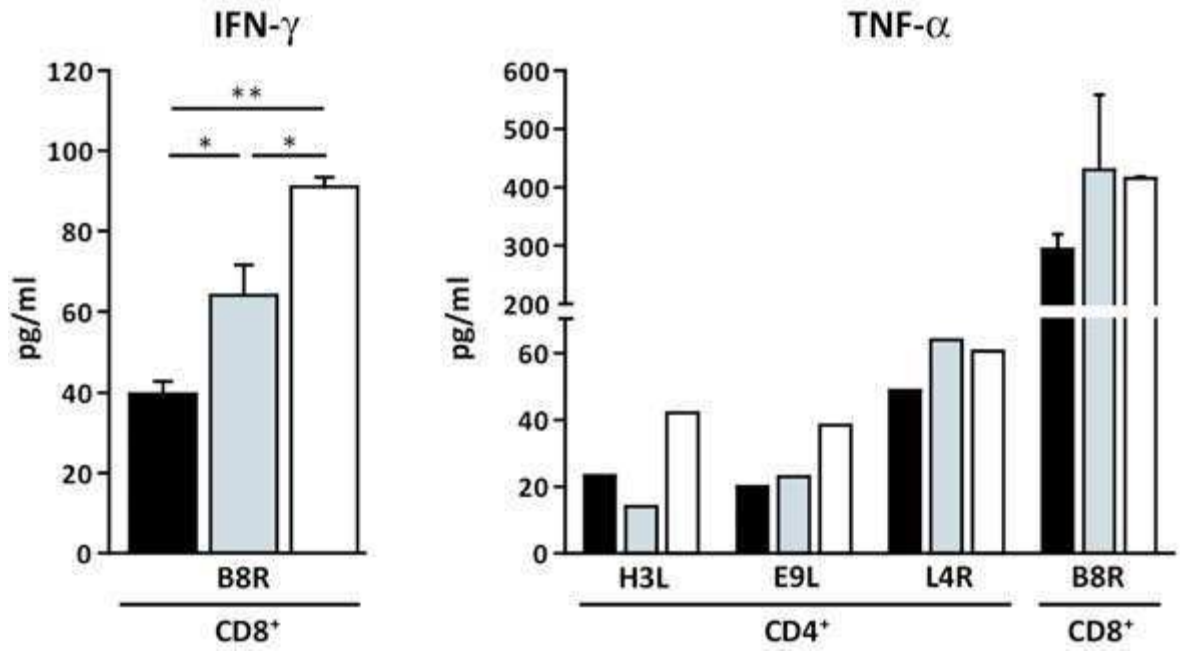

Figura 30. Cuantificación de mediadores solubles en etapa aguda. Esplenocitos provenientes de los distintos grupos de inmunización: MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○), fueron re-estimulados con los péptidos indicados por 72 horas y se cuantificaron las citoquinas: IFN-γ y TNF-α en sobrenadantes de cultivo (por ELISA y por CBA kit, respectivamente). Los resultados están representados como la media + el desvío estándar de duplicados, o como determinaciones por simplificado (en la determinación de TNF-α, en esplenocitos estimulados con péptidos $CD4^+$). En todos los casos se restó el valor de las células estimuladas con RPMI. ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: *$p<0,05$, ** $p< 0,01$.

Asimismo, se observó una tendencia a secretar mayores niveles de TNF-α frente a los diferentes péptidos ensayados (Figura 30, panel derecho). Este último mediador fue cuantificado exclusivamente por el kit de CBA (*Cytometric Bead Array*) y debido a la disponibilidad de muestras solo pudo ser determinado por duplicado en los sobrenadantes provenientes de esplenocitos estimulados con B8R. El resto de las citoquinas presentes en el kit de CBA Th1/Th2 (IL-2, IL-4 e IL-5) y que no fueron determinadas por ELISA quedaron por debajo del límite de detección de la técnica.

Considerando la importancia que tienen los ganglios linfáticos y el rol central que juegan en el desarrollo de una respuesta inmune específica, se analizó también la respuesta celular T específica, en términos de células productoras de IFN-γ, en este sitio inmunológico, particularmente en los ganglios inguinales (GI) que son los drenantes al sitio de inoculación empleado.

Se encontró que ambos vectores delecionados indujeron una mayor respuesta T específica contra péptidos de VACV, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$, en comparación a la respuesta generada por el MVAwt. En particular en este caso, se vio que el vector MVAΔA44L-A46R indujo a su vez una mayor respuesta que el vector que contenía las tres deleciones frente a los péptidos B8R y E9L ($p<0,001$) (Figura 31).

Desafortunadamente, debido al bajo número de células que se obtiene de este órgano linfático, solo se pudo evaluar la respuesta en cuanto a células productoras de IFN-γ, ya que la disponibilidad de células no permitió realizar determinaciones extra como cuantificar, además, el número de células productoras de IL-2.

En conjunto, estos resultados están en concordancia con aquellos observados en bazo, señalando que la respuesta celular T específica a los 7 días post-inoculación frente a péptidos de VACV se incrementó en aquellos ratones inmunizados con los vectores delecionados en comparación con la respuesta generada por el MVAwt.

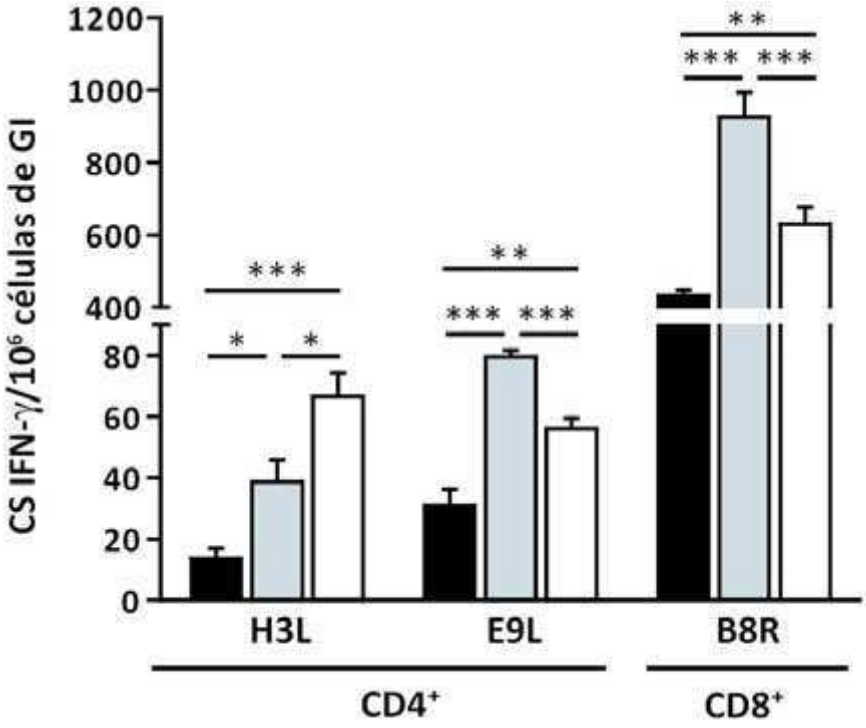

Figura 31. Análisis de la respuesta celular T en ganglios inguinales. Se cuantificaron por ELISPOT las células secretoras (CS) de IFN-γ en células de ganglio inguinal, provenientes de ratones inmunizados con: MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○), re-estimulados con los péptidos indicados. Los resultados están representados como la media + el desvío estándar de triplicados. En todos los casos se restó el valor de las células estimuladas con RPMI. ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: *p<0,05, ** p< 0,01, *** p< 0,001.

2.2 Respuesta inmune adaptativa en etapa de memoria

Es sabido que luego de un proceso infeccioso o de una inmunización, se generan células específicas de memoria que son, entre otras, las encargadas de la defensa del huésped frente a la eventual reintroducción del antígeno. Para evaluar y comparar la respuesta de memoria generada por los distintos vectores, se estudió la respuesta adaptativa inducida en ratones inmunizados con los diferentes MVAs luego de los 45 días post-inoculación. Al igual que lo realizado en la etapa aguda, en esta etapa de memoria se realizaron análisis tanto en células de bazo como en células de ganglios inguinales.

Como se ve en la figura 32.A, ambos vectores delecionados generaron una mayor cantidad de células productoras de IFN-γ específicas contra péptidos de VACV, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$, en comparación al MVAwt. No solo se observó un aumento en relación a las células productoras de IFN-γ, si no que el mismo patrón de respuesta se evidenció en cuanto a las células productoras de IL-2 (Figura 32.B), resultado de gran relevancia teniendo en cuenta el importante rol que juega esta citoquina en cuanto a la proliferación de linfocitos T, y en consecuencia en la generación y mantenimiento de una respuesta de memoria.

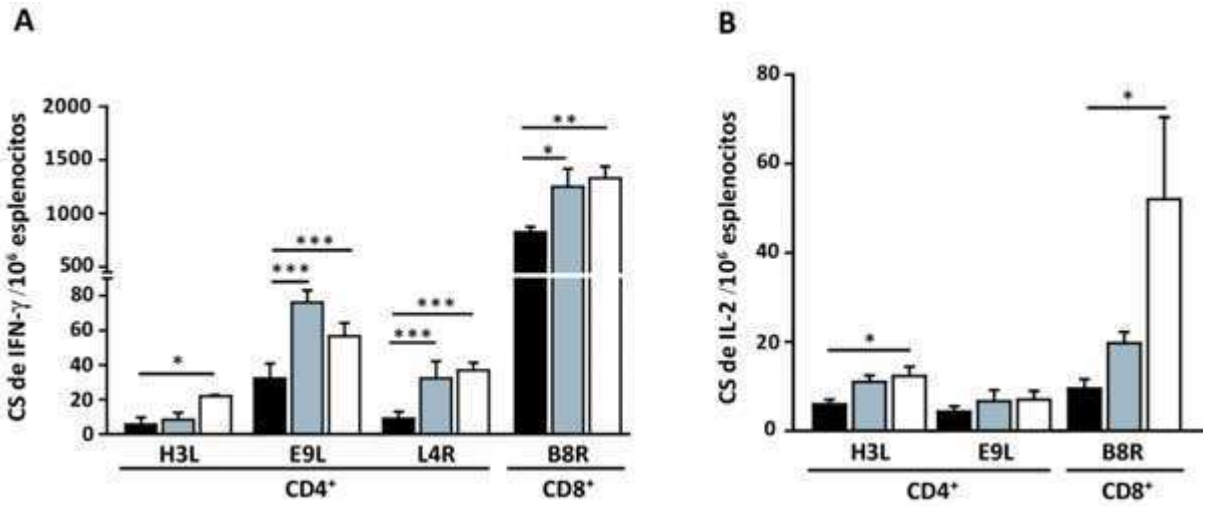

Figura 32. Análisis de la respuesta celular T en etapa de memoria. Se cuantificaron por ELISPOT las células secretoras (CS) de IFN-γ (A) e IL-2 (B) en esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○) re-estimulados con los péptidos indicados. Los resultados están representados como la media + el desvío estándar. En todos los casos se restó el valor de las células estimuladas con RPMI. ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: *p<0,05, ** p< 0,1, ***p<0,01.

De la misma manera se analizó la respuesta en los ganglios inguinales, y en concordancia con los resultados anteriores, los ratones inmunizados con los vectores delecionados generaron una mayor respuesta en relación al MVAwt (Figura 33).

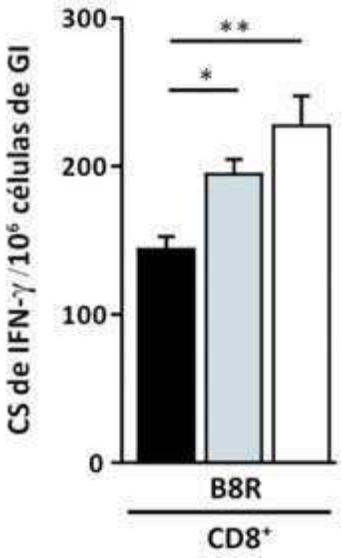

Figura 33. Análisis de la respuesta celular T en ganglios inguinales en etapa de memoria. Se cuantificaron por ELISPOT las células secretoras (CS) de IFN-γ en células de ganglio inguinal (GI), provenientes de ratones inmunizados con MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○) re-estimulados con B8R. Los resultados están representados como la media + el desvío estándar de triplicados. En todos los casos se restó el valor de las células estimuladas con RPMI. ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: *p<0,05, ** p< 0,01, ***p<0,001.

Al igual que en la etapa aguda, los esplenocitos de los distintos grupos fueron re-estimulados con diferentes péptidos de VACV por 72 horas y se cuantificaron en los sobrenadantes de cultivo diferentes mediadores solubles característicos de una respuesta Th1 o Th2, mediante ELISA (en el caso de IFN-γ e IL-2) y/o mediante kit de CBA (Perfil Th1: IFN-γ, IL-2 y TNF-α, perfil Th2: IL-4 e IL-5) tal como se detalló en Materiales y Métodos (sección 5.2.2 "Cuantificación de la producción de citoquinas").

Como se puede apreciar en la figura 34, las diferencias observadas entre MVAwt y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R no solo se mantuvieron, sino que incluso fueron amplificadas en relación a lo que se había obtenido para la etapa aguda. Las citoquinas IL-4 e IL-5, también fueron determinadas, ya que estaban presentes en el kit de cuantificación, sin embargo, los valores quedaron por debajo del límite de detección.

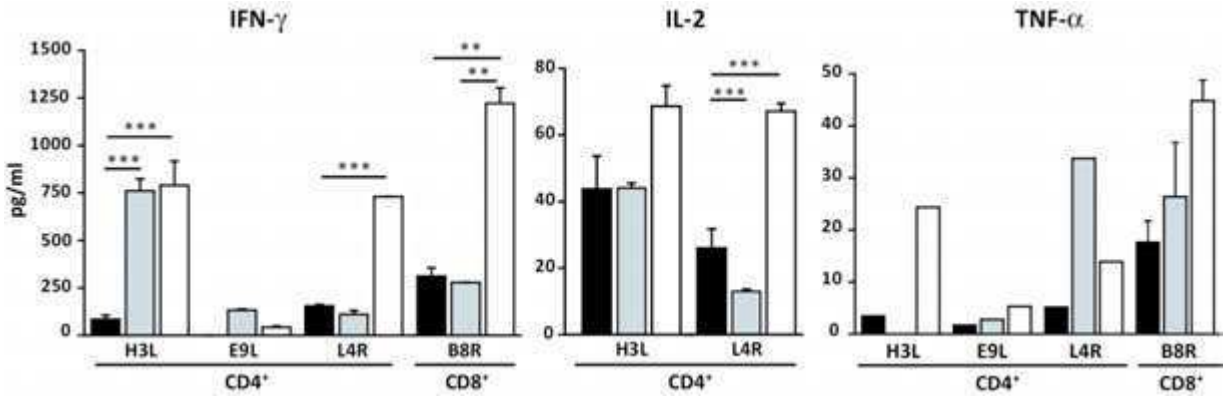

Figura 34. Cuantificación de mediadores solubles en etapa de memoria. Esplenocitos provenientes de los distintos grupos de inmunización: MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○), fueron re-estimulados con los péptidos indicados por 72 horas y se cuantificaron los mediadores solubles IFN-γ, IL-2 y TNF-α en sobrenadantes por ELISA y/o CBA. Los resultados están representados como la media + el desvío estándar de duplicados, o determinaciones por simplificado (para algunas determinaciones de TNF-α). En todos los casos se restó el valor de las células estimuladas con RPMI. ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: *p<0,05, ** p< 0,01, ***p<0,001.

Hasta aquí, los resultados indican que la magnitud de la respuesta observada en la etapa aguda, en cuanto a una mayor respuesta celular T en el grupo de vectores delecionados (MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R) en comparación al MVAwt, se mantiene en la etapa de memoria. Notoriamente, el incremento de magnitud observado no solo se detecta a nivel de células secretoras de IFN-γ sino también en niveles de producción de otras citoquinas como IL-2 y TNF-α.

2.3 Análisis de la calidad de la respuesta T de memoria

Como se describió anteriormente en la Introducción (ver sección 1 "Origen de las vacunas"), en la generación de inmunidad celular, para que ésta sea protectiva frente a la infección con algún patógeno no sólo es importante la magnitud de la respuesta celular T inducida sino también la calidad o funcionalidad de la misma. Así, el próximo objetivo consistió en estudiar la calidad de la respuesta T de memoria, para lo cual se analizó la capacidad de degranulación de las células T-CD8$^+$ específicas en combinación con la producción de IFN-γ luego de la estimulación con el péptido específico B8R.

La presencia de los marcadores CD107a y CD107b (LAMP-1 y LAMP-2, respectivamente) en la superficie de células T-CD8$^+$ luego de la activación específica es sinónimo de que esas células sufrieron un proceso de degranulación, paso necesario para que se lleve a cabo la citotoxicidad mediada por perforinas y granzimas [131]. Es por esto que la detección de esos marcadores en la superficie celular, constituye una medida indirecta, utilizada ampliamente en múltiples trabajos, de la capacidad de las células de ejercer citotoxicidad [131, 132]. A su vez se ha descripto que la detección a nivel celular de la producción de IFN-γ simultáneamente con la presencia de estos marcadores (CD107a y CD107b) en la membrana plasmática correlaciona positivamente con mayores niveles de protección frente al desarrollo de enfermedad en personas infectadas con HIV [133]. En base a estos antecedentes, se decidió evaluar la bifuncionalidad de estas células T-CD8$^+$ (como la expresión de CD107a/b en simultáneo con IFN-γ), como parte de la caracterización de la calidad de la respuesta generada (Figura 35).

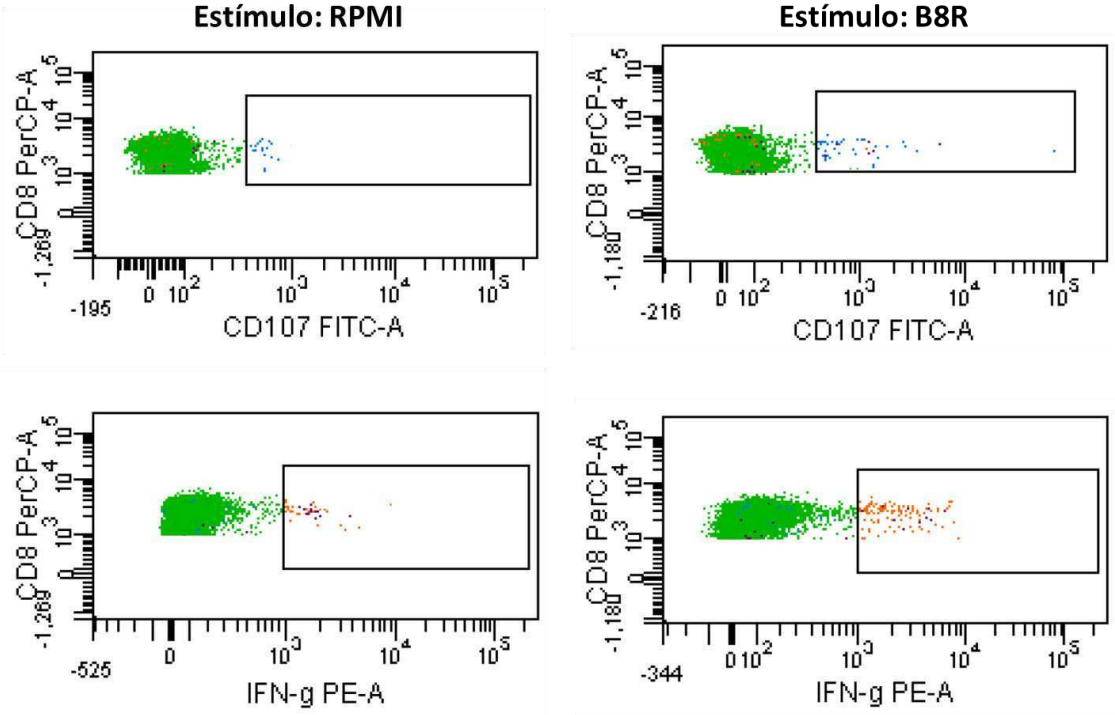

Figura 35. Selección de células bifuncionales. Esquemas de citometría representativos de las células T-CD8$^+$ positivas para CD107 (arriba) o para IFN-γ (abajo), luego de ser estimuladas con RPMI (izquierda) o el péptido B8R (derecha). Luego de identificar las células positivas para cada marcador, se utilizó la herramienta que ofrece el software (“*Intersection*”) para obtener las células dobles positivas CD107$^+$/IFN-γ$^+$ (células bifuncionales). Estos esquemas son ilustrativos, y corresponden a linfocitos T provenientes de animales inmunizados con MVAwt. Se utilizó la estrategia de *gating* detallada en Materiales y Métodos.

En este caso, se observó que el grupo de ratones que había sido inmunizado con el vector que incluía las tres deleciones (MVAΔC12L/ΔA44L-A46R) mostró un porcentaje 2 veces mayor de células T-CD8$^+$ bifuncionales (CD107$^+$/IFN-γ$^+$) comparados con el MVAwt ($p<0,05$) (Figura 36).

Teniendo en cuenta la diversidad de subpoblaciones celulares T que se generan luego de una respuesta inmune adaptativa, y de modo de ampliar aún más la caracterización de la calidad de la respuesta en la etapa de memoria, se analizó la distribución y la modulación de las distintas subpoblaciones celulares en base a la presencia/ausencia de los marcadores CD44 y CD62L. El marcador CD44 es una molécula de adhesión que media la unión a la matriz extracelular a través del ácido hialurónico [134]. Se lo utiliza como un indicativo de células activadas ya que su expresión aumenta en linfocitos *naïve* tras la estimulación con el antígeno y se mantiene en altos niveles en células T de memoria [135].

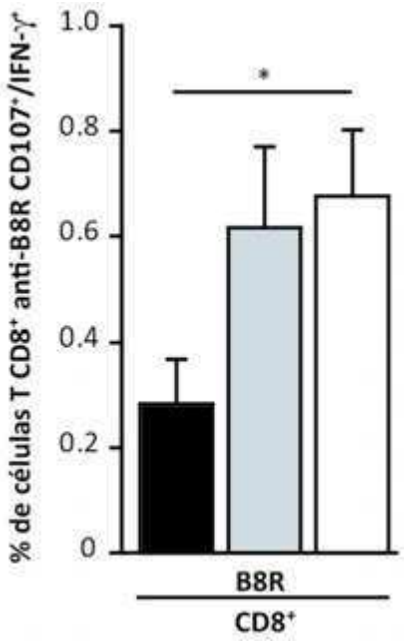

Figura 36. Análisis de la calidad de respuesta: bifuncionalidad de células T-CD8$^+$. Esplenocitos provenientes de los distintos grupos de inmunización: MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○), fueron re-estimulados con el péptido B8R y se cuantificó el porcentaje de células dobles positivas para los marcadores CD107 e IFN-γ como medida de actividad citotóxica. En todos los casos se restó el valor de las células estimuladas con RPMI. Las barras representan la media + desvío estándar de duplicados. ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: *$p<0,05$.

Por otro lado el marcador CD62L es una L-selectina [136], ligando de sialomucinas, vinculado al *homing* o direccionamiento de linfocitos a órganos linfáticos, y aumenta su expresión en aquellas células que se dirigen hacia estos sitios inmunológicos.

De acuerdo a la combinación de estos dos marcadores [137], las poblaciones de memoria se clasificaron en las siguientes subpoblaciones (ver Figura 37):

- "memoria temprana o *T stem-cells memory*" (T_{SCM}): $CD44L^-CD62L^+$ [138, 139],

- células T de memoria central (T_{MC}): $CD44^+CD62L^+$,

- células T de memoria efectora (T_{EM}): $CD44^+CD62L^-$,

- células T de memoria efectora terminal (T_{MET}): $CD44^-CD62L^-$.

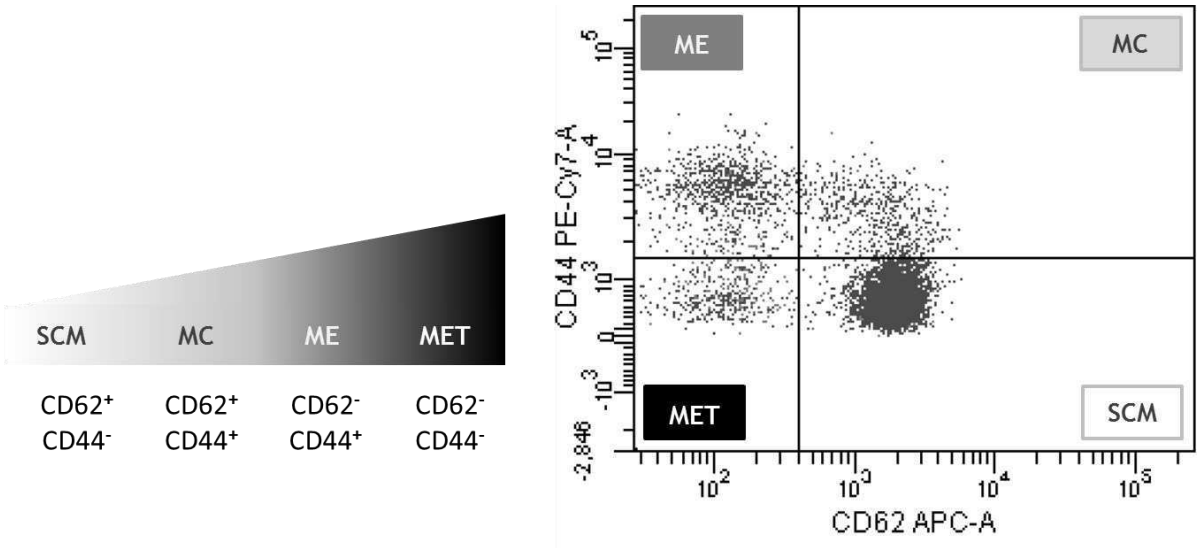

Figura 37. Análisis de las subpoblaciones de memoria. Esquema representativo de la clasificación de las subpoblaciones de memoria, utilizando los marcadores CD62L (en el fluoróforo APC) y CD44 (en el fluoróforo PE-Cy7).

Conforme a esta clasificación, se analizaron las sub-poblaciones de memoria T dentro de los linfocitos T-$CD8^+$ bifuncionales específicos para VACV (Figura 38).

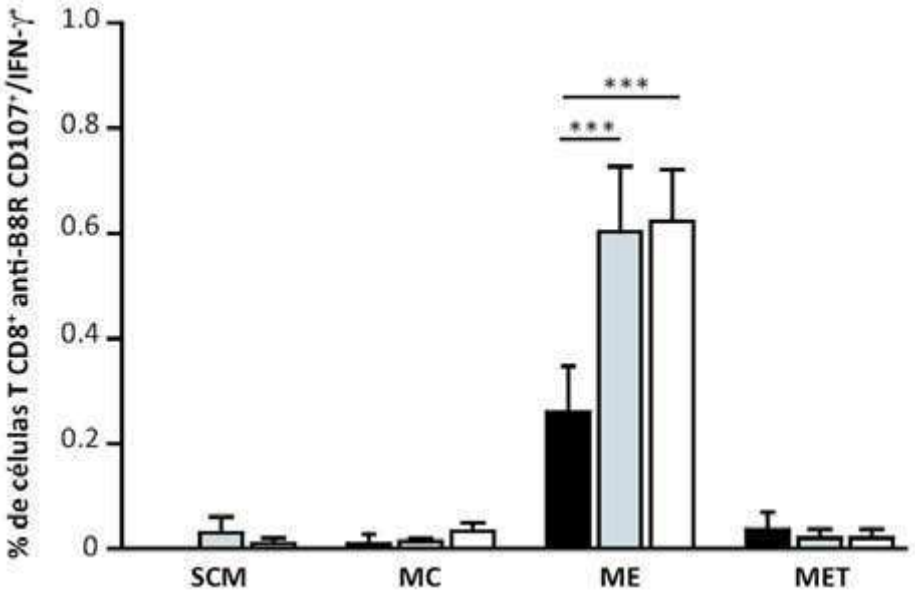

Figura 38. Análisis de las subpoblaciones de memoria dentro de células específicas T-CD8$^+$ bifuncionales. Esplenocitos provenientes de los distintos grupos de inmunización: MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○), fueron re-estimulados con el péptido B8R y se determinaron las distintas subpoblaciones de memoria dentro de la población de células dobles positivas para los marcadores CD107 e IFN-γ. En todos los casos se restó el valor de las células estimuladas con RPMI. Las barras representan la media + desvío estándar de duplicados. ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: ***p<0,001.

En el caso de células bifuncionales (CD107$^+$/IFN-γ$^+$) el mayor porcentaje se concentró, como era de esperarse, dentro de las células de memoria efectora (CD44$^+$CD62L$^-$), donde se detectaron importantes incrementos en ambos grupos inmunizados con los vectores delecionados MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R en relación al MVAwt (p<0,001).

Otra característica deseable en el desarrollo de una vacuna, en cuanto a la calidad de la respuesta, es la capacidad de las células T de proliferar luego de una re-estimulación específica, brindando la posibilidad de aumentar el número de clones capaces de combatir el patógeno. De esta manera, para cuantificar la proliferación celular se utilizó el colorante CFSE, el cual entra a las células y se une covalentemente a las aminas libres de la superficie y el interior celular. La particularidad de este colorante es que, con cada división celular, se hereda la marca fluorescente equitativamente entre las células hijas. De esta forma, con cada ciclo replicativo, la intensidad del CFSE en la población va

disminuyendo. En este sentido, cuanto menor sea la intensidad del CFSE en la población, mayor proliferación habrá sufrido.

En la figura 39 se muestra un ejemplo de células estimuladas con RPMI (panel superior), donde no se observó proliferación de las células, mientras que las células estimuladas con el antígeno VACV inactivado (panel inferior), si se vio una población con menor intensidad de CFSE, signo de proliferación.

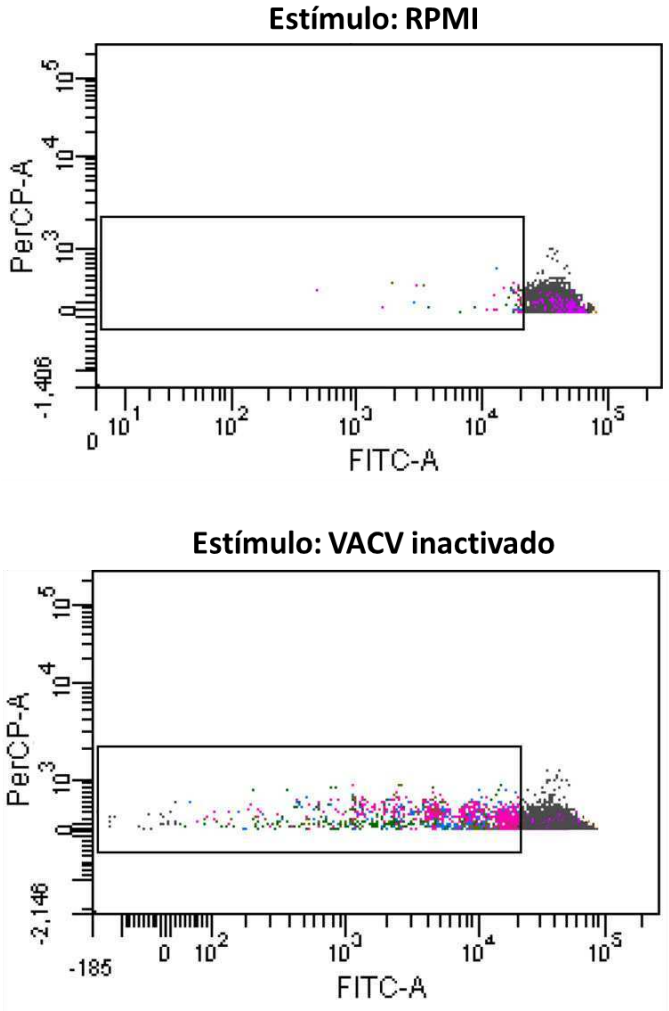

Figura 39. Proliferación de células T específicas. Esquemas de citometría representativos de la proliferación de células T ($CD4^+$ o $CD8^+$, según se haya marcado con uno u otro anticuerpo) estimulados con RPMI (panel superior) o VACV inactivado (panel inferior). Se puede observar que las células que fueron estimuladas con VACV inactivado, tienen menor intensidad de fluorescencia en FITC (eje X), correspondiente a la menor cantidad de CFSE que contiene las células, producto de las sucesivas divisiones celulares. Estos esquemas son ilustrativos, y corresponden a linfocitos T ($CD8^+$ en este caso) provenientes de animales inmunizados con MVAΔC12L/ΔA44L-A46R. Se utilizó la estrategia de *gating* detallada en Materiales y Métodos.

Se cuantificó el porcentaje de células que presentaban una baja proporción de CFSE ($CFSE_{bajo}$) como medida de proliferación efectiva. En este caso los ratones inmunizados con el MVAΔC12L/ΔA44L-A46R presentaron un mayor porcentaje de células T-$CD4^+$ y T-$CD8^+$ con capacidad proliferativa en comparación al MVAwt ($p<0,001$ y $p<0,05$, respectivamente) incluso frente al MVAΔA44L-A46R ($p<0,01$) (Figura 40).

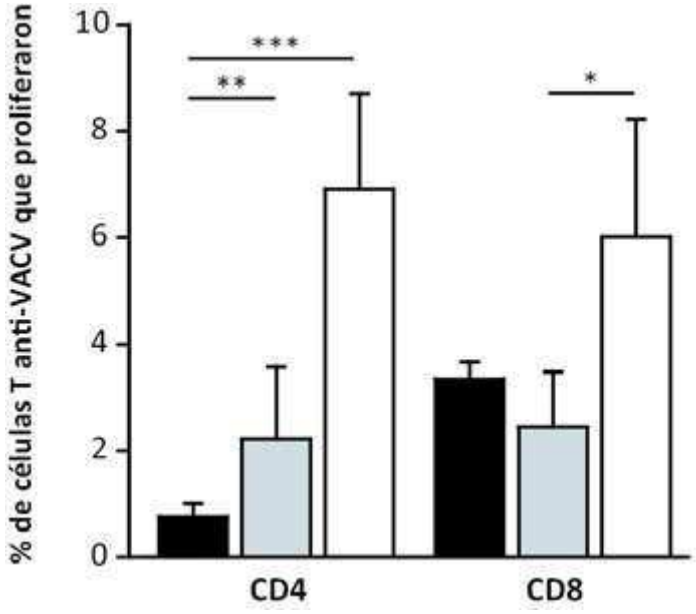

Figura 40. Análisis de la calidad de respuesta: proliferación de células específicas. Esplenocitos provenientes de los distintos grupos de inmunización: MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○), fueron teñidos con CFSE y reestimulados durante 4 días con VACV inactivado. Luego de esto se determinó el porcentaje de proliferación en cada grupo dentro de las poblaciones T-$CD4^+$ y T-$CD8^+$. En todos los casos se restó el valor de las células estimuladas con RPMI. Las barras representan la media + desvío estándar de duplicados. ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: *$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$.

Realizando un análisis más detallado de las subpoblaciones de células T-$CD4^+$ de memoria, se observaron diferencias entre el grupo de ratones inmunizados con el MVAΔC12L/ΔA44L-A46R en comparación a los grupos que recibieron el MVAwt o el MVAΔA44L-A46R en las poblaciones de células *stem cell* de memoria T_{SCM} ($p<0,001$ y $p<0,01$; respectivamente); como así también en células de memoria central ($p<0,001$ y $p<0,01$; respectivamente) y de memoria efectora ($p<0,05$). Para el caso de las células T-$CD8^+$, el MVAΔC12L/ΔA44L-A46R mostró un mayor porcentaje de células $CFSE_{bajo}$ en la subpoblación de células de memoria central con respecto a MVAwt y MVAΔA44L-A46R ($p<0,01$

y p<0,001, respectivamente) y en cuanto a la subpoblación de células de memoria efectora solo se vieron diferencias con el MVAwt (p<0,05) (Figura 41).

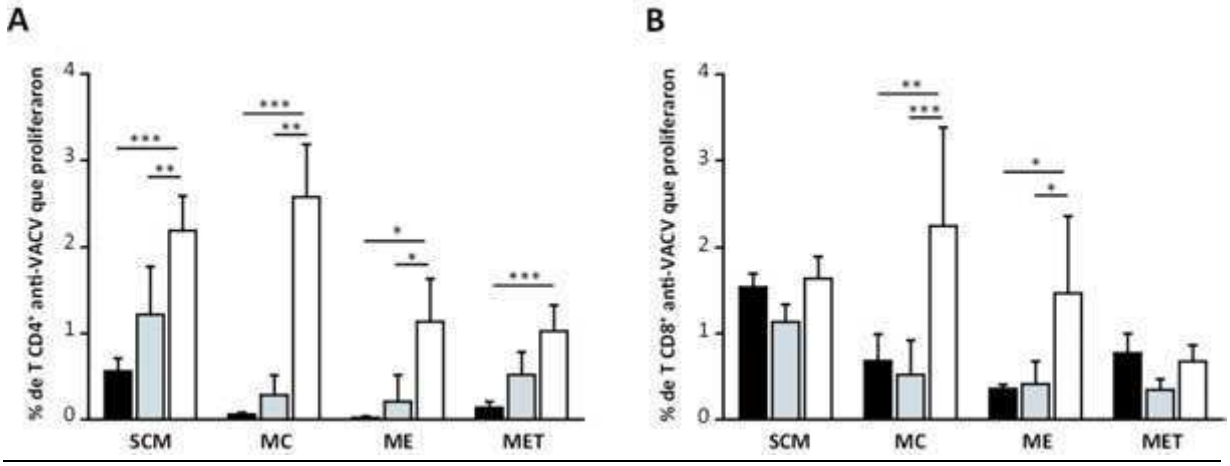

Figura 41. Caracterización de las subpoblaciones de memoria en células que proliferaron frente a VACV. Esplenocitos provenientes de los distintos grupos de inmunización: MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○), fueron teñidos con CFSE y reestimulados durante 4 días con VACV inactivado. Dentro de cada población T-CD4$^+$ (A) y T-CD8$^+$ (B) que proliferó frente a VACV, se realizó un análisis detallado de la distribución de las distintas sub-poblaciones de memoria de acuerdo a la combinación de los marcadores CD44 y CD62L. Las barras representan la media + desvío estándar de duplicados ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

2.4 Estudio de la respuesta humoral

Tal como se mencionó en la Introducción, los vectores poxvirales son uno de los predilectos a la hora de desarrollar vacunas capaces de inducir inmunidad mediada por células T, y por el contrario, han sido percibidos en el campo de la vacunación como una mala elección para la inducción de la inmunidad humoral [20]. Sin embargo, estudios a partir de modelos animales y ensayos clínicos de los últimos años sugieren, que estos vectores pueden ser utilizados con éxito para generar respuestas eficaces de anticuerpos por parte de células B, en esquemas de *prime-boost* [20].

En función de estos antecedentes, se decidió analizar si existía alguna diferencia en cuanto a la generación de una respuesta humoral entre los distintos grupos.

Para ello se analizó en el suero de los distintos grupos de ratones, la presencia de anticuerpos de tipo IgG específicos contra VACV. Así fue que se cuantificaron los niveles de IgG total, y a su vez de IgG1 e

IgG2a, en *pooles* de suero y en los sueros de los animales individuales, mediante la técnica de ELISA, tal como se describió en la sección 5.3 de Materiales y Métodos ("Cuantificación de inmunoglobulinas en suero").

En la figura 42 se puede observar que al analizar los niveles de anticuerpos a los 45 días post-inoculación en las muestras *pooleadas*, existen diferencias entre los grupos MVAwt y MVAΔA44L-A46R. Sin embargo, al analizar estos mismos grupos, pero a nivel de cada ratón individual, estas diferencias se pierden.

Es por eso que, en conjunto, se concluyó que no existían diferencias significativas entre los distintos grupos de ratones en cuanto a la generación de anticuerpos IgG, y que las diferencias observadas inicialmente a nivel de *pool* de suero, no radicaban en reales diferencias biológicas.

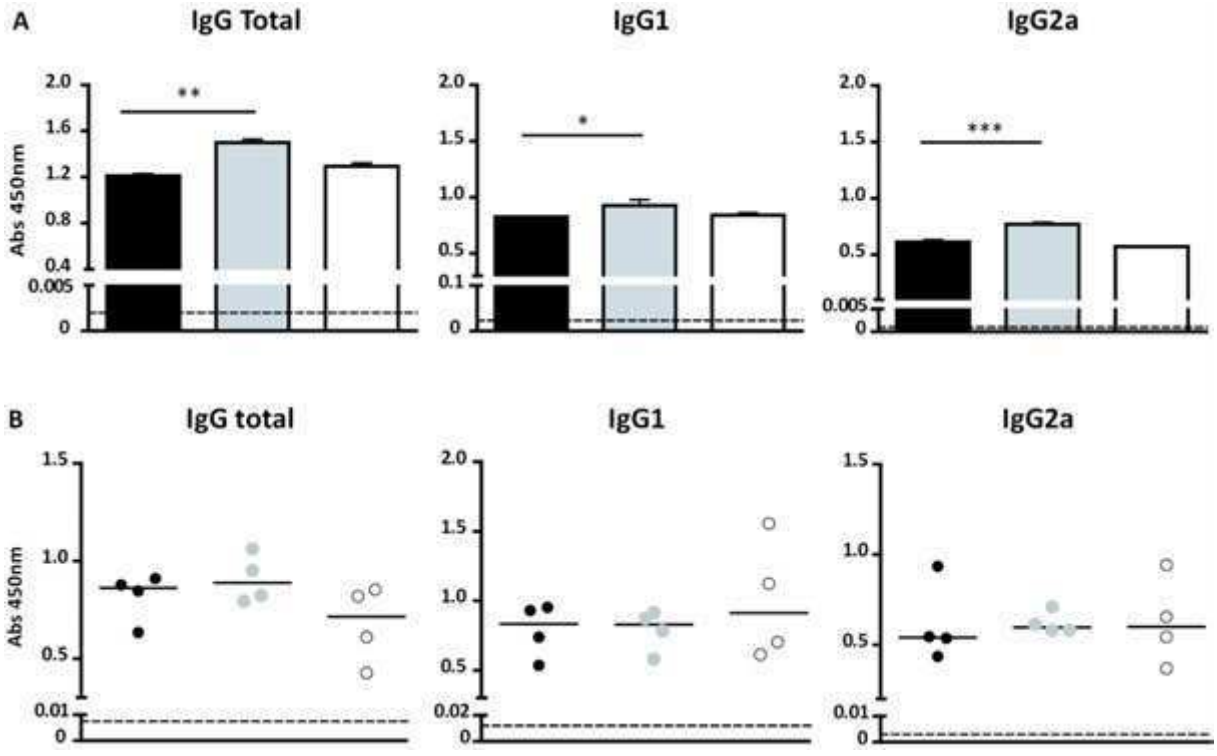

Figura 42. Determinación de anticuerpos anti VACV. Se cuantificaron por ELISA los niveles de IgG total, IgG1 e IgG2a en términos de absorbancia a 450 ηm, en sueros de ratones inmunizados (45 dpi) con MVAwt (●), MVAΔA44L-A46R (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○). (A) Cuantificación en *pooles* de suero diluidos 1:600. ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. (B) Cuantificación en cada ratón individual, los sueros fueron diluidos 1:3200 para el caso de IgG total, y 1:600 para IgG1 e IgG2a. Test de Mann-Whitney. La línea punteada representa el valor obtenido para los ratones sin inmunizar (*naïve*). Diferencias estadísticamente significativas para ambos casos: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

2.5 Análisis de la capacidad citotóxica

Los resultados obtenidos hasta el momento, indicaron que durante la fase de memoria la deleción del segmento *A44L-A46R* en combinación con el gen *C12L* (MVAΔC12L/ΔA44L-A46R) generó una respuesta celular T adaptativa de mejor calidad en comparación al MVAwt, en relación a su polifuncionalidad y el potencial proliferativo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con respecto a ambos vectores delecionados, y en vista de que el vector que contenía las tres deleciones era mejor con respecto al MVAΔA44L-A46R, en cuanto a las respuestas inmunes generadas consideramos importante evaluar la funcionalidad de la respuesta celular T $CD8^+$, analizando la capacidad citotóxica específica de esta población celular.

En función de esto, el siguiente objetivo consistió en analizar la citotoxicidad celular ejercida por las células T-$CD8^+$ con ensayos funcionales que permitieran medir de manera más directa la actividad de las células con capacidad citotóxica. En primer lugar, realizamos un ensayo de citotoxicidad *in vivo* en ratones inmunizados con MVAwt o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R y evaluamos la actividad citotóxica específica a los 7 dpi, frente al péptido B8R. El ensayo consistió en la inyección intravenosa de una mezcla de células de bazo marcadas con una baja concentración de CFSE ($CFSE_{bajo}$) y células con alta concentración de CFSE ($CFSE_{alto}$) y además pulsadas con el péptido B8R de VACV en tres grupos de ratones: sin inmunizar o *naïve*, inmunizados con el MVAwt o inmunizados con el MVAΔC12L/ΔA44L-A46R. A las 16 horas luego de la inyección, los animales fueron sacrificados y se analizó la lisis específica en células de bazo por citometría de flujo, tal como se detalló en Materiales y Métodos (sección 5.4.1 “Evaluación de citotoxicidad *in vivo*”). Como resultado pudimos observar un 98,2% y 97,7% de citotoxicidad en los grupos MVAwt y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, respectivamente. Si bien no encontramos diferencias en cuanto al porcentaje de citotoxicidad entre grupos, debido a la saturación del sistema (posiblemente producto de una falta de ajuste en las condiciones de las variables utilizadas como el tiempo de análisis post-inyección, o las concentraciones de células y/o de

antígeno), consideramos relevante este resultado en cuanto al hecho de poder demostrar la funcionalidad de las células T-CD8$^+$ *in vivo*.

Posteriormente se decidió realizar un ensayo de citotoxicidad *in vitro* tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos (sección 5.4.2 "Evaluación de citotoxicidad *in vitro*"), de manera de comparar la capacidad citotóxica de ambos grupos de ratones (MVAwt o el MVAΔC12L/ΔA44L-A46R). Brevemente, esplenocitos de ratones *naïve* fueron marcados con dos concentraciones distintas de CFSE ($CFSE_{alto}$ y $CFSE_{bajo}$), y la población de $CFSE_{alto}$ fue pulsada con el péptido B8R (células blanco). Las células fueron incubadas por 4 horas, solas o en presencia de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados previamente (7 días antes) con el MVAwt o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (células efectoras), cubriendo distintas relaciones de concentración entre células efectoras y células blanco. Posteriormente se determinó el porcentaje de lisis específica como se detalló en Materiales y Métodos (sección 5.4.2 "Evaluación de citotoxicidad *in vitro*").

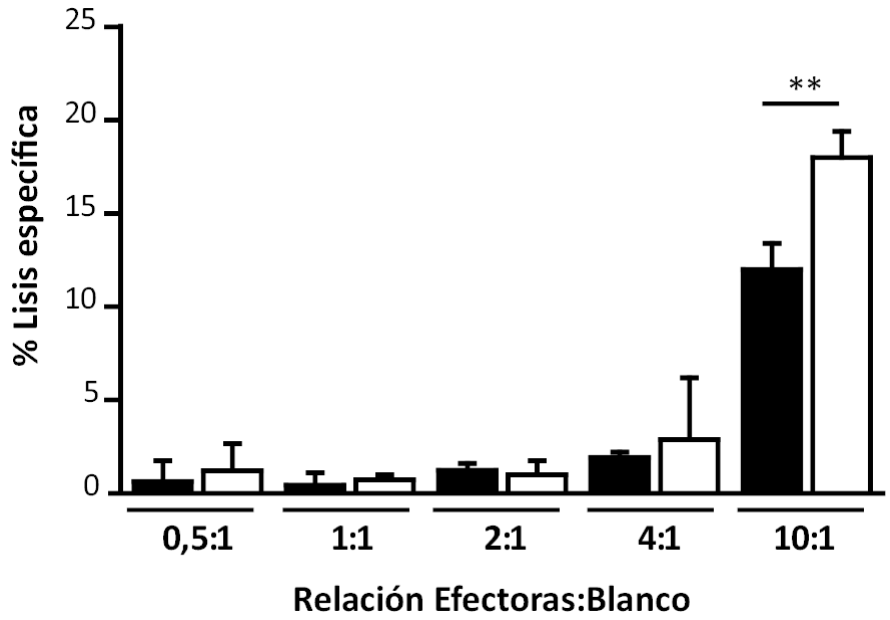

Figura 43. Citotoxicidad *in vitro*. Se midió el porcentaje de lisis específica de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con MVAwt (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○) frente a células blanco pulsadas con el péptido B8R. Las barras representan la media + desvío estándar de duplicados. ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas: **p<0,01.

Como se ve en la figura 43, en relaciones bajas de células efectoras: blanco no se vieron diferencias significativas entre el grupo del MVAwt comparado con el vector que contiene las tres deleciones (MVAΔC12L/ΔA44L-A46R). Al aumentar la relación de células efectoras: blanco, se vio un aumento en el porcentaje de citotoxicidad en ambos grupos, y fue significativamente mayor en el MVAΔC12L/ΔA44L-A46R en relación al MVAwt, cuando la proporción de células efectoras: blanco fue de 10:1 ($p<0,01$).

Con este resultado se pudo concluir que las células T-CD8$^+$ provenientes del grupo inmunizado con MVAΔC12L/ΔA44L-A46R mostraron una mejor funcionalidad y un desarrollo de la respuesta inmune de mejor calidad con respecto al MVAwt.

3. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INNATA

Una vez caracterizada la respuesta adaptativa generada por ambos vectores delecionados en relación al MVAwt, y teniendo en cuenta que el tipo de respuesta inmune innata generada (en relación a los tipos de células presentadoras de antígeno que se activen o el patrón de citoquinas secretados) será determinante en el posterior desarrollo de la respuesta adaptativa, se decidió estudiar más detalladamente la respuesta generada durante las primeras horas posteriores a la infección.

Teniendo en cuenta que hasta este punto del trabajo el vector triple delecionado (MVAΔC12L/ΔA44L-A46R) fue el que presentó, en conjunto, una respuesta inmune adaptativa de mayor magnitud y mejor calidad en relación al otro vector delecionado en estudio (MVAΔA44L-A46R), el análisis de la respuesta innata se realizó comparando en este caso a los vectores MVAwt y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R.

Para estudiar los mediadores tanto pro-inflamatorios como antivirales generados en respuesta a la infección por MVAwt o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, grupos de ratones C57Bl/6 fueron inmunizados con

los distintos vectores y sacrificados a distintos tiempos post-inmunización: 4, 6, 16, 20 y 30 hpi tal como se detalló en Materiales y Métodos (ver sección 6 "Análisis de la respuesta Innata"). Los grupos de ratones se constituyeron con 4 a 6 animales, y cada tiempo fue evaluado al menos dos veces. En todos los casos se extrajo suero de cada animal y los ganglios inguinales (cercanos al sitio de inoculación). En el caso de los ganglios inguinales, los mismos fueron procesados por diferentes métodos de acuerdo a si se utilizaron para cuantificar citoquinas por ELISA o ARN mensajero por PCR cuantitativa.

3.1 Mediadores pro-inflamatorios producidos por el MVAwt versus MVAΔC12L/ΔA44L-A46R

Los ganglios inguinales fueron procesados tal como se detalló en Materiales y Métodos (sección 6.2.1 "Muestras para determinaciones proteicas"), y múltiples citoquinas fueron evaluadas por ELISA. En este caso se evaluaron los tiempos de 4, 6, 20 y 30 hpi, y dada la cercanía temporal de los tiempos 4 y 6 horas, y en base a un primer análisis realizado, se decidió agrupar los animales de estos tiempos en un mismo grupo.

Como se puede apreciar en la figura 44, si bien la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa, probablemente debido a la dispersión de los datos, se puede observar una tendencia a que los niveles de IFN-γ en el grupo MVAΔC12L/ΔA44L-A46R superen los valores producidos por el grupo MVAwt. En el caso de las citoquinas IL-12 e IL-1β si se pueden observar diferencias estadísticamente significativas ($p<0,01$ y $p<0,05$; respectivamente) pero solo al tiempo de 30 horas post-infección (Figura 44).

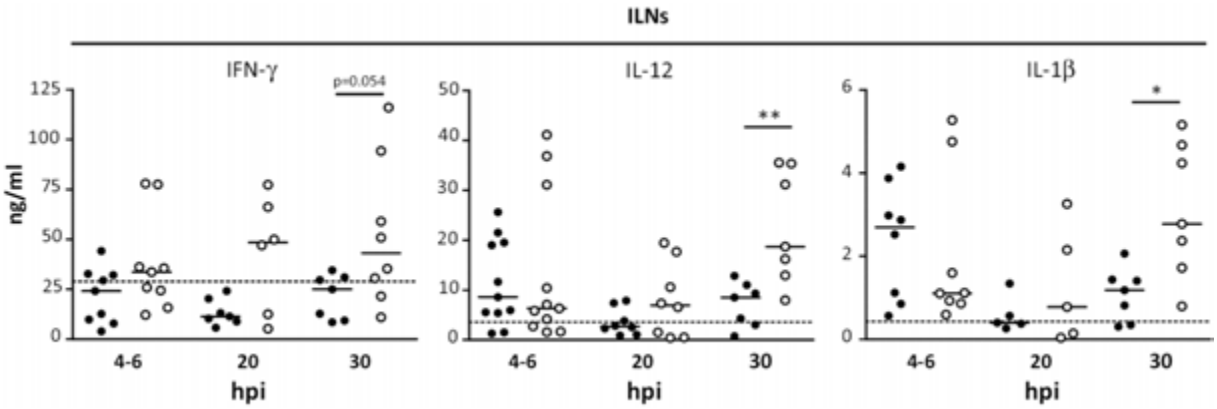

Figura 44. Cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias en homogenatos de ganglio inguinal. Grupos de ratones inmunizados con MVAwt (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○) fueron sacrificados en los tiempos indicados y se cuantificaron en homogenatos de ganglios inguinales los mediadores solubles IFN-γ, IL-12 e IL-1β mediante ELISA. Se grafican los valores individuales de cada ratón y se indica la mediana de cada grupo. Los valores obtenidos para el grupo de ratones sin inmunizar (*naïve*) se representan con la línea punteada (IFN-γ: 29 ηg/ml; IL-12: 3,59 ηg/ml; IL-1β: 0,431 ηg/ml). Test de Mann-Whitney. Diferencias estadísticamente significativas: *p<0.05, **p<0,01.

A excepción del tiempo de 30 horas post-infección, en los otros dos estadios la dispersión de los datos es amplia y esto dificulta, además del análisis estadístico, la posibilidad de arribar a alguna conclusión en cuanto al patrón de producción de mediadores inmunes en los distintos grupos. Con el objetivo de enriquecer la caracterización de la respuesta innata se analizó, además, el porcentaje de ratones cuya respuesta individual sobrepasó la mediana alcanzada por el grupo *naïve* para cada citoquina y se determinó el número de veces de inducción en cada grupo en relación al grupo *naïve*.

Como se puede ver en la tabla 10, a excepción de los tiempos más cortos de 4–6 horas post-inoculación, donde las diferencias no son tan pronunciadas, en tiempos más avanzados (20 y 30 horas post-inoculación) se puede ver que, para todas las citoquinas determinadas, el porcentaje de ratones que superaron el valor de mediana del grupo sin infectar (*naïve*) fue mayor en el grupo MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, en relación al MVAwt. A su vez, se analizó en cuántas veces la mediana de cada grupo superaba a la mediana del grupo *naïve*, para cada citoquina y cada tiempo. Nuevamente, exceptuando los tiempos más cortos (4-6 horas post-inoculación), entre las 20 y 30 horas post-inoculación se ve que para todas las citoquinas estudiadas las veces de inducción sobre el *naïve* del

grupo MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, fueron mayores a las del MVAwt, y en la mayoría de los casos duplican la respuesta con respecto a este último.

Tabla 10. Análisis de la respuesta de cada grupo (MVAwt y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R) en relación al grupo *naïve*, para cada mediador y tiempo ensayado.

		IFN-γ		IL-12		IL-1β	
hpi*	Grupo†	WT	Δ	WT	Δ	WT	Δ
4-6	% de ratones que superan al *naïve*	44	56	82	73	100	100
	Veces de inducción sobre el *naïve*	0,8	1,2	2,4	1,8	6,3	2,6
20	% de ratones que superan al *naïve*	0	67	34	63	40	60
	Veces de inducción sobre el *naïve*	0	1,7	0,8	1,9	0,9	1,8
30	% de ratones que superan al *naïve*	43	75	71	100	71	100
	Veces de inducción sobre el *naïve*	0,9	1,5	2,4	5,2	2,7	6,4

*hpi: horas post-inoculación; † Grupo: WT: MVAwt, Δ: MVAΔC12L/ΔA44L-A46R

Del mismo modo se evaluaron en estas muestras otras citoquinas como IL-10, TNF-α e IL-6 mediante ELISA. En estos casos, en contraposición a las determinaciones anteriores, no se hallaron diferencias significativas entre las citoquinas producidas por el grupo inmunizado con el MVAwt en relación al MVAΔC12L/ΔA44L-A46R. Incluso, en el caso de IL-10 y TNF-α la dispersión dentro de cada grupo fue considerable, lo que imposibilitó encontrar un patrón de respuesta. No fue éste el caso de IL-6, donde la dispersión dentro de cada grupo fue menor y la producción a lo largo del tiempo pareció tener un pico de producción para el grupo MVAΔC12L/ΔA44L-A46R a las 20 hpi. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 45).

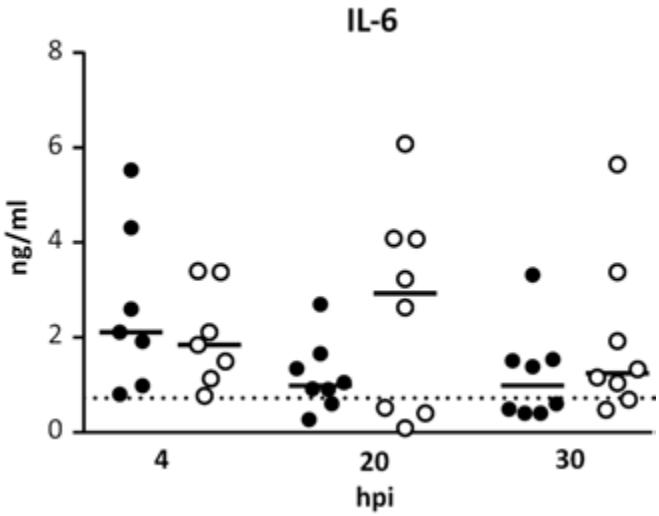

Figura 45. Cuantificación de IL-6 en homogenatos de ganglio inguinal. Grupos de ratones inmunizados con MVAwt (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○) fueron sacrificados en los tiempos indicados y se cuantificó IL-6 en homogenatos de ganglios inguinales mediante ELISA. Se grafican los valores individuales de cada ratón y se indica la mediana de cada grupo. Los valores obtenidos para el grupo de ratones sin inmunizar (*naïve*) se representan con la línea punteada (mediana: 0,72 ηg/ml). Test de Mann-Whitney.

Conjuntamente, se analizó la presencia de estas citoquinas en el suero de los animales inmunizados. A diferencia de lo que sucede con las muestras de ganglio inguinal, en las que dependiendo de qué se deseaba cuantificar, el tipo de procesamiento era diferente, en las muestras de suero, el tratamiento es el mismo para todas. Es por eso que se pudieron evaluar todos los tiempos: 4, 6, 16, 20 y 30 hpi, y en este caso también, se decidió agrupar los tiempos de 4 y 6 hpi, y los de 16 y 20 hpi. A diferencia de lo observado en ganglios inguinales, en este caso solo se encontraron niveles detectables de IFN-γ, que notoriamente resultaron 3 órdenes de magnitud menores a los niveles encontrados en ganglio inguinal. Contrariamente a lo observado en este tejido, se vieron diferencias estadísticamente significativas entre las 4-6 y 16-20 horas post-inoculación, siendo mayores en el grupo MVAΔC12L/ΔA44L-A46R en relación al MVAwt ($p<0,01$ en ambos casos), y rápidamente a las 30 horas post-inoculación los niveles decaen cercanos a valores indetectables (Figura 46).

El resto de las citoquinas analizadas (IL-12, IL-1β, IL-10, IL-6 y TNF-α) fueron indetectables, al menos por la técnica utilizada.

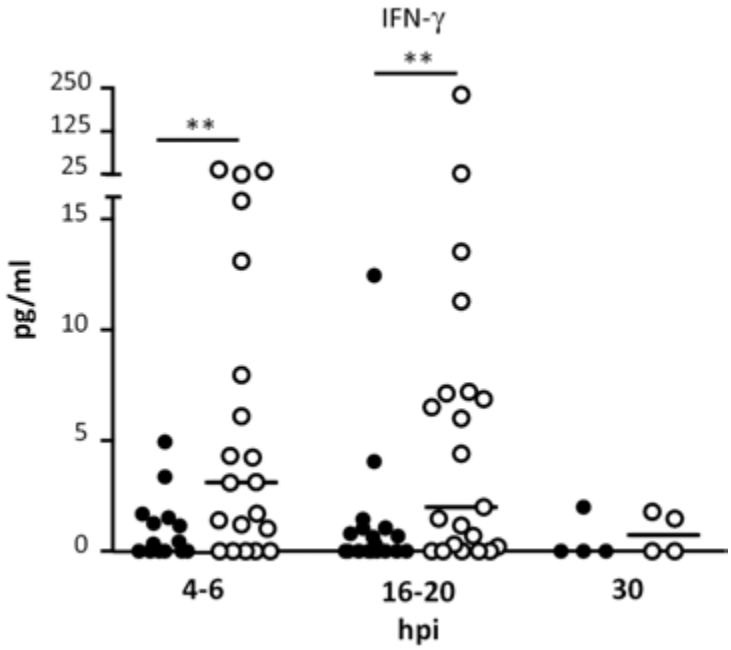

Figura 46. Cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias en suero. Ratones inmunizados con MVAwt (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○) fueron sacrificados en los tiempos indicados y se cuantificó IFN-γ en suero mediante ELISA. Se grafican los valores individuales de cada ratón y se indica la mediana de cada grupo. Test de Mann-Whitney. Diferencias estadísticamente significativas: **p<0,01.

3.2 Mediadores antivirales producidos por el MVAwt versus MVAΔC12L/ΔA44L-A46R

La inmunización con el vector MVA involucra en si una respuesta antiviral del huésped que desencadena la activación de vías de señalización como la de IRF3/IRF7, que llevan en última instancia a la producción de interferones de tipo I (IFN-α e IFN-β) [140, 141]. Está descripto que estos mediadores son importantes factores que contribuyen a la expansión de la respuesta celular T generada por MVA [142]. Es por esto que se decidió evaluar la producción de este tipo de mediadores antivirales, como una manera de medir la activación de estas vías de señalización y de determinar si existían diferencias en cuanto al nivel de producción por parte de los distintos MVAs. Se analizaron los niveles de expresión de IFN-β a las 6 y 16 hpi, mediante PCR cuantitativa, en ganglios inguinales que fueron procesados tal como se describió en Materiales y Métodos (sección 6.2.2 “Muestras para determinaciones de ARN”). En este caso, se analizaron los tiempos de 6 y 16 hpi.

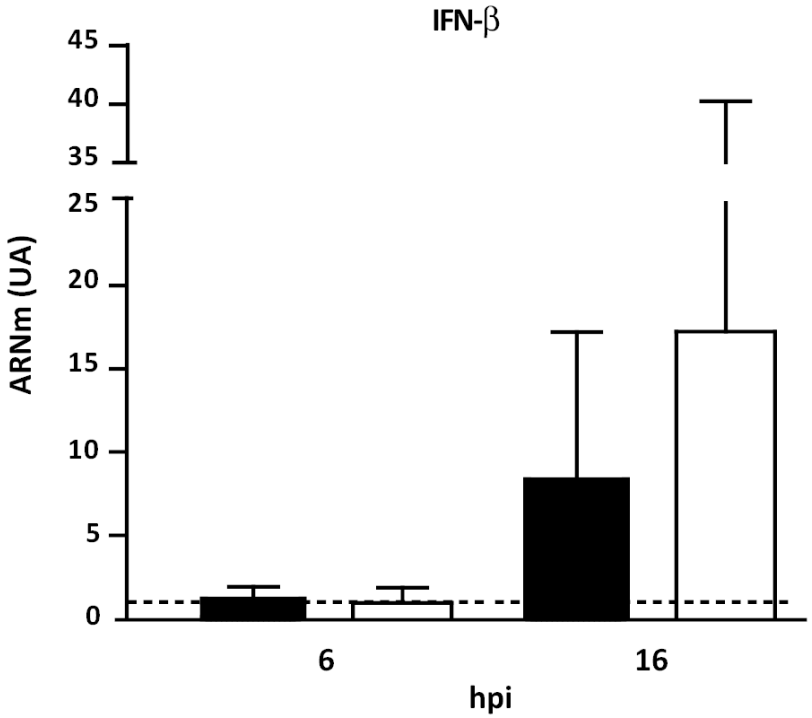

Figura 47. Cuantificación de IFN de tipo I en homogenatos de ganglio inguinal. Grupos de 4 a 6 ratones inmunizados con MVAwt (●) o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R (○) fueron sacrificados en los tiempos indicados y se cuantificaron los niveles de expresión de IFN-β por PCR cuantitativa. Los niveles de IFN-β se normalizaron a los de β-actina (gen de expresión constitutiva), y estos a su vez se relativizaron a los valores obtenidos para el grupo sin infectar (línea punteada). Se grafica la media + el desvío estándar. Los datos fueron analizados siguiendo las guías planteadas por *Applied Biosystems* [143].

Como se aprecia en la figura 47, a las 6 horas post-inmunización los niveles de ARN mensajero de IFN-β eran muy similares a los valores del grupo *naïve*, pudiéndose especular que 6 horas no fue tiempo suficiente para ver *in vivo* un aumento en los niveles de ARN mensajero. Sin embargo, a las 16 horas post-inmunización sí se pudo evidenciar un aumento en los niveles de expresión de IFN-β de ambos grupos, siendo mayor en los ratones inmunizados con MVAΔC12L/ΔA44L-A46R respecto del MVAwt. A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas en este caso, si puede considerarse biológicamente sustancial. La ausencia de diferencia estadísticamente significativa pudo deberse a la dispersión de los datos ya que, en este punto, al igual que en el resto de los análisis a nivel de respuesta innata, cada animal fue analizado de manera individual. Como una manera de demostrar la importancia de este resultado, se analizó el número de individuos que superaban el valor del *naïve* y se observó que, mientras en el grupo de MVAwt sólo 2 ratones de 5 (40%)

mostraron un incremento de 10 veces en relación al *naïve*, en el grupo de MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, 4 de 6 ratones (67%) alcanzaron esta diferencia, y notablemente 2 de ellos superaron un incremento de 20 veces con respecto al grupo *naïve*.

V. DISCUSIÓN

La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante.

- Miguel de Unamuno

El uso de vectores recombinantes basados en poxvirus como plataformas para el desarrollo de vacunas surgió como concepto por primera vez hace más de 30 años cuando *Smith* y colaboradores describieron la utilización de un virus Vaccinia recombinante que expresaba el gen de la hemaglutinina de influenza (H2N2), con capacidad para conferir protección frente al virus de la gripe en un modelo de hámster [144]. Desde entonces el uso de vectores poxvirales se ha extendido ampliamente y su estudio y caracterización se han intensificado, hasta el uso de variantes virales altamente atenuadas, como el MVA o los *canarypox*, que constituyen hoy en día las vacunas de "tercera generación", mucho más seguras y elaboradas bajo las Buenas Prácticas de Fabricación o GMP (del inglés *Good Manufacturing Practices*) [145].

Como se mencionó inicialmente en la introducción de este trabajo de tesis, los poxvirus tienen características únicas que los hacen excelentes candidatos para ser utilizados como vectores vacunales. Estas propiedades incluyen la gran capacidad de empaquetamiento de ADN recombinante (de hasta 25 kb) y la expresión regulada por promotores virales fuertes, la falta de persistencia o integración al genoma del huésped debido a su replicación citoplasmática, una alta inmunogenicidad como vacuna y su inocuidad, incluso para ser administrado en personas inmunocomprometidas [62]. Además, el MVA es de fácil manipulación y producción, y en los últimos años se ha tratado de acentuar esta particularidad, desarrollando líneas celulares que permitan su producción y purificación a gran escala, con el objeto de ya no depender de fibroblastos de embrión de pollo (FEPs) para su manufacturación [146, 147].

A pesar de esto, existen muchas ideas erróneas acerca de la efectividad y seguridad del MVA como vector vacunal, y varias de las particularidades enumeradas previamente son actualmente cuestionadas. En este sentido, *Cottingham* & *Carroll* discutieron en su trabajo de 2013 algunos de estos pre-conceptos demostrando que los vectores recombinantes de MVA son genéticamente estables, seguros y lo suficientemente inmunogénicos como para brindar ya sea protección frente a diversos patógenos o un beneficio terapéutico en casos de vacunas para ciertos tipos de cáncer [68].

Múltiples trabajos han demostrado que para la generación de respuestas inmunes celulares específicas el uso del MVA como vector recombinante es mucho más potente en esquemas de vacunación heterólogos de tipo *prime-boost* [148-150]. Este tipo de esquemas se basa en la administración de un mismo antígeno recombinante en dosis seriadas, pero con la particularidad que la expresión del antígeno proviene de diferentes vectores, ya sean virales o de ADN, es por eso que se denominan "dosis heterólogas", a diferencia de los refuerzos dados con la misma vacuna en cuyo caso constituyen dosis homólogas [151, 152]. Actualmente, una de las estrategias más utilizadas radica en la utilización de una primera dosis o *prime*, basada en un vector de ADN que exprese el antígeno de interés y un refuerzo, o *boost,* utilizando un vector basado en MVA [121, 153]. Se ha reportado a su vez, la utilización de vectores adenovirales o derivados del virus Influenza como primera dosis [149, 154, 155]. Muchos ensayos clínicos en humanos han mostrado una altísima magnitud de respuesta, con una inducción de más de 1000 células productoras de IFN-γ por millón de células, y en todos estos estudios el MVA ha sido el componente principal del *boost* o refuerzo. Incluso en algunos estudios se ha visto una considerable inducción de respuesta inmune humoral, generando niveles de anticuerpos comparables a los generados por los adyuvantes de última generación (40 μg/ml versus 70 μg/ml, respectivamente), que superan ampliamente a los niveles requeridos de protección inducidos por algunas vacunas convencionales (1 μg/ml), revelando así un gran potencial inmunogénico, que puede ser aún mayor, teniendo en cuenta la deleción dirigida de genes inmunomoduladores [156, 157].

Un aspecto cuestionado por gran parte de la comunidad científica, escéptica con respecto al uso de este vector como vacuna en humanos, es la existencia de inmunidad previa frente al virus, debida a las campañas de vacunación para erradicar la viruela. Si bien esto plantea la posibilidad de reducir la inmunogenicidad de MVA y en consecuencia que su utilización como vector vacunal se vuelva ineficaz, ciertos trabajos han probado que, de existir una reducción en la respuesta, la misma puede ser considerada insignificante [158-160]. En particular, en un trabajo de *Ramírez* y colaboradores se describió que en el caso de dar una segunda dosis, o *boost*, con un vector MVA recombinante

(MVAr), la inmunidad tanto celular como humoral frente a los antígenos recombinantes resultó significativamente mayor en el grupo de animales que habían sido preinmunizados con el vector MVAr en lugar de aquellos que habían recibido como *prime*, la cepa replicativa *Western Reserve* recombinante (WRr). Esto a su vez, se correlacionó con mayores niveles de expresión del antígeno foráneo luego del *boost*, demostrando los beneficios y efectividad de MVA como vector vacunal para ser utilizado en esquemas de inmunización que incluyan varias dosis, o en caso de inmunidad preexistente frente a VACV [123].

Finalmente, se ha demostrado ampliamente que el MVA es avirulento e incapaz de replicar *in vivo* en mamíferos, incluso en animales y/o humanos inmunosuprimidos, utilizando múltiples rutas de inoculación, entre ellas la intracerebral [161]. Con respecto a este punto, es interesante destacar un trabajo en el que analizaron diversas rutas de inoculación de MVA en un modelo murino, revelando que la vía utilizada influye en la biodistribución de MVA. Ya sea que la misma sea intraperitoneal o subcutánea, la distribución se verá reflejada en prácticamente todos los tejidos (tejidos no-linfoides, ganglios linfáticos y bazo). En el caso que la inoculación sea intranasal, se restringe al tejido linfoide asociado a nasofaringe o NALT (por sus siglas en inglés *nasal-associated-lymphoid-tissue*), pulmones y ganglios linfáticos drenantes de pulmón, sin signos de inflamación en sistema nervioso central. Luego de 48 horas estos autores no detectaron virus a lo largo de los tejidos, sugiriendo un rápido *clearance* viral, consistente con el hecho que MVA sea una cepa atenuada incapaz de producir progenie viral [162].

Debido a la relevancia que los vectores MVA poseen actualmente en relación al desarrollo de vacunas, hay una necesidad sustancial de incrementar el potencial inmunogénico de este vector. Numerosas vacunas basadas en MVA están siendo desarrolladas con el fin de, en un futuro, ser utilizadas frente a diversas enfermedades infecciosas como HIV/SIDA, Malaria, Tuberculosis como así también, diferentes tipos de cáncer [22, 163-166]. Estudios previos demostraron que es posible aumentar la inmunogenicidad del vector MVA y generar una respuesta inmune de mayor magnitud y

mejor calidad, si se delecionan genes virales implicados en la evasión de la respuesta inmune [90, 167, 168]. No obstante, otros trabajos describen que la deleción de determinados genes virales de evasión al sistema inmune, de manera individual o conjunta no produjeron, aparentemente, resultados beneficios en relación al incremento del potencial inmunogénico de MVA [101, 102, 169].

En este trabajo de tesis, se generó un vector MVA al cual se le delecionó un segmento del genoma conteniendo los genes *A44L* y *A46R* (MVAΔA44L-A46R). Teniendo en cuenta que los productos de los genes *A46R* y *C12L* se encuentran inter-relacionados funcionalmente y considerando, además, los resultados previos obtenidos por nuestro grupo [90], también resultó interesante incluir la deleción del gen *C12L* (MVAΔC12L/ΔA44L-A46R).

Debido a la estrategia utilizada para delecionar los genes *A44L* y *A46R*, que incluye la escisión del segmento entero, el gen *A45R* que se encuentra contenido entre ambos genes también resultó eliminado. No obstante, el producto de este gen se ha descripto como una proteína con similitud a la superóxido-dismutasa (*Superoxide dismutase-like protein*), que en MVA contiene una deleción de 12 nucleótidos que conlleva finalmente a que la proteína sea enzimáticamente inactiva [57, 170]. Debido a esto se descartó cualquier posibilidad de que la ausencia de este gen tuviera un efecto sobre la inmunogenicidad de MVA.

Como primera medida, se analizó mediante técnicas de biología molecular que los genes seleccionados (*C12L, A44L* y *A46R*) habían sido efectivamente eliminados del genoma de MVA. Se realizaron PCRs a partir del genoma de los vectores generados y en ningún caso se detectó amplificación de los genes, como tampoco se evidenció la presencia de ARN mensajero específico por RT-PCR en cultivos infectados.

A continuación, se estudió si la deleción de los genes seleccionados afectaba de alguna manera la replicación y/o capacidad infectiva de los virus delecionados en relación al MVAwt. Mediante curvas de crecimiento realizadas en la línea celular BHK-21, permisiva para MVA, se determinó *in vitro* la cantidad de virus presente en las fases intra y extracelular y se concluyó que ninguno de los genes

afectaba la replicación viral. Asimismo, la capacidad de infectar células presentadoras de antígeno, como la línea celular THP-1 (derivadas de monocitos humanos) no se vio alterada en el vector MVAΔA44L-A46R ni en el MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, con respecto al MVAwt.

Estos resultados indican que los genes delecionados no solo no afectaron la eficiencia en la cinética de multiplicación viral, sino que además continúan manteniendo la misma capacidad de infectar y expresar genes virales en una línea celular macrofágica en comparación con el vector MVAwt.

Luego de demostrar molecularmente la ausencia de los genes, y que estos no resultan necesarios para la replicación del virus, se consideró relevante analizar si la ausencia de los mismos se traducía en una falta, o al menos en la disminución, de la función biológica específica del gen asociada con la evasión de la respuesta inmune del huésped. En algunos casos, a pesar de estar ausentes los genes, las funciones biológicas pueden llegar a verse reemplazadas por la presencia de genes redundantes, o la mera infección en el contexto celular podría no reflejar biológicamente la deleción de los genes seleccionados. Es importante destacar que de los numerosos trabajos relacionados con esta estrategia de optimización de vectores que incluye la deleción de genes inmunomoduladores, son escasas las publicaciones en las que se evalúa conjuntamente la ausencia de la actividad biológica relacionada con el gen eliminado [84, 171, 172].

Como se mencionó al inicio de este trabajo de tesis, el gen *C12L* codifica para una proteína de unión a IL-18 (IL-18bp), citoquina descripta en 1989 como el "factor de inducción de IFN-γ" [173] y que, al igual que la IL-1β, es sintetizada como un precursor inactivo que posteriormente se cliva y es secretado al exterior celular [174]. Una vez allí, se une a la cadena α del receptor de IL-18, formando un complejo que recluta a la cadena β del mismo, y de esta forma activa la vía de señalización de NF-κβ que finaliza con la producción de IFN-γ. La IL-18bp endógena, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas [175], se secreta en forma constitutiva y actúa como un regulador natural de la actividad proinflamatoria de IL-18, ya que posee una alta afinidad por esta citoquina, incluso significativamente mayor a la afinidad de unión a la cadena α del receptor [176]. De esta manera, al

unirse la IL-18bp a la IL-18 se disminuye la producción de IFN-γ y de otras citoquinas pro-inflamatorias [177].

En un trabajo anterior de nuestro grupo, se demostró la actividad biológica de *C12L* mediante un ensayo en donde la presencia de la IL-18bp proveniente del sobrenadante de células infectadas con MVAwt, inhibía la producción de IFN-γ en esplenocitos activados [90]. En este trabajo de tesis se reprodujo el mismo tipo de ensayo, pero en este caso para determinar la presencia/ausencia de la actividad de este gen en los dos nuevos vectores generados (MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R). Consistentemente con lo descripto en el trabajo de *Falivene* y colaboradores, se observó un aumento en la producción de IFN-γ solo cuando el gen *C12L* se encontraba ausente, es decir, en la que se utilizó al vector MVAΔC12L/ΔA44L-A46R.

En relación a la función biológica de A44 (enzima con similitud a la 3β-HSD humana) son pocos los reportes en los que se describe la actividad biológica de esta proteína viral. Sólo existe un trabajo que data de 1998 en el que se detalla la actividad de esta enzima para diversas líneas de VACV, incluyendo el MVA [111]. En este trabajo de tesis se describe la presencia de la actividad enzimática de la proteína A44 en el contexto de la infección por el virus MVA, evidenciada en un ensayo *in vitro* de cultivos celulares infectados con los distintos vectores, en el cual se midió la conversión de progesterona a partir de pregnenolona exógena por parte de la enzima aportada por el vector MVAwt, y consistentemente con este resultado, la ausencia de producción de esteroides en las células infectadas con los MVA delecionados (MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R).

Finalmente, se evaluó el efecto de la ausencia del gen *A46R* mediante la cuantificación de marcadores pro-inflamatorios producidos luego de la infección de la línea celular THP-1 con los distintos vectores estudiados (MVAwt, MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R). La línea celular THP-1 deriva de monocitos humanos, y para estos ensayos las células fueron diferenciadas a macrófagos adherentes. Como ya se detalló en la Introducción, está reportado que la proteína A46 interrumpe las vías de señalización de ciertos receptores TLR ya que se asocia al dominio TIR de

estos, impidiendo la unión de proteínas adaptadoras como MyD88, Mal, TRIF y TRAM, bloqueando de esta manera, la interacción con el receptor. Esto trae como consecuencia una disminución tanto en la producción de citoquinas pro-inflamatorias como de interferones de tipo I [96, 98]. Esto fue demostrado en el trabajo de *Stack* y colaboradores [96] donde estimularon células HEK estables para el receptor TLR-4 con LPS y al mismo tiempo las transfectaron con cantidades crecientes de A46, y determinaron mediante la expresión de IL-8 el nivel de activación de la vía de TLR-4. Con este ensayo *in vitro*, lograron determinar cómo la proteína A46 era capaz de bloquear la acción de MyD88, ya que la producción de IL-8 disminuía en función del aumento de A46. Por otro lado, estudios previos demostraron que la producción de la IL-1β madura luego de la infección con MVA requiere de un *crosstalk* entre el TLR-2 acompañado del adaptador MyD88 y el inflamosoma NALP-3 [178]. Es por eso que en este caso se optó por la medición de IL-1β como uno de los últimos productos provenientes de la activación de vías que contienen al adaptador MyD88. En este caso se logró determinar un aumento de IL-1β en los sobrenadantes de THP-1 infectadas con MVAΔA44L-A46R o MVAΔC12L/ΔA44L-A46R comparados con el MVAwt, lo cual fue un indicio de la ausencia de función biológica del gen *A46R* en los MVA delecionados.

Los estudios de inmunogenicidad mostraron que las respuestas T-CD8$^+$ y T-CD4$^+$ contra epítopes de VACV resultaron significativamente incrementadas a los 7 días post-infección en los animales inoculados con MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R. Esto se determinó por ensayos de ELISPOT y ELISA, donde el número de células productoras de IFN-γ e IL-2 (específicas frente a epítopes VACV) se vio aumentado en los grupos que incluyeron a los vectores delecionados, como así también la producción específica de IFN-γ y TNF-α determinados en los sobrenadantes de esplenocitos estimulados con péptidos de VACV. Más importante aún, y teniendo en cuenta que la finalidad de la optimización de este vector es en última instancia ser utilizado como plataforma para el desarrollo de vacunas, la respuesta adaptativa que se despliegue en la fase de memoria es de suma importancia. En este sentido, al evaluar la respuesta celular frente a epítopes CD4$^+$ como CD8$^+$ a los 45 días post-infección, las diferencias entre el MVAwt y los vectores delecionados observadas

en la etapa aguda de la respuesta inmune no solo se mantuvieron, sino que en algunos casos estas diferencias fueron incrementadas.

Otra característica importante a ser evaluada en cuanto a la respuesta inmune inducida por un vector además de la magnitud, es la calidad de la respuesta generada. En este caso, analizamos este aspecto en términos de la capacidad de degranulación de las células T-CD8$^+$ simultáneamente con la capacidad de secretar IFN-γ. Los animales inmunizados con los vectores delecionados generaron mayores niveles de células T-CD8$^+$ positivas para los marcadores CD107a y CD107b y a su vez para IFN-γ, en relación al MVAwt. Esta bifuncionalidad de células T-CD8$^+$ evaluada por citometría de flujo, ha sido asociada en trabajos previos a su eficacia *in vivo*, ya que se observó que se relaciona en forma directa con un mejor estado clínico en pacientes infectados con HIV [179].

Las células T de memoria constituyen, junto con las B de memoria, las bases de la memoria inmunológica. Se generan luego de la exposición a los diversos patógenos durante los primeros 10 a 20 años de vida, y su proporción y funcionalidad se mantienen estables durante toda la adultez, hasta los 65-70 años donde comienza la etapa de inmunosenescencia [180]. El compartimento de células T de memoria luego del segundo encuentro con el antígeno, logra ejercer rápidamente su funcionalidad efectora, ya sea eliminando a las células infectadas y/o secretando citoquinas inflamatorias que inhiban la replicación del patógeno [181]. Esto, sumado a su localización anatómica, cercana a los sitios de entrada de patógenos como a su longevidad, debido a la posibilidad de auto-renovación, le proporcionan la capacidad de conferir inmunidad protectiva a largo plazo, transformándose en uno de los compartimentos celulares más importantes relacionados con la protección frente a diversos patógenos. De este contexto se puede deducir la importancia de este compartimento celular en cuanto a la protección frente a patógenos, y que la inducción de altos niveles de células de memoria efectiva es una finalidad que se pretende lograr tras una vacunación.

En humanos, las células de memoria se distinguen clásicamente por la expresión del antígeno común de leucocitos CD45 en su variante de *splicing* más liviana conocida como CD45RO y la ausencia de la

isoforma más pesada CD45RA (CD45RO^{+}CD45RA^{-}), dentro de la cual se pueden distinguir a su vez, otras subpoblaciones de memoria de carácter heterogéneo y con diversas funciones. En 2004, *Sallusto* y colaboradores [182] identificaron esta diversidad celular en sangre periférica basándose en la expresión del marcador CCR7, receptor de quimioquinas que dirige a las células a ganglios linfáticos (*homing*). En función de la combinación de estos marcadores, los autores identificaron a las células *naïve* o "sin activar" como aquellas que expresan predominantemente el receptor CCR7, como reflejo de su paso por los tejidos linfáticos; mientras que las células T de memoria las subdividieron en T de memoria central CD45RA^{-}CCR7^{+} (T_{MC}), situadas en órganos linfáticos y T de memoria efectora CD45RA^{-}CCR7^{-} (T_{ME}) las cuales son capaces de migrar a los tejidos periféricos. En los últimos años, y con la posibilidad de incluir aún más marcadores celulares, se identificó una nueva subpoblación celular denominada células *stem-cell* de memoria (T_{SCM}), semejantes a la población *naïve* (CD45RA^{+}CD45RO^{-}CCR7^{+}) pero que a su vez expresan la cadena β para el receptor de IL-2 (IL-2Rβ), CD95, CXCR3 y LFA-1 [183].

Las células T_{ME} se caracterizan por poseer una gran capacidad de producir IFN-γ (característico de funciones efectoras asociadas particularmente a perfiles Th1 o citotóxicos), mientras que la secreción de IL-2, asociada a la proliferación celular T y expansión clonal, es prácticamente nula. En el polo opuesto se encuentra la población de las T_{SCM} con gran capacidad de síntesis de IL-2 pero baja de IFN-γ. Por su parte las células T_{MC} son las encargadas de producir los más altos niveles de IL-2, y en consecuencia poseen la mayor capacidad proliferativa, y los niveles de secreción de IFN-γ pueden considerarse intermedias entre las T_{ME} y T_{SCM} [180].

Estas poblaciones celulares tienen su correlato fenotípico y funcional en ratones, definiéndose como se detalló en Resultados en base a la combinación de los marcadores CD44 y CD62L [134, 137-139, 174], sumando a la población CD44^{-}CD62L^{-} de células efectoras [184], que en este trabajo se denominaron como "memoria efectora terminal", aunque en otros trabajos las caracterizan como "efectoras activadas" [185].

Teniendo en cuenta esto último, se analizó la distribución de las distintas subpoblaciones de memoria dentro de las células T-CD8$^+$ bifuncionales, y como era de esperarse, el mayor porcentaje de células positivas para CD107a/b e IFN-γ se concentró alrededor de las T de memoria efectoras (T_{ME}). Es importante remarcar que la diferencia observada en cuanto al MVAwt y los MVA delecionados en relación a la proporción de T-CD8$^+$ bifuncionales, se mantuvo al realizar este sub-análisis. Con lo cual, se puede pensar que esa diferencia observada a nivel de células T-CD8$^+$ totales estaba aportada casi en su totalidad por el compartimento de memoria efectora. Estos resultados son comparables a los obtenidos por *García-Arriaza* y colaboradores [186], donde utilizaron un vector MVA delecionado para *C6L*, *K7R*, y *A46R* recombinante para antígenos del virus *Chikungunya* (CHIKV). En este trabajo observaron que el porcentaje de células de memoria T-CD8$^+$ específicas para CHIKV fue mayor en los animales inmunizados con el vector delecionado recombinante para CHIKV, en relación a los que recibieron el MVAwt recombinante, y particularmente la mayor proporción se vio en la subpoblación de células de memoria efectora (T_{ME}). En otro trabajo de los mismos autores [86], pero donde utilizaron un esquema de vacunación ADN-MVA contra HIV, observaron que la inducción de células de memoria T-CD8$^+$ específicas era mayor en el esquema que incluía el MVA delecionado (en este caso para el gen *N2L,* inhibidor de IRF3) frente al MVAwt, y en concordancia con lo anterior, el mayor porcentaje estaba dado dentro de las células T de memoria efectora (T_{ME}). Los resultados de este trabajo de tesis, junto con los descriptos anteriormente [86, 186] indican que el MVA como vector vacunal es un potente inductor de células T de memoria, especialmente de memoria efectora, característica que se ve potenciada cuando se incluyen deleciones de ciertos genes inmunomoduladores.

Además de la bifuncionalidad y la generación de células de memoria específicas, otra propiedad deseable que se pretende forme parte de una vacuna y que define la calidad de la respuesta inducida [27], es la capacidad proliferativa de las células luego del segundo encuentro con el antígeno. En estos ensayos, logramos detectar que los niveles de proliferación en células T específicas para VACV, tanto para T-CD4$^+$ como para T-CD8$^+$ en aquellos animales que habían sido inmunizados con los

vectores delecionados fueron significativamente mayores en relación al grupo MVAwt, y notablemente, el grupo inmunizado con el MVAΔC12L/ΔA44L-A46R fue el que mostró la mayor capacidad proliferativa. Haciendo un análisis más minucioso de cuáles eran las subpoblaciones de memoria involucradas en la proliferación frente al estímulo específico, se observó que en el caso de las T-CD4$^+$ las diferencias con el MVAwt y el MVAΔA44L-A46R se daban a lo largo de los cuatro compartimentos de memoria (*stem-cell* de memoria, memoria central, memoria efectora y memoria efectora terminal); mientras que en el caso de las T-CD8$^+$, la diferencia se vio solo en las células de memoria central y memoria efectora.

Los vectores vacunales derivados de poxvirus han sido percibidos en el campo del desarrollo de vacunas como pobres inductores de una respuesta de anticuerpos [20]. Sin embargo en los últimos años, resultados de numerosos ensayos clínicos en humanos como estudios en modelos animales, sugieren que estos vectores pueden ser utilizados exitosamente para estimular la producción de anticuerpos por parte de células B [69, 187-189]. Es por eso que se midieron, en la etapa de memoria, los niveles de IgG total, IgG1 e IgG2a, en el suero de ratones inmunizados con los distintos vectores. Se encontraron altos niveles de anticuerpos generados frente a VACV, sin embargo, no se encontraron diferencias entre los niveles inducidos por el MVAwt con respecto a los MVA delecionados. Una posible explicación podría deberse a los resultados obtenidos luego de la caracterización de la respuesta inmune innata (discutido más adelante), donde se observó un aumento de citoquinas relacionadas principalmente con la promoción de respuestas inmunes celulares, por parte del vector MVAΔC12L/ΔA44L-A46R.

Debido a que el enfoque de este trabajo de tesis no estaba centrado en el estudio de la respuesta humoral generada por la inmunización con MVA, no se profundizó el análisis de la respuesta de anticuerpos. En este sentido, si se hubiera realizado una cuantificación de anticuerpos por el método de dilución límite, quizá se hubieran podido hallar diferencias significativas entre los grupos, o la ausencia de diferencias entre ellos hubiese cobrado más robustez.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, observamos que si bien a nivel de magnitud de la respuesta, ambos vectores delecionados no mostraban diferencias entre ellos, al estudiar más en detalle la calidad de la misma, observamos que el vector con las tres deleciones tuvo un mejor desempeño. Es por ello que, en la siguiente parte de este trabajo de tesis, se continuó con la caracterización del vector MVAΔC12L/ΔA44L-A46R en relación al MVAwt.

Con la finalidad de profundizar el estudio de la capacidad citotóxica de las células T generadas luego de la inmunización con los distintos MVAs, la cual fue caracterizada previamente a través de la presencia del marcador CD107, se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vivo*. Si bien en las condiciones ensayadas no observamos diferencias entre los vectores, sí se pudo demostrar fehacientemente la capacidad citotóxica de estas células T-CD8^{+}. Posteriormente, se realizó un ensayo de funcionalidad *in vitro*, en condiciones más controladas, y en este caso se pudo observar una mayor capacidad citotóxica en las células provenientes del grupo inmunizado con el vector MVAΔC12L/ΔA44L-A46R con respecto al MVAwt, confirmando de alguna manera lo observado por citometría de flujo en cuanto a la expresión del marcador de degranulación CD107. Este tipo de ensayos funcionales ya sean *in vitro*, o mejor aún *in vivo*, son de gran importancia cuando se quiere evaluar la capacidad citotóxica de las células ya que no solo contemplan la interacción entre las mismas (células efectoras y células blanco) sino que además tienen en cuenta, especialmente en el ensayo *in vivo*, el microambiente en el cual se desarrollan, pudiendo brindar de esta manera mayor información que la otorgada por la caracterización *in vitro* a través de la expresión de marcadores de superficie.

Si bien se ha reportado que los genes *A44L*, *A46R* y *C12L* contribuyen a la virulencia de infecciones por VACV [91, 96, 105, 190], los distintos análisis de diversos trabajos en cuanto a los efectos de la deleción de estos genes son, en cierta forma, contradictorios. Trabajos como el de *Perdiguero* y colaboradores [100] o el de nuestro grupo [90] refieren el aumento de inmunogenicidad en vectores atenuados derivados de Vaccinia (como NYVAC o MVA) luego de delecionar estos genes

inmunomoduladores. Sin embargo, otros autores que emplearon el sistema MVA-BAC para delecionar genes del genoma de MVA reportaron que ni la ausencia de *A46R* ni de *A44L* del genoma de MVA resultaron en una mejora en la respuesta celular T [102]. Más recientemente, los mismos autores reportaron que la deleción en *cluster* de numerosos genes inmunomoduladores (incluyendo *B15R*, *A46R*, *A44L* entre otros) también fracasó en aumentar la frecuencia de células T-CD8$^+$ frente a antígenos específicos, tanto en una etapa aguda de la respuesta como de memoria [101]. Por su parte, *Summer* y colaboradores reportaron que la deleción en conjunto de los genes inmunomoduladores *C6L*, *K7R* y *N1L* del genoma de VACV logró atenuar el vector, pero esto no se vio reflejado, acorde a los autores, en un aumento de la inmunogenicidad [169].

Los diferentes procedimientos metodológicos podrían explicar las discrepancias que se observan entre diversos trabajos, pero existen características importantes que deben ser evaluadas con el fin de determinar si la eliminación de ciertos genes, aumenta efectivamente la inmunogenicidad de un vector. Entre estos aspectos importantes, la evaluación de la ausencia de función biológica de los genes en cuestión (la cual ya fue discutida previamente) es un factor primordial como así también, el análisis *in vivo* de la respuesta innata generada por los nuevos vectores modificados. En este sentido, en el trabajo de *Perdiguero* y colaboradores [100], la respuesta innata fue demostrada de manera indirecta, sin embargo en ninguno de los trabajos en los que se empleó la plataforma MVA-BAC para delecionar *C12L*, *A44L* y *A46R* [101, 102], o en el que delecionaron genes a partir de la cepa replicativa de VACV [169], demostraron que los nuevos vectores delecionados indujeran cambios en la respuesta innata del huésped o, en última instancia, en las vías de señalización en la que estos genes están involucrados.

La respuesta inmune adaptativa primaria frente a la mayoría de los patógenos es iniciada en los ganglios linfáticos regionales que drenan los sitios periféricos a la exposición al antígeno. Este principio también aplica a la vacunación [191], es por esto que el análisis de la respuesta innata generada en los ganglios linfáticos resulta de suma importancia.

En un trabajo reciente, se analizó la respuesta innata *in vivo* contra MVA cuantificando citoquinas en suero luego de una inoculación intravenosa, la cual no es una vía utilizada frecuentemente como ruta de inmunización [192]. En muchos otros trabajos en los que se realizaron estudios sobre MVA delecionados [78, 101, 102, 167] no se incluyeron ensayos en los que se haya realizado una caracterización de la respuesta innata inducida por el vector delecionado. Nuestros resultados demostraron que a tiempos cortos post-inmunización, entre las 4 y las 30 horas, el vector MVAΔC12L/ΔA44L-A46R indujo altos niveles de IL-12 e IFN-γ con respecto al MVAwt en ganglios inguinales y suero, respectivamente. Estas citoquinas son clave en la generación de una respuesta inmune celular por parte de la población T [193-195]. La IL-12 actúa directamente sobre las células T y células NK favoreciendo la producción de IFN-γ y la proliferación de estos tipos celulares, una vez activados. Además, promueve la generación de linfocitos T citotóxicos y aumenta la actividad citotóxica induciendo la expresión de genes relacionados con granzimas y perforinas [196]. Conjuntamente, el vector MVAΔC12L/ΔA44L-A46R también indujo un mayor aumento de IL-1β en relación al MVAwt. Por su parte, se ha reportado que esta citoquina tiene efectos relacionados al mejoramiento de células T-CD4$^+$ [197], y la respuesta antígeno específica de células T-CD8$^+$ [198]. Por otro lado, la presencia de IL-1β a su vez, favorece la producción de IL-12 por parte de células NK [199] y células dendríticas, y el sinergismo de ambas citoquinas en células T promueve la producción de IFN-γ [200], estimulando aún más el desarrollo de respuestas de tipo Th1.

Finalmente, se observó una tendencia en la que el vector que incluía las tres deleciones (MVAΔC12L/ΔA44L-A46R) indujo niveles de ARNm de IFN-β superiores a los generados por los ratones inmunizados con el MVAwt. Este mediador antiviral es considerado como una "tercer señal" sumamente importante en la generación de respuesta de memoria ya que se postula que tiene la capacidad de modelar los conjuntos de células T efectoras y de memoria [201]. Asimismo, estudios previos demostraron que la producción de interferones de tipo I juega un rol esencial para vincular la respuesta inmune innata y adaptativa frente a infecciones por VACV [202] y que, además, el IFN-β es capaz de promover la expansión de células T-CD8$^+$ específicas para MVA [142].

Una de las limitaciones de este trabajo de tesis radica en que no se generaron vectores con las deleciones simples de los genes seleccionados (MVAΔA44L, MVAΔA46R), de manera de comparar la respuesta generada por estos en relación al MVAΔA44L-A46R o el MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, como tampoco se realizaron revertantes para reintroducir los genes eliminados. Por otro lado, no se realizaron ensayos de desafío de los animales inmunizados con cepas virulentas (como la cepa replicativa WR) sin embargo, mediante ensayos de citotoxicidad se pudo observar que las células T generadas fueron capaces de responder funcionalmente frente a los antígenos.

Finalmente, a los vectores utilizados no se les introdujo ningún epítope foráneo como algún antígeno de HIV, *Mycobacterium tuberculosis* o *Plasmodium falciparum* para determinar cómo era la respuesta inmune generada frente al mismo. Este punto, si bien es una limitante del trabajo, deja abierta la posibilidad de continuar con esta línea de trabajo ya que, habiendo obtenido resultados alentadores en cuanto a la respuesta generada frente al mismo vector, es factible generar un recombinante utilizando como plataforma el vector MVAΔC12L/ΔA44L-A46R, que fue aquel que demostró el mejor desempeño en cuanto a la respuesta inmune generada.

Pese a las limitaciones presentadas, en este trabajo se logró demostrar que la deleción conjunta de los genes inmunomoduladores *A44L, A46R* y *C12L* generó una respuesta inmune adaptativa de mayor magnitud y mejor calidad, acompañada de una mejor respuesta en la etapa innata. Estas características, sumadas a la posibilidad de introducir prácticamente cualquier antígeno en el vector, lo posicionan como una de las plataformas para el desarrollo de vacunas más prometedoras.

Siguiendo con esta línea de trabajo, y en base a algunos resultados preliminares, en los próximos años se continuará con el estudio de la interacción de los vectores delecionados con el sistema inmune innato humano. En este sentido, y como medida del potencial vacunal de los vectores, se pretende evaluar la capacidad de los mismos de modular, en células presentadoras de antígeno, distintos mecanismos relacionados con la generación de posteriores respuestas adaptativas, como la regulación de la expresión de moléculas co-estimulatorias o el patrón de citoquinas secretadas. Este

análisis comenzó a realizarse con muestras humanas de donantes sanos, particularmente en poblaciones de monocitos provenientes de sangre periférica. No obstante, posiblemente una de las preguntas interesantes por responder se ve inmersa en el campo de la infección con HIV, donde aún no se han realizado estudios en profundidad que evalúen este potencial como vacuna en muestras de pacientes HIV^+ bajo tratamiento antiretroviral, de manera de determinar si los MVA delecionados podrían ofrecer alguna ventaja respecto del MVAwt. Actualmente se están evaluando posibles estrategias de cura de HIV a nivel experimental, donde se plantea la vacunación frente a antígenos del propio virus para potenciar respuestas citotóxicas, en grupos de pacientes infectados y que se encuentren bajo tratamiento. Muchas de estas vacunas están basadas en vectores MVA o adenovirales. Por otro lado, se estudiará el potencial vacunal de estos vectores delecionados combinados con antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, proyecto que se llevará a cabo en colaboración con el laboratorio de la Dra. Verónica García (IQUIBICEN-CONICET, FCEN, UBA).

VI. CONCLUSIONES

El motor de la ciencia es la curiosidad con las preguntas constantes: ¿Y eso cómo es? ¿En qué consiste? ¿Cómo funciona? Y lo más fascinante es que cada respuesta trae consigo nuevas preguntas. En eso los científicos les llevamos ventajas a los exploradores, cuando creemos haber llegado a la meta anhelada, nos damos cuenta de que lo más interesante es que hemos planteado nuevos problemas para explorar.

- César Milstein

En suma, este trabajo describe por primera vez que la deleción simultánea de los genes *A44L*, *A46R* y *C12L* (MVAΔC12L/ΔA44L-A46R) del genoma de MVA se trasladó en un aumento significativo de la respuesta adaptativa de células T-CD4$^+$ y T-CD8$^+$ frente a antígenos del propio vector, en términos de magnitud y calidad de la respuesta como también una mejor respuesta innata. Brevemente se detallan las principales conclusiones obtenidas a lo largo de este trabajo de tesis:

- Los genes *C12L*, *A44L* y *A46R* no son esenciales para la replicación viral de MVA.
- Los vectores delecionados (MVAΔA44L-A46R y MVAΔC12L/ΔA44L-A46R) generaron una respuesta T-CD4$^+$ y T-CD8$^+$ de mayor magnitud contra péptidos VACV en comparación al MVAwt, tanto en esplenocitos como en células de ganglio inguinal.
- Este aumento en la magnitud por parte de los MVA delecionados no solo se observó en la etapa aguda de la respuesta inmune adaptativa, sino que se mantuvo en la etapa de memoria.
- El vector MVAΔC12L/ΔA44L-A46R fue el que generó la respuesta inmune adaptativa de mejor calidad, ya que indujo una mayor proliferación de células T-CD4$^+$ y T-CD8$^+$ específicas, y mayor proporción de T-CD8$^+$CD107$^+$IFN-γ^+.
- Finalmente, este vector estimuló una mayor producción de mediadores solubles claves en el desarrollo de respuestas inmune celulares a tiempos cortos post-inmunización, en ganglios inguinales próximos al sitio de inoculación.

La estrategia adoptada en este trabajo en la cual se delecionaron genes inmunomoduladores de manera simultánea del genoma de MVA, logró aumentar la inmunogenicidad del vector generando una respuesta inmune robusta en los tejidos evaluados, optimizando las características del virus como vector vacunal. Esto lo convierte en una herramienta de gran utilidad y con gran potencial para

ser utilizado en el desarrollo de vacunas que requieran despertar potentes respuestas celulares ya sea con fines preventivos o terapéuticos. Es importante continuar investigando en este campo de manera de mejorar el diseño de regímenes de vacunación que finalmente resulten en el desarrollo de nuevas vacunas, sobretodo en áreas de extrema necesidad, como lo son HIV/SIDA, malaria, tuberculosis, y cáncer.

VII. REFERENCIAS

[…] si desean ardientemente investigar, deberían hacerlo por todos los medios. Nada debería interponerse al deseo intenso de dedicar la vida a la Ciencia. Si tienes el anhelo de llevar a cabo investigación científica […]: ¡hazlo! Difícilmente alguna otra cosa te dará tanta satisfacción y, sobre todo, tal sentido de logro.

Severo Ochoa

1. Alcami Antonio, D.I., Evans David , Huggins John W, Hughes Christine, Jahrling Peter B, McFadden Grant, Meyer Hermann, Moss Bernard, Shchelkunov Sergei, Stavskiy Evgeny, Tikunova Nina *Scientific review of variola virus research, 1999-2010*. 2010: WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.
2. *Biografías y Vidas: Edward Jenner*. 2004-2016; Available from: http://www.biografiasyvidas.com/biografia/j/jenner.htm.
3. Garçon Nathalie, S.P.L., Cunningham Anthony L. , *Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology*. 2011: Elsevier.
4. Nabel, G.J., *Designing tomorrow's vaccines.* N Engl J Med, 2013. **368**(6): p. 551-60.
5. Centers for Disease, C. and Prevention, *Ten great public health achievements--United States, 1900-1999.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1999. **48**(12): p. 241-3.
6. Hajj Hussein, I., et al., *Vaccines Through Centuries: Major Cornerstones of Global Health.* Front Public Health, 2015. **3**: p. 269.
7. Vaccines.gov. *Tipos de vacunas*. 2013 Available from: https://espanol.vaccines.gov/m%C3%A1s-informaci%C3%B3n/tipos/11jt/%C3%ADndice.html#live.
8. Camilla, K.R.S.a.F., *Classification of Vaccines* in *Subunit Vaccine Delivery, Advances in Delivery* S.S.B. Media, Editor. 2015: New York.
9. Russell, C.J. and J.L. Hurwitz, *Sendai virus as a backbone for vaccines against RSV and other human paramyxoviruses.* Expert Rev Vaccines, 2016. **15**(2): p. 189-200.
10. Kurup, D., et al., *Rhabdovirus-based vaccine platforms against henipaviruses.* J Virol, 2015. **89**(1): p. 144-54.
11. Ryder, A.B., et al., *Vaccination with Vesicular Stomatitis Virus-Vectored Chimeric Hemagglutinins Protects Mice against Divergent Influenza Virus Challenge Strains.* J Virol, 2016. **90**(5): p. 2544-50.
12. Higuchi, A., et al., *Recombinant Measles AIK-C Vaccine Strain Expressing the prM-E Antigen of Japanese Encephalitis Virus.* PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0150213.
13. Hansen, S.G., et al., *Cytomegalovirus vectors violate CD8+ T cell epitope recognition paradigms.* Science, 2013. **340**(6135): p. 1237874.
14. Graham, F.L. and L. Prevec, *Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines.* Biotechnology, 1992. **20**: p. 363-90.
15. Lemiale, F., et al., *Novel adenovirus vaccine vectors based on the enteric-tropic serotype 41.* Vaccine, 2007. **25**(11): p. 2074-84.
16. Barnes, E., et al., *Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man.* Sci Transl Med, 2012. **4**(115): p. 115ra1.
17. Afkhami, S., Y. Yao, and Z. Xing, *Methods and clinical development of adenovirus-vectored vaccines against mucosal pathogens.* Mol Ther Methods Clin Dev, 2016. **3**: p. 16030.
18. Moss B., S.G.L., Mackett M., *Use of vaccinia virus as an infectious molecular cloning and expression vector.* Gene Amplif Anal, 1983.
19. Im, E.J. and T. Hanke, *MVA as a vector for vaccines against HIV-1.* Expert Rev Vaccines, 2004. **3**(4 Suppl): p. S89-97.
20. Draper, S.J., M.G. Cottingham, and S.C. Gilbert, *Utilizing poxviral vectored vaccines for antibody induction-progress and prospects.* Vaccine, 2013. **31**(39): p. 4223-30.
21. Tartaglia, J., et al., *NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus.* Virology, 1992. **188**(1): p. 217-32.
22. Kreijtz, J.H., S.C. Gilbert, and G. Sutter, *Poxvirus vectors.* Vaccine, 2013. **31**(39): p. 4217-9.
23. Koup, R.A. and D.C. Douek, *Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a007252.
24. Kim, J.H., et al., *HIV vaccines: lessons learned and the way forward.* Curr Opin HIV AIDS, 2010. **5**(5): p. 428-34.
25. Kaiko, G.E., et al., *Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?* Immunology, 2008. **123**(3): p. 326-38.

26. Spellberg, B. and J.E. Edwards, Jr., *Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases.* Clin Infect Dis, 2001. **32**(1): p. 76-102.
27. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, *T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 247-58.
28. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells.* Blood, 2006. **107**(12): p. 4781-9.
29. Sun, Y., et al., *Magnitude and quality of vaccine-elicited T-cell responses in the control of immunodeficiency virus replication in rhesus monkeys.* J Virol, 2008. **82**(17): p. 8812-9.
30. Ahlers, J.D. and I.M. Belyakov, *Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory.* Blood, 2010. **115**(9): p. 1678-89.
31. Gilbert, S.C., *T-cell-inducing vaccines - what's the future.* Immunology, 2012. **135**(1): p. 19-26.
32. Rerks-Ngarm, S., et al., *Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand.* N Engl J Med, 2009. **361**(23): p. 2209-20.
33. Pantaleo, G., et al., *Poxvirus vector-based HIV vaccines.* Curr Opin HIV AIDS, 2010. **5**(5): p. 391-6.
34. Fenner, F. and F.M. Burnet, *A short description of the poxvirus group (vaccinia and related viruses).* Virology, 1957. **4**(2): p. 305-14.
35. Fenner, F., *Adventures with poxviruses of vertebrates.* FEMS Microbiol Rev, 2000. **24**(2): p. 123-33.
36. McFadden, G., *Poxvirus tropism.* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(3): p. 201-13.
37. Moss, B., *Poxvirus DNA replication.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(9).
38. Babkin, I.V. and I.N. Babkina, *The origin of the variola virus.* Viruses, 2015. **7**(3): p. 1100-12.
39. Shchelkunov, S.N., *An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections.* PLoS Pathog, 2013. **9**(12): p. e1003756.
40. Shchelkunov, S.N., E.V. Gavrilova, and I.V. Babkin, *Multiplex PCR detection and species differentiation of orthopoxviruses pathogenic to humans.* Mol Cell Probes, 2005. **19**(1): p. 1-8.
41. Moss, B., *Poxviridae: the viruses and their replication*, in *Fundamental Virology Fields*. 2001: Philadelphia. p. 1249-1283.
42. Jensen, O.N., et al., *Identification of the major membrane and core proteins of vaccinia virus by two-dimensional electrophoresis.* J Virol, 1996. **70**(11): p. 7485-97.
43. Griffiths, G., et al., *Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: thin-section analyses.* J Virol, 2001. **75**(22): p. 11056-70.
44. Griffiths, G., et al., *Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: isolated-particle analysis.* J Virol, 2001. **75**(22): p. 11034-55.
45. Harrison, S.C., et al., *Discovery of antivirals against smallpox.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11178-92.
46. Hiller, G., H. Eibl, and K. Weber, *Characterization of intracellular and extracellular vaccinia virus variants: N1-isonicotinoyl-N2-3-methyl-4-chlorobenzoylhydrazine interferes with cytoplasmic virus dissemination and release.* J Virol, 1981. **39**(3): p. 903-13.
47. Stern, W. and S. Dales, *Biogenesis of vaccinia: concerning the origin of the envelope phospholipids.* Virology, 1974. **62**(2): p. 293-306.
48. Shchelkunov S, M.S., Moyer R., *ORTHOPOXVIRUSES PATHOGENIC FOR HUMANS*. 2005, United States of America: Elsevier.
49. Broyles, S.S., *Vaccinia virus transcription.* J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 9): p. 2293-303.
50. Lin, C.L., et al., *Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo.* J Virol, 2000. **74**(7): p. 3353-65.
51. Hsiao, J.C., C.S. Chung, and W. Chang, *Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells.* J Virol, 1999. **73**(10): p. 8750-61.
52. Chung, C.S., et al., *A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate.* J Virol, 1998. **72**(2): p. 1577-85.

53. Chiu, W.L., et al., *Vaccinia virus 4c (A26L) protein on intracellular mature virus binds to the extracellular cellular matrix laminin.* J Virol, 2007. **81**(5): p. 2149-57.
54. Bengali, Z., A.C. Townsley, and B. Moss, *Vaccinia virus strain differences in cell attachment and entry.* Virology, 2009. **389**(1-2): p. 132-40.
55. Roberts, K.L. and G.L. Smith, *Vaccinia virus morphogenesis and dissemination.* Trends Microbiol, 2008. **16**(10): p. 472-9.
56. Mayr A., H.-M.V., Stickl H., *Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA* Infection, 1975.
57. Antoine, G., et al., *The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses.* Virology, 1998. **244**(2): p. 365-96.
58. Mayr, A., et al., *[The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)].* Zentralbl Bakteriol B, 1978. **167**(5-6): p. 375-90.
59. Meyer, H., G. Sutter, and A. Mayr, *Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence.* J Gen Virol, 1991. **72 (Pt 5)**: p. 1031-8.
60. Blanchard, T.J., et al., *Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine.* J Gen Virol, 1998. **79 (Pt 5)**: p. 1159-67.
61. Sutter, G. and B. Moss, *Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10847-51.
62. Verheust, C., et al., *Biosafety aspects of modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors used for gene therapy or vaccination.* Vaccine, 2012. **30**(16): p. 2623-32.
63. Meisinger-Henschel, C., et al., *Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara.* J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 12): p. 3249-59.
64. Dobson, B.M. and D.C. Tscharke, *Truncation of gene F5L partially masks rescue of vaccinia virus strain MVA growth on mammalian cells by restricting plaque size.* J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 2): p. 466-71.
65. Seet, B.T., et al., *Poxviruses and immune evasion.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 377-423.
66. Gomez, C.E., et al., *Clinical applications of attenuated MVA poxvirus strain.* Expert Rev Vaccines, 2013. **12**(12): p. 1395-416.
67. 2016 May 2014; Available from: https://ClinicalTrials.gov.
68. Cottingham, M.G. and M.W. Carroll, *Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths.* Vaccine, 2013. **31**(39): p. 4247-51.
69. Draper, S.J. and J.L. Heeney, *Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer.* Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(1): p. 62-73.
70. R, Q.B., et al., *Modified vaccinia virus Ankara as vaccine vectors in human and veterinary medicine.* Future Virology, 2014. **9(2)**: p. 173-187.
71. Mackowiak, M., et al., *Vaccination of wildlife against rabies: successful use of a vectored vaccine obtained by recombinant technology.* Adv Vet Med, 1999. **41**: p. 571-83.
72. Kim, J.H., J.L. Excler, and N.L. Michael, *Lessons from the RV144 Thai phase III HIV-1 vaccine trial and the search for correlates of protection.* Annu Rev Med, 2015. **66**: p. 423-37.
73. Romain Marlin, M.-T.N., Matteo Parenti, Nathalie Dereuddre-Bosquet, Françoise Barré-Sinoussi, Gabriella Scarlatti, Roger Le Grand, Elisabeth Menu *MISS-1 Study: Specific CD8+ T Cells and IgG Are Induced in the Female Reproductive Tract After Systemic MVA-HIV Vaccination*, in *HIVR4P* 2016: Chicago.
74. Lindsey R. Baden, S.R.W., Yehuda Z. Cohen, Michael S. Seaman, Jennifer A. Johnson, J Humberto Licona, Kathryn Stephenson, Joseph Nikolola, Lauren Peter, Jenny Hendriks, Maria G. Pau, Michal Sarnecki, Frank Tomaka, Julie Ake, Merlin Robb, Raphael Dolin, Dan H. Barouch, *First-in-human Clinical Trial Evaluating Mosaic HIV-1 Immunogens*, in *HIVR4P* 2016: Chicago.

75. Smith, G.L. and B. Moss, *Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA.* Gene, 1983. **25**(1): p. 21-8.
76. Sutter, G., M. Ohlmann, and V. Erfle, *Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase.* FEBS Lett, 1995. **371**(1): p. 9-12.
77. Parrino, J. and B.S. Graham, *Smallpox vaccines: Past, present, and future.* J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(6): p. 1320-6.
78. Staib, C., et al., *Inactivation of the viral interleukin 1beta receptor improves CD8+ T-cell memory responses elicited upon immunization with modified vaccinia virus Ankara.* J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 7): p. 1997-2006.
79. Clark, R.H., et al., *Deletion of gene A41L enhances vaccinia virus immunogenicity and vaccine efficacy.* J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 1): p. 29-38.
80. Rehm, K.E. and R.L. Roper, *Deletion of the A35 gene from Modified Vaccinia Virus Ankara increases immunogenicity and isotype switching.* Vaccine, 2011. **29**(17): p. 3276-83.
81. Rehm, K.E., et al., *Vaccinia virus A35R inhibits MHC class II antigen presentation.* Virology, 2010. **397**(1): p. 176-86.
82. Gedey, R., et al., *Poxviral regulation of the host NF-kappaB response: the vaccinia virus M2L protein inhibits induction of NF-kappaB activation via an ERK2 pathway in virus-infected human embryonic kidney cells.* J Virol, 2006. **80**(17): p. 8676-85.
83. Fischer, S.F., et al., *Modified vaccinia virus Ankara protein F1L is a novel BH3-domain-binding protein and acts together with the early viral protein E3L to block virus-associated apoptosis.* Cell Death Differ, 2006. **13**(1): p. 109-18.
84. Gomez, C.E., et al., *Removal of vaccinia virus genes that block interferon type I and II pathways improves adaptive and memory responses of the HIV/AIDS vaccine candidate NYVAC-C in mice.* J Virol, 2012. **86**(9): p. 5026-38.
85. Verardi, P.H., et al., *Vaccinia virus vectors with an inactivated gamma interferon receptor homolog gene (B8R) are attenuated In vivo without a concomitant reduction in immunogenicity.* J Virol, 2001. **75**(1): p. 11-8.
86. Garcia-Arriaza, J., et al., *Deletion of the vaccinia virus N2L gene encoding an inhibitor of IRF3 improves the immunogenicity of modified vaccinia virus Ankara expressing HIV-1 antigens.* J Virol, 2014. **88**(6): p. 3392-410.
87. Unterholzner, L., et al., *Vaccinia virus protein C6 is a virulence factor that binds TBK-1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7.* PLoS Pathog, 2011. **7**(9): p. e1002247.
88. Gonzalez, J.M. and M. Esteban, *A poxvirus Bcl-2-like gene family involved in regulation of host immune response: sequence similarity and evolutionary history.* Virol J, 2010. **7**: p. 59.
89. Garcia-Arriaza, J., et al., *A candidate HIV/AIDS vaccine (MVA-B) lacking vaccinia virus gene C6L enhances memory HIV-1-specific T-cell responses.* PLoS One, 2011. **6**(8): p. e24244.
90. Falivene, J., et al., *Improving the MVA vaccine potential by deleting the viral gene coding for the IL-18 binding protein.* PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32220.
91. Symons, J.A., et al., *The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model.* J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 11): p. 2833-44.
92. Smith, V.P., N.A. Bryant, and A. Alcami, *Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins.* J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 5): p. 1223-30.
93. Novick, D., et al., *Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response.* Immunity, 1999. **10**(1): p. 127-36.
94. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
95. Honda, K., A. Takaoka, and T. Taniguchi, *Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors.* Immunity, 2006. **25**(3): p. 349-60.
96. Stack, J., et al., *Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence.* J Exp Med, 2005. **201**(6): p. 1007-18.

97. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation.* Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
98. Bowie, A., et al., *A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10162-7.
99. Inc, T.F.S. 2015; Available from: https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/cell-analysis/signaling-pathways.html.
100. Perdiguero, B., et al., *Deletion of the vaccinia virus gene A46R, encoding for an inhibitor of TLR signalling, is an effective approach to enhance the immunogenicity in mice of the HIV/AIDS vaccine candidate NYVAC-C.* PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74831.
101. Alharbi, N.K., et al., *Deletion of Fifteen Open Reading Frames from Modified Vaccinia Virus Ankara Fails to Improve Immunogenicity.* PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0128626.
102. Cottingham, M.G., et al., *Recombination-mediated genetic engineering of a bacterial artificial chromosome clone of modified vaccinia virus Ankara (MVA).* PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1638.
103. Haga, I.R. and A.G. Bowie, *Evasion of innate immunity by vaccinia virus.* Parasitology, 2005. **130 Suppl**: p. S11-25.
104. Morel, Y., et al., *Structure-function relationships of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: contribution made by the molecular genetics of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency.* Steroids, 1997. **62**(1): p. 176-84.
105. Reading, P.C., J.B. Moore, and G.L. Smith, *Steroid hormone synthesis by vaccinia virus suppresses the inflammatory response to infection.* J Exp Med, 2003. **197**(10): p. 1269-78.
106. Rasmussen, M.K., B. Ekstrand, and G. Zamaratskaia, *Regulation of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta(5)-Delta(4) isomerase: a review.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(9): p. 17926-42.
107. Singh N, J.R., Tucker M. J, *Mechanisms of glucocorticoid-mediated antiinflammatory and immunosuppressive action.* Paediatric and Perinatal Drug Therapy, 2005. **Vol. 6, No. 2.** : p. pp. 107-115.
108. Boumpas, D.T., et al., *Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates.* Ann Intern Med, 1993. **119**(12): p. 1198-208.
109. QIAGEN. 2009; Available from: https://www.qiagen.com/fi/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=57.
110. Moore, J.B. and G.L. Smith, *Steroid hormone synthesis by a vaccinia enzyme: a new type of virus virulence factor.* Embo J, 1992. **11**(9): p. 3490.
111. Sroller, V., et al., *Effect of 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene deletion on virulence and immunogenicity of different vaccinia viruses and their recombinants.* Arch Virol, 1998. **143**(7): p. 1311-20.
112. Tscharke, D.C., P.C. Reading, and G.L. Smith, *Dermal infection with vaccinia virus reveals roles for virus proteins not seen using other inoculation routes.* J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 8): p. 1977-86.
113. Carroll, M.W. and B. Moss, *Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line.* Virology, 1997. **238**(2): p. 198-211.
114. Ferrer, M.F., et al., *Recombinant MVA expressing secreted glycoprotein D of BoHV-1 induces systemic and mucosal immunity in animal models.* Viral Immunol, 2011. **24**(4): p. 331-9.
115. Earl, P.L., et al., *Generation of recombinant vaccinia viruses.* Curr Protoc Mol Biol, 2001. **Chapter 16**: p. Unit16 17.
116. Earl, P.L., et al., *Preparation of cell cultures and vaccinia virus stocks.* Curr Protoc Mol Biol, 2001. **Chapter 16**: p. Unit16 16.
117. Gomez, C.E., et al., *Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice.* J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 9): p. 2473-8.
118. Tscharke, D.C., et al., *Identification of poxvirus CD8+ T cell determinants to enable rational design and characterization of smallpox vaccines.* J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 95-104.

119. Moutaftsi, M., et al., *Vaccinia virus-specific CD4+ T cell responses target a set of antigens largely distinct from those targeted by CD8+ T cell responses.* J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6814-20.
120. Joklik, W.K., *The purification fo four strains of poxvirus.* Virology, 1962. **18**: p. 9-18.
121. Gherardi, M.M., et al., *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, 2004. **172**(10): p. 6209-20.
122. Quah, B.J., H.S. Warren, and C.R. Parish, *Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester.* Nat Protoc, 2007. **2**(9): p. 2049-56.
123. Ramirez, J.C., M.M. Gherardi, and M. Esteban, *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.* J Virol, 2000. **74**(2): p. 923-33.
124. Maeto, C., et al., *Novel mucosal DNA-MVA HIV vaccination in which DNA-IL-12 plus cholera toxin B subunit (CTB) cooperates to enhance cellular systemic and mucosal genital tract immunity.* PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107524.
125. Nakagawa, Y., et al., *One-step simple assay to determine antigen-specific cytotoxic activities by single-color flow cytometry.* Biomed Res, 2011. **32**(2): p. 159-66.
126. *Real-Time PCR Handbook*. 3rd Edition ed. 2014.
127. Gallego-Gomez, J.C., et al., *Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells.* J Virol, 2003. **77**(19): p. 10606-22.
128. Park, E.K., et al., *Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli.* Inflamm Res, 2007. **56**(1): p. 45-50.
129. Toda, Y., et al., *Autocrine induction of the human pro-IL-1beta gene promoter by IL-1beta in monocytes.* J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1984-91.
130. Caldwell, A.B., et al., *Network dynamics determine the autocrine and paracrine signaling functions of TNF.* Genes Dev, 2014. **28**(19): p. 2120-33.
131. Betts, M.R., et al., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation.* J Immunol Methods, 2003. **281**(1-2): p. 65-78.
132. Einarsdottir, T., E. Lockhart, and J.L. Flynn, *Cytotoxicity and secretion of gamma interferon are carried out by distinct CD8 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection.* Infect Immun, 2009. **77**(10): p. 4621-30.
133. Pantaleo, G. and R.A. Koup, *Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know.* Nat Med, 2004. **10**(8): p. 806-10.
134. Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich, *CD44: from adhesion molecules to signalling regulators.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 33-45.
135. Pure, E. and C.A. Cuff, *A crucial role for CD44 in inflammation.* Trends Mol Med, 2001. **7**(5): p. 213-21.
136. Rosen, S.D., *Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond.* Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 129-56.
137. Rosenblum, M.D., S.S. Way, and A.K. Abbas, *Regulatory T cell memory.* Nat Rev Immunol, 2016. **16**(2): p. 90-101.
138. Zhang, Y., et al., *Host-reactive CD8+ memory stem cells in graft-versus-host disease.* Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1299-305.
139. Gattinoni, L., et al., *Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells.* Nat Med, 2009. **15**(7): p. 808-13.
140. Seth, R.B., L. Sun, and Z.J. Chen, *Antiviral innate immunity pathways.* Cell Res, 2006. **16**(2): p. 141-7.

141. Dai, P., et al., *Modified vaccinia virus Ankara triggers type I IFN production in murine conventional dendritic cells via a cGAS/STING-mediated cytosolic DNA-sensing pathway.* PLoS Pathog, 2014. **10**(4): p. e1003989.
142. Frenz, T., et al., *Concomitant type I IFN receptor-triggering of T cells and of DC is required to promote maximal modified vaccinia virus Ankara-induced T-cell expansion.* Eur J Immunol, 2010. **40**(10): p. 2769-77.
143. *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System*. 2001. p. 3-10.
144. Smith, G.L., B.R. Murphy, and B. Moss, *Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(23): p. 7155-9.
145. H., M., *Summary report on first, second and third generation smallpox vaccines*. 2013, WHO; Paul Ehrlich Institut.
146. Brown, S.W. and M. Mehtali, *The Avian EB66(R) Cell Line, Application to Vaccines, and Therapeutic Protein Production.* PDA J Pharm Sci Technol, 2010. **64**(5): p. 419-25.
147. Jordan, I., et al., *An avian cell line designed for production of highly attenuated viruses.* Vaccine, 2009. **27**(5): p. 748-56.
148. Brave, A., et al., *A new multi-clade DNA prime/recombinant MVA boost vaccine induces broad and high levels of HIV-1-specific CD8(+) T-cell and humoral responses in mice.* Mol Ther, 2007. **15**(9): p. 1724-33.
149. Reyes-Sandoval, A., et al., *Prime-boost immunization with adenoviral and modified vaccinia virus Ankara vectors enhances the durability and polyfunctionality of protective malaria CD8+ T-cell responses.* Infect Immun, 2010. **78**(1): p. 145-53.
150. Zhou, Y. and N.J. Sullivan, *Immunology and evolvement of the adenovirus prime, MVA boost Ebola virus vaccine.* Curr Opin Immunol, 2015. **35**: p. 131-6.
151. Ramshaw, I.A. and A.J. Ramsay, *The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination.* Immunol Today, 2000. **21**(4): p. 163-5.
152. Gherardi, M.M. and M. Esteban, *Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors.* J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 11): p. 2925-36.
153. Gilbert, S.C., et al., *Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis.* Vaccine, 2006. **24**(21): p. 4554-61.
154. Gherardi, M.M., et al., *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 genitorectal draining lymph nodes.* J Virol, 2003. **77**(12): p. 7048-57.
155. Rollier, C.S., A.V. Hill, and A. Reyes-Sandoval, *Influence of adenovirus and MVA vaccines on the breadth and hierarchy of T cell responses.* Vaccine, 2016. **34**(38): p. 4470-4.
156. Sheehy, S.H., et al., *Phase Ia clinical evaluation of the safety and immunogenicity of the Plasmodium falciparum blood-stage antigen AMA1 in ChAd63 and MVA vaccine vectors.* PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31208.
157. Sheehy, S.H., et al., *Phase Ia clinical evaluation of the Plasmodium falciparum blood-stage antigen MSP1 in ChAd63 and MVA vaccine vectors.* Mol Ther, 2011. **19**(12): p. 2269-76.
158. Bejon, P., et al., *Immunogenicity of the candidate malaria vaccines FP9 and modified vaccinia virus Ankara encoding the pre-erythrocytic antigen ME-TRAP in 1-6 year old children in a malaria endemic area.* Vaccine, 2006. **24**(22): p. 4709-15.
159. Harrop, R., et al., *Vaccination of colorectal cancer patients with modified vaccinia Ankara delivering the tumor antigen 5T4 (TroVax) induces immune responses which correlate with disease control: a phase I/II trial.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(11 Pt 1): p. 3416-24.
160. Harrop, R., J. John, and M.W. Carroll, *Recombinant viral vectors: cancer vaccines.* Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(8): p. 931-47.
161. McCurdy, L.H., et al., *Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine.* Clin Infect Dis, 2004. **38**(12): p. 1749-53.

162. Ramirez, J.C., et al., *Tissue distribution of the Ankara strain of vaccinia virus (MVA) after mucosal or systemic administration.* Arch Virol, 2003. **148**(5): p. 827-39.
163. Hodgson, S.H., et al., *Evaluation of the efficacy of ChAd63-MVA vectored vaccines expressing circumsporozoite protein and ME-TRAP against controlled human malaria infection in malaria-naive individuals.* J Infect Dis, 2015. **211**(7): p. 1076-86.
164. Afolabi, M.O., et al., *Safety and Immunogenicity of ChAd63 and MVA ME-TRAP in West African Children and Infants.* Mol Ther, 2016. **24**(8): p. 1470-7.
165. Tameris, M.D., et al., *Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial.* Lancet, 2013. **381**(9871): p. 1021-8.
166. Cappuccini, F., et al., *Immunogenicity and efficacy of the novel cancer vaccine based on simian adenovirus and MVA vectors alone and in combination with PD-1 mAb in a mouse model of prostate cancer.* Cancer Immunol Immunother, 2016. **65**(6): p. 701-13.
167. Garber, D.A., et al., *Deletion of specific immune-modulatory genes from modified vaccinia virus Ankara-based HIV vaccines engenders improved immunogenicity in rhesus macaques.* J Virol, 2012. **86**(23): p. 12605-15.
168. Garcia-Arriaza, J., et al., *Improving Adaptive and Memory Immune Responses of an HIV/AIDS Vaccine Candidate MVA-B by Deletion of Vaccinia Virus Genes (C6L and K7R) Blocking Interferon Signaling Pathways.* PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66894.
169. Sumner, R.P., et al., *Increased attenuation but decreased immunogenicity by deletion of multiple vaccinia virus immunomodulators.* Vaccine, 2016. **34**(40): p. 4827-34.
170. Almazan, F., D.C. Tscharke, and G.L. Smith, *The vaccinia virus superoxide dismutase-like protein (A45R) is a virion component that is nonessential for virus replication.* J Virol, 2001. **75**(15): p. 7018-29.
171. Perdiguero, B., et al., *Deletion of the viral anti-apoptotic gene F1L in the HIV/AIDS vaccine candidate MVA-C enhances immune responses against HIV-1 antigens.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48524.
172. Dobson, B.M., et al., *Vaccinia virus F5 is required for normal plaque morphology in multiple cell lines but not replication in culture or virulence in mice.* Virology, 2014. **456-457**: p. 145-56.
173. Okamura, H., et al., *A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock.* Infect Immun, 1995. **63**(10): p. 3966-72.
174. Puren, A.J., G. Fantuzzi, and C.A. Dinarello, *Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2256-61.
175. Novick, D., et al., *Interleukin-18, more than a Th1 cytokine.* Semin Immunol, 2013. **25**(6): p. 439-48.
176. Wawrocki, S., et al., *Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention.* Acta Biochim Pol, 2016. **63**(1): p. 1153.
177. Nakanishi, K., et al., *Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu.* Cytokine Growth Factor Rev, 2001. **12**(1): p. 53-72.
178. Delaloye, J., et al., *Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome.* PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000480.
179. Appay, V., D.C. Douek, and D.A. Price, *CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease.* Nat Med, 2008. **14**(6): p. 623-8.
180. Farber, D.L., N.A. Yudanin, and N.P. Restifo, *Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis.* Nat Rev Immunol, 2014. **14**(1): p. 24-35.
181. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 251-62.

182. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance.* Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
183. Gattinoni, L., et al., *A human memory T cell subset with stem cell-like properties.* Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1290-7.
184. Lischke, T., et al., *Comprehensive analysis of CD4+ T cells in the decision between tolerance and immunity in vivo reveals a pivotal role for ICOS.* J Immunol, 2012. **189**(1): p. 234-44.
185. Harms, R., et al., *Methamphetamine administration targets multiple immune subsets and induces phenotypic alterations suggestive of immunosuppression.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e49897.
186. Garcia-Arriaza, J., et al., *A novel poxvirus-based vaccine, MVA-CHIKV, is highly immunogenic and protects mice against chikungunya infection.* J Virol, 2014. **88**(6): p. 3527-47.
187. Altenburg, A.F., et al., *Modified vaccinia virus ankara (MVA) as production platform for vaccines against influenza and other viral respiratory diseases.* Viruses, 2014. **6**(7): p. 2735-61.
188. Calvo-Pinilla, E., et al., *Vaccination of mice with a modified Vaccinia Ankara (MVA) virus expressing the African horse sickness virus (AHSV) capsid protein VP2 induces virus neutralising antibodies that confer protection against AHSV upon passive immunisation.* Virus Res, 2014. **180**: p. 23-30.
189. Quinan, B.R., A.F. Versiani, and F.G. da Fonseca, *A MVA construct expressing a secretable form of the Dengue virus 3 envelope protein protects immunized mice from dengue-induced encephalitis.* Vaccine, 2016.
190. Reading, P.C. and G.L. Smith, *Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity.* J Virol, 2003. **77**(18): p. 9960-8.
191. Hickman, H.D., et al., *Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes.* Nat Immunol, 2008. **9**(2): p. 155-65.
192. Wolferstatter, M., et al., *Recombinant modified vaccinia virus Ankara generating excess early double-stranded RNA transiently activates protein kinase R and triggers enhanced innate immune responses.* J Virol, 2014. **88**(24): p. 14396-411.
193. Watford, W.T., et al., *The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses.* Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(5): p. 361-8.
194. Pearce, E.L. and H. Shen, *Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12.* J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2074-81.
195. Agnello, D., et al., *Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights.* J Clin Immunol, 2003. **23**(3): p. 147-61.
196. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 133-46.
197. Ben-Sasson, S.Z., et al., *IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 7119-24.
198. Ben-Sasson, S.Z., et al., *IL-1 enhances expansion, effector function, tissue localization, and memory response of antigen-specific CD8 T cells.* J Exp Med, 2013. **210**(3): p. 491-502.
199. Hunter, C.A., R. Chizzonite, and J.S. Remington, *IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens.* J Immunol, 1995. **155**(9): p. 4347-54.
200. Tominaga, K., et al., *IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells.* Int Immunol, 2000. **12**(2): p. 151-60.
201. Huber, J.P. and J.D. Farrar, *Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon.* Immunology, 2011. **132**(4): p. 466-74.
202. Zhu, J., et al., *Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN-beta.* Blood, 2007. **109**(2): p. 619-25.

ANEXO

Los resultados de este trabajo de tesis fueron publicados en el siguiente trabajo:

viruses

MDPI

Article

Deletion of *A44L*, *A46R* and *C12L* Vaccinia Virus Genes from the MVA Genome Improved the Vector Immunogenicity by Modifying the Innate Immune Response Generating Enhanced and Optimized Specific T-Cell Responses

María Pía Holgado [1], Juliana Falivene [1], Cynthia Maeto [1], Micaela Amigo [1], María Fernanda Pascutti [1,†], María Belén Vecchione [1,2], Andrea Bruttomesso [2], Gabriela Calamante [3], María Paula del Médico-Zajac [3] and María Magdalena Gherardi [1,*]

1 Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), Universidad de Buenos Aires-CONICET, Facultad de Medicina, Ciudad de Buenos Aires 1121, Argentina; piaholgado@gmail.com (M.P.H.); juliana.falivene@gmail.com (J.F.); cynthiamayumi85@gmail.com (C.M.); mfernandezamigo.19@gmail.com (M.A.); fpascutti@yahoo.com.ar (M.F.P.); mb_vecchione@hotmail.com (M.B.V.);

2 Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos Aplicados a Química Orgánica (UMYMFOR), Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires 1428, Argentina; andrea.bruttomesso@gmail.com

3 Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA Castelar, Buenos Aires 1686, Argentina; calamante.gabriela@inta.gob.ar (G.C.); delmedicozajac.maria@inta.gob.ar (M.P.d.M.-Z.)

* Correspondence: mmgherardi@gmail.com or mgherardi@fmed.uba.ar; Tel.: +54-11-4508-3689 (ext. 129); Fax: +54-11-4508-3705

† Present address: Sanquin Research, Department of Hematopoiesis, Amsterdam 1066CX, The Netherlands.

Academic Editor: Kenneth Lundstrom
Received: 17 March 2016; Accepted: 11 May 2016; Published: 23 May 2016

Abstract: MVA is an attenuated vector that still retains immunomodulatory genes. We have previously reported its optimization after deleting the *C12L* gene, coding for the IL-18 binding-protein. Here, we analyzed the immunogenicity of MVA vectors harboring the simultaneous deletion of *A44L*, related to steroid synthesis and *A46R*, a TLR-signaling inhibitor (MVAΔA44L-A46R); or also including a deletion of *C12L* (MVAΔC12L/ΔA44L-A46R). The absence of biological activities of the deleted genes in the MVA vectors was demonstrated. Adaptive T-cell responses against VACV epitopes, evaluated in spleen and draining lymph-nodes of C57Bl/6 mice at acute/memory phases, were of higher magnitude in those animals that received deleted MVAs compared to MVAwt. MVAΔC12L/ΔA44L-A46R generated cellular specific memory responses of higher quality characterized by bifunctionality ($CD107_{a/b}^{+}$/IFN-γ^{+}) and proliferation capacity. Deletion of selected genes from MVA generated innate immune responses with higher levels of determining cytokines related to T-cell response generation, such as IL-12, IFN-γ, as well as IL-1β and IFN-β. This study describes for the first time that simultaneous deletion of the *A44L*, *A46R* and *C12L* genes from MVA improved its immunogenicity by enhancing the host adaptive and innate immune responses, suggesting that this approach comprises an appropriate strategy to increase the MVA vaccine potential.

Keywords: MVA; vaccine; T-cell response

Además, parte de este trabajo fue presentado en el **Congreso Argentino de Virología 2015** y fue premiado como el **mejor trabajo** en la categoría de **Virología Humana.**

"Deleción de genes inmunomoduladores del genoma de MVA: efecto sobre su inmunogenicidad"

MP Holgado, MP del Medico-Zajac, J Falivene, CA Maeto, MF Pascutti, G Calamante, MM Gherardi

El virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) aún conserva genes relacionados con la evasión de la respuesta inmune del huésped. Previamente, nuestro grupo reportó la optimización del potencial vacunal de este vector al cual se le había delecionado el gen *C12L*, que codifica para una proteína de unión a IL-18. En este trabajo analizamos la inmunogenicidad del vector MVA luego de la deleción dos genes virales: el *A44L*, implicado en la síntesis de hormonas esteroideas, y el *A46R*, que inhibe la señalización de receptores Toll (MVAΔA44L-A46R: MVAd). Como así también el análisis de las tres deleciones en simultáneo (MVAΔC12L/ΔA44L-A46R: MVAt).

Para ello, ratones C57BL/6 fueron inmunizadas por vía intramuscular con el virus salvaje (MVAwt) o los virus delecionados (ΔMVAs). Evaluamos la respuesta celular T frente a epitopes del virus Vaccinia a los 7 y 45 dias post-inmunización (dpi), correspondientes a las etapas de respuesta aguda y de memoria, respectivamente, en bazo y ganglios ilíacos. La proporción de células productoras de IFNγ e IL-2 se evaluó mediante ELISPOT y la producción de citoquinas a través de ELISA. Asimismo, analizamos el porcentaje de T-CD8 citotóxicas por citometría de flujo, mediante la expresión de CD107, como también la proliferación de las distintas subpoblaciones de memoria valiéndonos de la sonda CFSE y la expresión de CD44 y CD62L. Para estudiar la respuesta innata inducida por el virus, se inmunizaron ratones con el MVAwt y el MVAt, y se evaluó por ELISA el patrón de citoquinas producido entre las 0 y 30 horas post-inoculación (hpi).

A los 7 dpi, los ΔMVAs indujeron un aumento significativo en el número de T-CD8 y CD4 productoras de IFNγ específicas contra Vaccinia en comparación al MVAwt, como así también en el número de T-CD8 productoras de IL-2. Este incremento, también se observó a los 45 dpi. El porcentaje de T-CD8 de memoria que proliferó luego de la estimulación fue mayor en el grupo inmunizado con MVAt (6%) que en el MVAwt (3%), obteniéndose resultados similares en la población T-CD4 (7% vs 1% respectivamente). Dentro de las células que proliferaron, el MVAt indujo una mayor proporción de células de memoria central (T_{MC}:37%) y de memoria efectora (T_{ME}:25%) versus el MVAwt (T_{MC}:20%,T_{ME}:11%). Resultados similares se obtuvieron para la población T-CD4 (T_{MC}:37%,T_{ME}:16% y T_{MC}:8%,T_{ME}:2% respectivamente). Sumado a esto, los ΔMVAs indujeron mayor porcentaje de T-CD8 específicas productoras de IFNγ y con capacidad citotóxica. Finalmente observamos que el MVAt produjo mayores niveles de IFNγ e IL-12 a las 20 y 30 hpi en comparación al MVAwt.

La deleción simultánea de genes específicos del genoma de MVA, cuyas funciones se encuentran inter-relacionadas, compone una estrategia apropiada para aumentar el potencial vacunal de este vector, creando una herramienta útil y versátil, para ser utilizada en el desarrollo de vacunas frente a infecciones tales como HIV, Malaria y Tuberculosis.