

Tesis Doctoral

El semen ejerce un paradójico efecto adyuvante sobre la respuesta inmune anti HSV-2

Varese, Augusto

2019

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Varese, Augusto. (2019). El semen ejerce un paradójico efecto adyuvante sobre la respuesta inmune anti HSV-2. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6661_Varese

Cita tipo Chicago:

Varese, Augusto. "El semen ejerce un paradójico efecto adyuvante sobre la respuesta inmune anti HSV-2". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2019. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6661_Varese

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Química Biológica

El semen ejerce un paradójico efecto adyuvante sobre la respuesta inmune anti HSV-2

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

Augusto Varese

Directora: Dra. Ana Ceballos

Consejero de Estudios: Dr. Gabriel Adrián Rabinovich.

Lugar: Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS),
Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología,
Facultad de Medicina, UBA.

Buenos Aires, 2019

Esta tesis fue escrita en plena debacle del sistema científico-tecnológico, pero peor, durante la más dura crisis del país que me ha tocado vivir. Cada vez hay más gente viviendo en la calle, con hambre. Hay derechos básicos que son cada vez más inaccesibles. Es insoportable.

Por ello quiero agradecer, primero a los que no son indiferentes, a los que no se acostumbran y a los que luchan por una realidad equitativa. Además, porque viene al caso, a los que creen y hacen la ciencia parados desde la justicia social y la entienden como una herramienta transformadora. En breve, a los empáticos.

Dicho esto, quiero agradecer a mi directora de Tesis, Ana Ceballos, por todo lo anterior y además por ser tan comprensiva, sensible y compañera. Por ser tan trabajadora, porque no me faltaron nunca ni su ayuda, ni sus ideas. Es la primera responsable de que tenga una gran formación científica. Igualmente a Jorge Geffner por ser un horizonte, de humanidad y trabajo. Por nunca decir que no. Por meterse en todas.

A mis amigas y amigos becarios, por tanto chino y parrilla. A Guada, Anto y Julita que están tan cerca. Nos tocó una parada difícil, la de estar sin certezas, la de haber pasado de un sistema con perspectivas a no poder hacer nuestro trabajo. Pero estamos juntos y espero que dentro o fuera encontremos un lugar. A ellas y a ellos, porque nos unimos y cuando nos rompimos, nos arreglamos. A Gaby, Juli, Pehuén, Cintia, La Jime, Lucía, Javito, Diegote, Clau, Alvarito, Fer, Eze y los demás.

Al INBIRS por ser el lugar, por ser compartido, y a Horacio Salomón por dirigirlo. A todo el instituto, le agradezco su apoyo, me sentí muy respaldado por muchos de los investigadores, personal de apoyo y administrativos. Los quiero, gracias por hacer mí día a día.

Gracias, a Ana Paleta y Federico Remes Lenicov por ayudarme con el trabajo y ser equipo.

Ahora a mis viejos que en la diversidad me amaron tanto. A ellos les debo la libertad, y por ello, el mundo. A mí vieja, porque con su ejemplo me enseñó el feminismo, quizá sin saberlo. Y a mis hermanitos, Orne y Benja, que son el reflejo cambiado que me sigue y me guía.

A Juancho y Coco por crecer conmigo y ser tan reflexivos y sensibles. Por dejarme nombrarlos en todas las conversaciones; A Juancho por su rebeldía, por las caminatas infinitas de discusión y a Coco por su fortaleza, por escuchar Eevee empachados. Gracias a Coco, también, por pagarle a Taka, nunca podría haberlo logrado sin su ayuda. A Mar, Chela, Belu y Guido porque perdura.

A mis compañeras y compañeros de CyUA y A Ciencia Cierta, por la lucha con carisma y ternura. Intentamos algo distinto. Por ser una escuela definitoria.

Y a Camila. Pasa que Camila es Amor. Ese Amor al otro. Ahora ella está dando clases. Me está enseñando. Estamos aprendiendo mucho juntos, tocando el misterio a diario, sin desaparecer. A Camila gracias, por lo dulce, por el sol y el barro. Por un futuro juntos.

A los que no les agradezco mi trabajo, es a los insensibles, a los que creen que otras personas merecen estar mal, a los atrincherados en su mundillo. Con esos no quiero tener nada que ver.

A Poro.

Una estrella le dijo que la queríamos, y así se fue.

Chau viejita

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	6
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	<i>10</i>
1 CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	13
1.1 El semen y las infecciones de transmisión sexual	13
1.1.1 Características y componentes del semen	14
1.1.2 El semen como modulador de la respuesta inmune	17
1.1.3 El semen y su interacción con los patógenos de transmisión sexual	24
1.2 Fisiología de la respuesta inmune en la mucosa genital femenina.	26
1.2.1 Implicancia de la respuesta inmune en la mucosa vaginal en el desarrollo de vacunas.	30
1.3 La transmisión sexual de HSV-2	31
1.3.1 El rol del semen en la infección por HSV-2	35
1.3.2 La respuesta inmune frente a HSV-2.....	36
1.4 Hipótesis	41
2 CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo general	42
2.2 Objetivos específicos	42
2.2.1 Objetivo específico 1	42
2.2.2 Objetivo específico 2	43
3 CAPÍTULO 3: MÉTODOS	45
3.1 Reactivos y medios de cultivo	45
3.2 Animales	45
3.3 Cepas virales	46
3.4 Obtención del contenido de vesículas seminales.....	46
3.5 Protocolos de inoculación	47
3.5.1 Lavados vaginales y evaluación del estado clínico.....	50
3.5.2 Obtención de muestras.....	51
3.5.3 Separación de células y suero de las muestras	51
3.6 Titulación de virus	53
3.6.1 Líneas celulares.....	53
3.6.2 Método de recuento de unidades formadoras de placas	53
3.6.3 Determinación de la capacidad del contenido de vesícula seminal (VS) de comprometer la infectividad viral.....	54
3.7 Transferencia adoptiva de linfocitos T	54
3.8 ELISA	55
3.9 Determinación de los títulos de IgG e IgA específicos	55

3.10	PCR cuantitativa	56
3.11	Citometría de flujo.....	58
3.11.1	Evaluación de marcadores de membrana	58
3.11.2	Evaluación de la producción de IFN-γ por tinción intracelular	59
3.11.3	Ensayo de proliferación celular.....	59
3.12	Estadística	60
4	CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	61
4.1	El contenido de la vesícula seminal no compromete la capacidad infecciosa del virus HSV-2.....	61
4.2	El contenido de vesícula seminal no modula el curso de la infección primaria por HSV-2.....	63
4.3	El contenido de vesícula seminal mejora la eficacia de la vacunación intravaginal con HSV-2 inactivado.....	67
4.4	La inmunización en presencia del contenido de vesícula seminal mejora la respuesta de memoria T en los ganglios drenantes (GDs)	71
4.5	La inmunización en presencia del contenido de vesícula seminal potencia la respuesta T de memoria en el sitio de infección.....	79
4.6	El contenido de vesícula seminal induce una robusta respuesta de memoria celular en los ganglios drenantes (GDs).....	85
4.7	Las células T median la protección conferida por la presencia del contenido de vesículas seminales durante la inmunización frente a un desafío letal.....	90
4.8	La vacunación en presencia del contenido de vesícula seminal induce una respuesta inflamatoria temprana.....	92
5	CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	97
5.1	¿El semen participa activamente en la transmisión de agentes virales?	97
5.2	El contenido de la vesícula seminal no modifica la infección primaria por HSV-2 adquirida por vía vaginal.....	99
5.3	El semen como inmunomodulador	101
5.4	El rol adyuvante del contenido de las vesículas seminales en la vacunación intravaginal con HSV-2 inactivado.....	104
5.5	Consideraciones respecto del modelo de estudio	109
5.6	Comentarios finales.....	112
	PERSPECTIVAS	113
	REFERENCIAS.....	114

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Inmunomodulación provocada por el semen en el tracto genital femenino
- Figura 2** Balance inmune durante el embarazo
- Figura 3** Topología de la respuesta inmune en la mucosa genital femenina.
- Figura 4** Prevalencia de la infección por HSV-2 en mujeres
- Figura 5** Estructura de HSV-2.
- Figura 6** Transporte axonal de HSV-2.
- Figura 7** Eventos de la infección por HSV-2.
- Figura 8** Protocolos de inmunización
- Figura 9** El contenido de vesículas seminales (VS) no modifica la infectividad de HSV-2.
- Figura 10** El contenido de vesícula seminal (VS) disminuye la producción viral en ratones hembras infectadas por vía intravaginal con HSV-2.
- Figura 11** El contenido de vesículas seminales (VS) no modifica la infección intravaginal por HSV-2.
- Figura 12** Determinación de la dosis de HSV-2 inactivado para inmunizar ratones por vía intravaginal.
- Figura 13** El fluido contenido en las vesículas seminales mejora la eficacia de la vacunación por HSV-2 intravaginal
- Figura 14** La vacunación en presencia del contenido de vesícula seminal (VS) no modifica los títulos de anticuerpos.
- Figura 15** El fluido contenido por las vesículas seminales aumenta la magnitud de la respuesta de memoria celular en los GDs ante un desafío letal.
- Figura 16** El fluido contenido por las vesículas seminales potencia la funcionalidad de la respuesta de memoria específica en los GDs ante un desafío letal.
- Figura 17** La vacunación en presencia del fluido contenido en las vesículas seminales no induce una respuesta inmune regulatoria ante un desafío letal

- Figura 18** La inmunización en presencia del contenido de vesícula seminal (VS) promueve el aumento de células T CD8⁺ en la mucosa vaginal.
- Figura 19** El contenido de vesícula seminal incrementa la respuesta de memoria T en la mucosa vaginal ante un desafío letal
- Figura 20** La vacunación en presencia del contenido de vesícula seminal no incrementa la inducción de células T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ ni la producción de TGF-β en la mucosa vaginal ante un desafío letal
- Figura 21** El contenido de vesícula seminal (VS) aumenta la expresión de CXCL9 en los GDs frente al desafío letal con HSV-2
- Figura 22** La vacunación en presencia del fluido contenido en las vesículas seminales aumenta la respuesta de memoria T CD4⁺ y T CD8⁺ en los GDs.
- Figura 23** La vacunación en presencia del fluido contenido en las vesículas seminales aumenta la funcionalidad de la respuesta de memoria T CD4⁺ y T CD8⁺ en los GDs.
- Figura 24** La transferencia adoptiva de células T CD4⁺ y T CD8⁺ provenientes de ratones inmunizados en presencia de VS es suficiente para proteger ratones no inmunizados frente a un desafío letal con HSV-2.
- Figura 25** La vacunación en presencia del fluido contenido en la vesícula seminal induce una respuesta inflamatoria temprana en la mucosa vaginal
- Figura 26** La vacunación en presencia del fluido contenido en la vesícula seminal induce una respuesta inflamatoria temprana en los ganglios drenantes
- Figura 27** La vacunación en presencia del fluido contenido en la vesícula seminal induce la activación y migración de las CDs hacia los gánglios drenantes.

RESUMEN

El semen es el principal vector de un amplio grupo de enfermedades infecciosas transmitidas sexualmente (ETS), que causan anualmente millones de muertes en el mundo. Además, el semen induce una variedad de acciones biológicas sobre los tejidos reproductivos femeninos que pueden modular la respuesta inmune dirigida contra los alo-antígenos paternos. En el presente trabajo nuestra hipótesis sostiene que el semen más allá de ser un vehículo de los agentes infecciosos, particularmente de los virus, tiene la capacidad de modular la respuesta inmune anti-infecciosa. En este trabajo utilizamos un modelo murino de infección intravaginal para analizar la capacidad del fluido contenido en las vesículas seminales (VS), que comprende el 60% del plasma seminal en ratones, de modular la respuesta inmune contra el virus Herpes Simplex de tipo II (HSV-2). En primer lugar, encontramos que la presencia de VS no modifica el curso de una infección primaria por HSV-2 intravaginal. Sin embargo, VS mejora marcadamente la protección inducida por la vacunación intravaginal con HSV-2 inactivado frente a un desafío letal. Observamos que este efecto protector estuvo asociado a una robusta respuesta de memoria antígeno-específica mediada por células T CD4⁺ y T CD8⁺ en los órganos linfoides secundarios y en la mucosa genital. Además demostramos que la presencia de VS durante la vacunación induce un microambiente inflamatorio en la mucosa genital y en los ganglios drenantes. En contra de la noción que el semen opera como un agente inmunosupresor, nuestros resultados sugieren que el VS actúa como adyuvante en la inmunización pos HSV-2 intravaginal, promoviendo la respuesta inflamatoria y el subsecuente desarrollo de la respuesta de memoria antígeno específica.

Semen induces a paradoxical adjuvant effect on anti-HSV-2 immune response

Semen is the main vector of sexually transmitted diseases (STDs) that annually causes millions of deaths globally. But also, it is now clear that seminal plasma (SP) induces a variety of biological actions on the female reproductive tissues able to modulate the immune response against paternal antigens. Our hypothesis is that semen, beyond being a carrier for infectious agents, particularly virus, has the capacity to modulate anti-infectious immune response. We here analyzed whether the seminal vesicle fluid (VS), which contributes almost 60% of the SP volume in mice, could modulate the immune response against herpes simplex virus type 2 (HSV-2). We found that VS does not modify the course of primary infection, but markedly improved protection conferred by vaginal vaccination with inactivated HSV-2 against a lethal challenge. This protective effect was shown to be associated to a robust memory immune response mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in both the lymph nodes draining the vagina and the vaginal mucosa, the site of viral replication. Additionally we found that VS presence during immunization induces local early inflammation and dendritic cells maturation in vaginal mucosa and migration to draining lymph nodes. In contrast with the widespread notion that SP acts as an immunosuppressive agent, our results suggest that VS might improve the female immune response against sexually transmitted pathogens.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Seroalbúmina bovina
CD	Célula dendrítica
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CL	Célula de Langerhans
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
ConA	Concavalina A
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CSF2	Factor estimulante de colonias 2
CSFE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína
CTLA-4	<i>Citotoxic T Linfocite antigen 4</i>
d	Días
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DE	Desvío estándar
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dubelcco
DTT	Ditiotreitol
EBOV	Virus Ébola
EEM	Error estándar de la media
ELISA	Ensayo inmuno-enzimático
ETS	Enfermedad de transmisión sexual
Fc	Fracción constante
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
gD2	Glicoproteína D2
GDs	Ganglios drenantes
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HBV	Virus de la Hepatitis B
HIV-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo 1

HLA	Antígeno leucocitario humano
HPV	Virus del Papiloma Humano
HRP	Peroxidasa
HS	Heparán sulfato
HSV-1	Herpes Virus Simplex de Tipo 1
HSV-2	Herpes Virus Simplex de Tipo 2
HVEM	Mediador de la entrada de <i>Herpesvirus</i>
ICP4	Factor de transcripción viral mayor 4
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ILC	Células linfoides innatas
IMF	Intensidad media de fluorescencia
In	Inmunizado
ivag	Intravaginal
LB	Linfocito B
LIE	Linfocito Intraepitelial
LT	Linfocito T
M	Millón
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MCP-1	Factor quimioattractante de monocitos -1
MIP-1β	Proteína Inflamatoria del Macrófago-1 beta
MMLV	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney
MOI	Multiplicidad de infección
mp	Acetato de medroxiprogesterona
MTT	Sal de Tetrazolio
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NK	Célula Citotóxica Natural
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer de sales de fosfato
pCD	Célula dendrítica plasmocitoide
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pd	Post-desafío
PFA	Para formaldehído
PGE	Prostaglandina E

pi	Post-infección
PMA	12-O-Tetradecanoylforbol-13-acetato
PSA	Antígeno específico prostático
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RIG-1	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
RSV	Virus Sincicial Respiratorio
SEVI	<i>Semen-derived enhancers of virus infection</i>
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema Nervioso Central
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
T-bet	<i>T-box transcription factor</i>
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral beta
Th	Linfocito T helper
TLR	Toll-like receptor
TMB	Tetrametilbencidina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocito T regulatorio
Trm	Células T residentes de memoria
ufp	Unidad formadora de placas
UV	Ultravioleta
VacV	Virus Vaccinia
VS	Contenido de vesículas seminales
WNV	Virus del Nilo Occidental
ZIKV	Virus Zika

1 CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 El semen y las infecciones de transmisión sexual

El semen y las secreciones cérvico-vaginales representan los principales vectores de un amplio grupo de enfermedades infecciosas transmitidas sexualmente (ETS), que causan anualmente millones de muertes en el mundo (CDC, 2018). En este sentido, numerosos patógenos humanos se transmiten por vía sexual. Los hay de naturaleza fúngica como *Candida albicans*; bacteriales como *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema Pallidum* y *Chlamydia trachomatis*; y de origen viral como HIV, HBV, HSV, HPV y ZIKV. Actualmente, en el mundo entero, más de un millón de ETS son adquiridas cada día, demostrando la relevancia de esta problemática (CDC, 2018).

En los últimos años se ha avanzado considerablemente en la comprensión de la fisiología del sistema inmune operativo en las mucosas, sistema que alberga en el humano a más del 80% de los linfocitos T del organismo, junto a un nutrido entramado de células dendríticas (CD) ubicado en el propio epitelio y en la mucosa subepitelial. Sin embargo, pese al papel primordial que juega el semen como vector de ETS, es muy poco lo que conocemos acerca de las propiedades inmunomodulatorias de este sobre la mucosa vaginal.

1.1.1 Características y componentes del semen

1.1.1.1 Componentes del plasma seminal

El semen es una suspensión de células, espermatozoides en su gran mayoría, en el plasma seminal. Este fluido es el resultado combinado de secreciones producidas por las distintas glándulas a lo largo del aparato reproductor masculino; principalmente de las vesículas seminales y la próstata, pero también del epidídimo y la glándula de Cowper o bulbouretral. En modelos murinos se ha descrito que el contenido de las vesículas seminales contiene la mayoría de los componentes solubles del eyaculado, representando más del 60% de la composición de este (Robertson et al., 2009a).

El plasma seminal es un fluido de composición compleja, con una alta concentración de proteínas y gran diversidad de factores de bajo peso molecular, como azúcares, aminoácidos, oligopéptidos y compuestos de naturaleza lipídica (Juyena y Stelletta, 2012; Owen y Katz, 2005). El origen de cada componente es variable, pero mayoritariamente el plasma seminal es el resultado de la actividad secretora de las vesículas seminales y la próstata (Wolff, 1995).

La concentración proteica en el plasma seminal es muy alta; varía entre 35 y 55 g/L. Su análisis proteómico ha identificado 900 especies proteicas distintas (Fung et al., 2004; Pilch y Mann, 2006), entre las cuales las semenogelinas I y II, de origen vesicular, y el Ag prostático (PSA) son las más abundantes (Rodríguez-Martínez et al., 2011). También se ha reportado que el plasma seminal contiene una gran diversidad de citocinas. Entre estos factores el más

abundante es el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β), del cual las tres isoformas, TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 , están presentes en semen (Loras et al., 1999; Politch et al., 2007). Sin embargo la predominante es TGF- β_1 , que en hombres fértiles alcanza niveles entre 80 y 220 ng/ml (Loras et al., 1999; Politch et al., 2007; Sharkey et al., 2012a). Esto hace del semen el segundo fluido biológico (después del calostro) con la mayor concentración de TGF- β (Robertson et al., 2002). Además, la mayoría del TGF- β presente en semen se encuentra en su estado activo y no en la forma latente como se observa, por ejemplo en sangre, hecho que revela un rol fundamental para esta citocina (Politch et al., 2007; Robertson et al., 2002; Sharkey et al., 2012a).

Asimismo, se han descrito numerosas especies de origen lipídico en el plasma seminal. Particularmente, el semen humano, a diferencia del de los roedores, se caracteriza por poseer muy altas concentraciones de prostaglandinas de la serie E, que en conjunto pueden alcanzar hasta 700 $\mu\text{g/ml}$. Las formas hidroxiladas, 19-OH-PGE1 y 19-OH-PGE2, son entre 3 y 30 veces más abundantes que las formas parentales, (PGE1 y PGE2) y a su vez son específicas del plasma seminal humano, por lo que adquieren particular relevancia (Horton y Thompson, 1964; Kelly et al., 1976; Taylor y Kelly, 1974, 1975; Templeton et al., 1978).

Otro componente importante del plasma seminal son los exosomas: vesículas extracelulares de entre 30 y 100 nm de diámetro. La concentración estimada de estos en semen es muy alta comparado con otros fluidos (Yang et al., 2017). Recientemente han cobrado relevancia debido su capacidad de intervenir tanto en la fertilidad como en el control de la respuesta inmune (Muller et al., 2018;

Welch et al., 2018).

1.1.1.2 Los espermatozoides y otras células del semen

La gran mayoría de las células del semen son espermatozoides. Estos encuentran su origen en la división meiótica de células germinales en los testículos, y por ello son haploides. Al tener disminuida su carga cromosómica y perdido casi todo su citoplasma son células muy pequeñas. Su cromatina, se encuentra en un estado condensado al intercambiarse las histonas por proteínas específicas denominadas protaminas (Miller et al., 2010). En este estado el espermatozoide pierde su capacidad de expresión génica (Grunewald et al., 2005). Todos estos procesos ocurren dentro del testículo y no alcanzan para que los espermatozoides sean capaces de fecundar el óvulo, ya que estos son inmóviles aún y carecen de las proteínas que permiten la interacción con la gameta femenina (Cornwall, 2009). Al ingresar al epidídimo se observa el progresivo aumento en la motilidad, pero es ya dentro del aparato genital femenino (posterior al eyaculado), donde se completa la activación de los espermatozoides con procesos denominados genéricamente “capacitación” (Austin, 1951; Chang, 1951; De Jonge, 2005).

Por otra parte, están presentes otros tipos celulares como células de origen epitelial procedentes de la uretra, células germinales en distintas etapas de diferenciación provenientes de los testículos, o leucocitos que provienen de testículos y de las glándulas accesorias (Johanisson et al., 2000). Los leucocitos son en su mayoría neutrófilos, aunque también se encuentran en menor proporción linfocitos, monocitos y macrófagos (Johanisson et al., 2000;

Politch et al., 2009). Un análisis numérico de las células en el eyaculado humano revela las siguientes abundancias: espermatozoides: 390 M/ml; neutrófilos: 1,5 M/ml; macrófagos/monocitos: 0,1M/ml; linfocitos: 0,4M/ml (Aitken et al., 1994).

1.1.2 El semen como modulador de la respuesta inmune

1.1.2.1 El semen induce una respuesta inflamatoria en el tracto genital femenino

Entre las 2 y 48 horas posteriores a una relación sexual consensuada sin protección, se pueden observar, en lavados vaginales, numerosos tipos de leucocitos; los más abundantes son los neutrófilos, aunque también se encuentran linfocitos y macrófagos (Pandya y Cohen, 1985; Thompson et al., 1992). Esta primera respuesta coincide con la fagocitosis de espermatozoides por aquellos leucocitos infiltrados en la luz del aparato genital femenino (Pandya y Cohen, 1985; Thompson et al., 1992). Además, se ha demostrado que en este contexto, las células epiteliales de ectocérvix son inducidas a secretar IL-8, IL-6, MCP-1 y GM-CSF, citocinas y quimiocinas características de los procesos inflamatorios (Sharkey et al., 2007). Incluso las células epiteliales de la vagina secretan CCL20 y así atraen células de Langerhans a las proximidades de la vagina (Berlier et al., 2006). Algunos autores demuestran también la inducción de la ciclooxigenasa-2 en el epitelio vaginal (Doncel et al., 2011).

Se ha propuesto a la citocina TGF- β como uno de los componentes causantes de esta respuesta inflamatoria (Sharkey et al., 2012a). Aunque, el TGF- β

seminal se convierte inicialmente en un factor inflamatorio, también hay evidencias de su rol en la inducción de tolerancia materna a Ags seminales (Clark et al., 2008; Robertson et al., 2009b). Las observaciones anteriores condicen con la función dual de esta citocina en otros ambientes biológicos; por un lado induce la infiltración leucocitaria y la inflamación, mientras que por el otro, limita la respuesta induciendo la tolerancia a través de sus acciones sobre linfocitos y CDs que conllevan a la proliferación de linfocitos de fenotipo regulatorio (Andersson y Eggen, 2006; Gorelik y Flavell, 2002) (Figura 1)

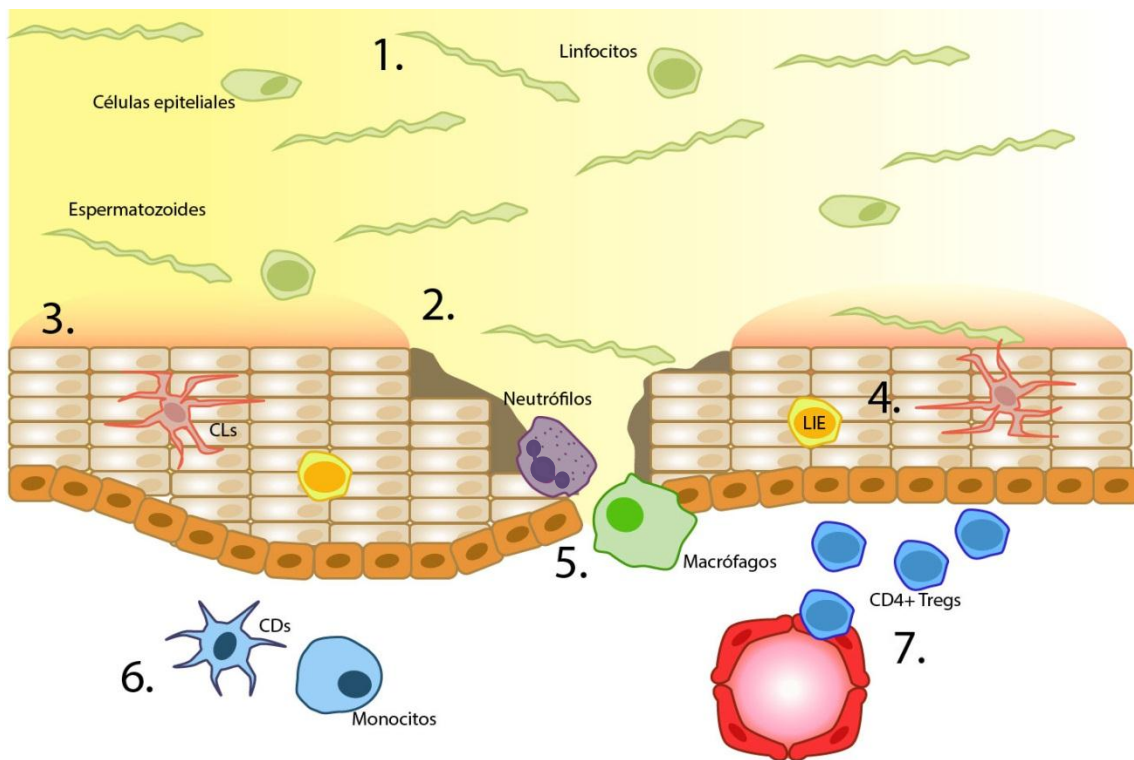


Figura 1 Inmunomodulación provocada por el semen en el tracto genital femenino.

1. El semen está compuesto de espermatozoides, células epiteliales, leucocitos y moléculas solubles en el plasma seminal. Entre los componentes más abundantes están el TGF- β (de los tres isotipos) y las PG de la serie E. 2. Durante una relación sexual consensuada ocurren microabrasiones las cuales permiten el contacto entre los componentes del semen y las células de la mucosa vaginal. 3. El epitelio vaginal se activa en presencia del plasma seminal, efecto principalmente causado por TGF- β . Las células epiteliales secretan, GM-CSF, IL-6, IL-8, MCP-1 y CCL20 y sobreexpresan COX-2. 4. Además, las células de Langerhans (CLs) y linfocitos

intraepiteliales (LIEs) entran en contacto con los componentes seminales e inducen inflamación. 5. El ambiente de citocinas promueve la infiltración de neutrófilos y macrófagos unas horas después de la deposición del semen. Estos tipos celulares pueden fagocitar células del semen. 6. Las células dendríticas de la mucosa vaginal y monocitos circulantes son reclutados por las quimiocinas liberadas. Como células presentadoras de antígenos podrán fagocitar y procesar componentes del semen de manera de presentar epítopes derivados de aloantígenos seminales en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 2. Además, la PGE2 presente en el semen, impondrá un perfil de semi-maduro a estas células, relacionado con mecanismos inflamatorios reducidos (inhibición de la secreción de IL-12) y un aumento en la secreción de IL-10. 7. Las células dendríticas migrarán a los ganglios drenantes y activarán la proliferación de linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ (Tregs). Días después de la deposición del semen se pueden encontrar estos linfocitos en varios sitios de la mucosa vaginal, incluso en útero donde median la tolerancia a los aloantígenos paternos en el feto y así evitan su rechazo durante la implantación.

Llamativamente, se ha demostrado que para que ocurra la implantación es necesaria una respuesta inflamatoria (Dekel et al., 2014). De hecho, durante la implantación se han observado grandes niveles de citocinas pro-inflamatorias y LT CD4⁺ activados en un perfil Th1 (Granot et al., 2012; Van Sinderen et al., 2013). Estudios en prácticas de fertilización asistida reportan que el éxito de implantación mejora considerablemente al provocar una injuria en el tejido a través de una biopsia endometrial (Narvekar et al., 2010; Potdar et al., 2012; Raziel et al., 2007; Tiboni et al., 2011). Esta práctica causa la producción de citocinas pro inflamatorias como MIP-1 β , TNF- α e IL-15, al igual que reclutamiento de macrófagos y células dendríticas, y estos parámetros correlacionan con el éxito de la intervención (Gnainsky et al., 2010). De igual manera, se ha demostrado que la exposición al semen durante los tratamientos de fertilización asistida mejora la tasa de implantación (Crawford et al., 2015). En este sentido, la respuesta pro inflamatoria luego de la deposición del semen podría tener un importante rol en el establecimiento del ambiente inmune adecuado para la implantación (Robertson et al., 2006; Sharkey et al., 2007).

1.1.2.2 Propiedades inmunosupresoras del semen.

Paradójicamente, es usualmente aceptado que el semen es capaz de inducir notables acciones tolerogénicas (Politch et al., 2007; Robertson et al., 2009b). Ellas están mediadas, en primer lugar, por las altas concentraciones de agentes inmunosupresores presentes en el plasma seminal, tales como el TGF- β y la PGE2 (Kuno et al., 1986; Politch et al., 2007; Remes Lenicov et al., 2012; Robertson et al., 2009b). Las propiedades inmunosupresoras del semen parecerían jugar un papel relevante en el proceso conducente a la concepción, al inhibir la respuesta inmune alo-reactiva mediada por la mujer contra los antígenos paternos (Robertson et al., 2018).

Inicialmente, los primeros estudios se focalizaron en la capacidad del plasma seminal de inhibir la activación de linfocitos, intentando explicar la baja antigenicidad mostrada por los espermatozoides (Stites y Erickson, 1975). En los años subsiguientes fueron identificados un gran número de factores seminales responsables de inhibir la proliferación linfocitaria *in vitro*, pero también de activar mecanismos tanto inflamatorios como regulatorios.

En especial, un gran número de trabajos da cuenta de la capacidad de las prostaglandinas de la serie E del plasma seminal de regular la acción de linfocitos (Quayle et al., 1989; Skibinski et al., 1992). Del mismo modo, las PGE del plasma seminal tienen efectos supresores sobre la actividad de las células natural killer (NK) (Quayle et al., 1989; Skibinski et al., 1992; Tarter et al., 1986), y también son capaces de definir el perfil de citocinas secretadas por los monocitos (Kelly et al., 1997). Particularmente, el plasma seminal aplicado a

monocitos purificados de sangre periférica induce la secreción de IL-10 e inhibe la secreción de IL-12, una citocina proinflamatoria (Kelly et al., 1997). Trabajos realizados en nuestro grupo, demostraron que el plasma seminal, a través de PGE₂, induce un perfil tolerogénico en las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica humana (Remes Lenicov et al., 2012). Es interesante que este efecto, así como la acción sobre linfocitos o células NK, se observa utilizando diluciones elevadas de plasma seminal, que en estado puro contiene concentraciones de PGE hasta 10000 veces mayores que las presentes en un foco inflamatorio (Higgs et al., 1983; Kelly, 1999). En base a estos trabajos, las PGEs han sido consideradas como uno de los principales factores inmunomoduladores del semen (Kelly, 1999; Remes Lenicov et al., 2018; Remes Lenicov et al., 2012), pero no puede dejarse de lado la contribución de otros factores, como las poliaminas (espermina y espermidina) y los exosomas del semen (Allen y Roberts, 1986; Ronquist y Nilsson, 2004).

En el mismo sentido, observaciones previas realizadas en nuestro laboratorio, demostraron que la interacción espermatozoide/CDs conduce, no sólo a la internalización del espermatozoide por las CDs sino también a la maduración fenotípica de las CDs y a la estimulación de la producción de IL-10 y a la supresión de la producción de IL-12p70, sugiriendo que los espermatozoides inducen un perfil tolerogénico en las CDs (Ceballos et al., 2009).

Sumado a estas observaciones y teniendo en cuenta que tanto la PGE-2 como el TGF- β se encuentran en grandes concentraciones en el plasma seminal, hemos demostrado que la PGE-2 cumple un rol central en el perfil inmunológico adquirido por las CDs, ya que es capaz de antagonizar las

acciones de TGF- β durante la diferenciación a partir de monocitos (Remes Lenicov et al., 2018).

Ha sido demostrado que el plasma seminal presenta la habilidad de inducir tolerancia a los antígenos paternos mediante la estimulación de la diferenciación y expansión de células T regulatorias (Treg), previniendo de esta forma, una respuesta inmune contra los espermatozoides y/o el embrión (Robertson et al., 2018) (Figura 2). Las células Treg son esenciales durante todo el transcurso del embarazo. Numerosos enfoques experimentales en ratones demuestran que la depleción de estas células causa la reabsorción fetal (Aluvihare et al., 2004). Llamativamente, este efecto es mucho más evidente cuando las Treg están ausentes antes o durante la implantación (Shima et al., 2010; Zenclussen et al., 2005). Se ha observado en mujeres sanas que la exposición al semen está asociada positivamente con el número de células Treg en sangre (Arruvito et al., 2007; Tilburgs et al., 2008). Consistentemente, en ratones hembra luego del coito, se han observado incrementos en células Treg en sangre y útero, y estas mostraban especificidad antigénica por antígenos paternos (Guerin et al., 2011; Robertson et al., 2009a). Esta respuesta tolerogénica es inducida aún en ausencia de concepción sugiriendo un rol muy importante para el plasma seminal (Guerin et al., 2011). Se ha demostrado además, que el apareamiento con machos vasectomizados (sin espermatozoides), igualmente induce la expansión de Tregs, mientras que en ratones sin vesícula seminal (sin plasma seminal) se pierde este efecto (Robertson et al., 2009a). Esto sugiere que, en el ratón la inmunomodulación del semen está determinada por las secreciones de la vesícula seminal y no de los espermatozoides u otros componentes del

epidídimo.

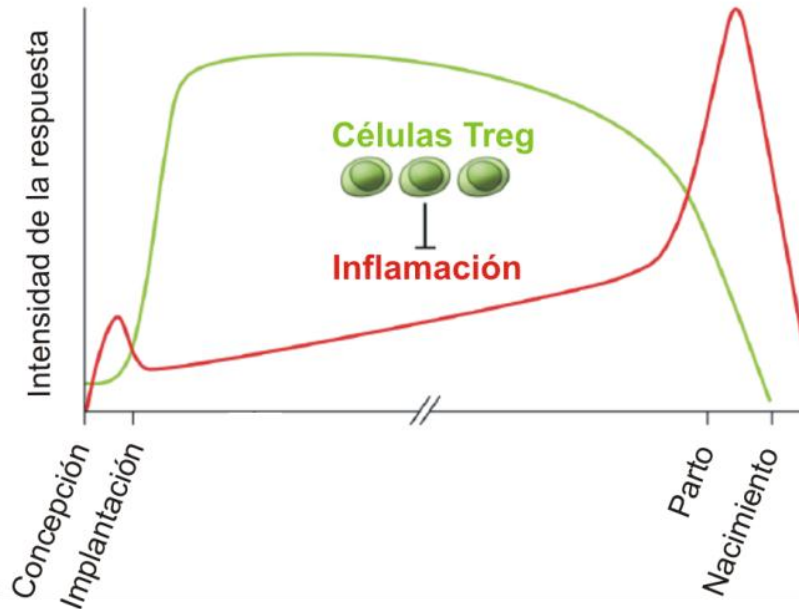


Figura 2 Balance inmune durante el embarazo. Las células Treg se originan luego de la fase inflamatoria temprana. Este ambiente proinflamatorio perdura hasta la implantación. Las Treg establecen un ambiente antiinflamatorio durante los 9 meses de embarazo. Al comenzar el trabajo de parto estas decaen y una intensa respuesta inflamatoria emerge para dar lugar al alumbramiento (adaptado de (Robertson et al., 2018).

El semen humano es una gran fuente de aloantígenos, principalmente HLA-G soluble presente en altas concentraciones en el mismo, pero también Ag asociados al cromosoma Y, ausente en las hembras (Dahl et al., 2014). Tanto la placenta como el feto expresarán estos antígenos, y es el contacto con el semen el primer momento en el cual el sistema inmune materno reconoce y desarrolla la tolerancia hacia estos Ags (Robertson et al., 2018). Se ha demostrado que en ausencia de células Treg ocurre la reabsorción fetal sólo en cruza de ratones alogéneicas pero no en cruza singeneicas (Aluvihare et al., 2004). Igualmente se ha observado que los fetos macho, son más susceptibles

al rechazo al estar ausentes las Treg (expresan antígenos H-Y, presentes solo en los machos) (Kahn y Baltimore, 2010). Estos datos coinciden con observaciones clínicas que asocian la exposición al semen con una mejor tasa de implantación en pacientes con sucesivas pruebas de fertilización asistida (Crawford et al., 2015). Curiosamente, la actividad sexual reiterada con la pareja de concepción, se ha asociado con un menor riesgo de preeclamsia, sugiriendo de manera indirecta que la sucesiva exposición a los mismos aloantígenos podría mejorar la tasa de éxito del embarazo (Dekker et al., 2011; Saftlas et al., 2014; Triche et al., 2014).

El mecanismo de inducción de células Treg no está aún bien caracterizado, sin embargo, como mencionamos anteriormente, observaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo, permitieron demostrar que el plasma seminal humano, a través de la PGE₂, promueve la diferenciación de CDs tolerogénicas caracterizadas por el siguiente fenotipo: CD1a⁻, CD14⁺, baja capacidad para producir las citocinas inflamatorias (IL-12p70, IL-1β, TNF-α, IL-6) y alta capacidad para producir IL-10 y TGF-β (Remes Lenicov et al., 2012). Observamos, además, que las CDs diferenciadas en presencia de plasma seminal fueron capaces de expandir y activar células T CD4⁺ en un perfil regulatorio (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺), productoras de IL-10 y TGF-β (Remes Lenicov et al., 2018; Remes Lenicov et al., 2012).

1.1.3 El semen y su interacción con los patógenos de transmisión sexual

El rol que tienen diversos componentes del semen sobre patógenos de

transmisión sexual ha sido abordado en la literatura científica. Sin embargo, la mayoría de los enfoques, resultan reduccionistas en el sentido que evalúan componentes aislados del semen, y no contemplan el contexto fisiológico en que se da la transmisión sexual.

En los últimos años, se han dado a conocer diversas investigaciones que establecen la capacidad del semen para modular la infectividad, especialmente en el marco de la infección por HIV-1. En este sentido, algunos de estos estudios demostraron efectos inhibitorios de la infección. Ensayos realizados por nuestro grupo y otras publicaciones han demostrado que la presencia de las proteínas clusterina y semenogelina I en el plasma seminal dificulta la captura del HIV-1 libre a través del receptor DC-SIGN, expresado únicamente en las CD4 (Martellini et al., 2009; Sabatte et al., 2007). Además, se han reportado acciones antivirales para los exosomas del semen, también en el contexto de la infección por HIV-1 y ZIKV (Muller et al., 2018; Welch et al., 2018). Otros mostraron efectos potenciadores de la infección. Experiencias realizadas en nuestro grupo demostraron que los espermatozoides son capaces de capturar HIV-1 y transmitir el virus a células dendríticas y a otras células blanco de la infección (Ceballos et al., 2009). Incluso a valores de pH extracelular similares a los encontrados en la vagina, se observó que el HIV-1 aumenta su capacidad de unirse a los espermatozoides y de infectar las CD4 (Ceballos et al., 2009). Se ha reportado además, que las fibrillas catiónicas derivadas de péptidos seminales facilitan la infección (Munch et al., 2007). En este sentido, existen reportes que demuestran que las fibras amiloides derivadas de semen (SEVI) potencian la infección de líneas celulares por HIV (Munch et al., 2007), aunque la reproducibilidad de este efecto ha sido

cuestionada y se propone que sea un efecto dependiente del dador de semen (Kim et al., 2010).

Estos resultados se suman a la capacidad del semen de provocar un rápido flujo hacia la mucosa cérvico-genital de células blanco de la infección por HIV-1 (Sabatte et al., 2011; Sharkey et al., 2012b) y la neutralización del pH ácido vaginal (Bouvet et al., 1997). Ha sido descripto que la mucosa vaginal, merced a su pH cercano a 5.0, es capaz de inactivar a varios patógenos de transmisión sexual, incluido el HIV-1 (Kempf et al., 1991; Masters y Johnson, 1961). Sin embargo, la deposición del semen lleva el pH vaginal a un valor cercano a 6.5, permitiendo la infección (Bouvet et al., 1997; Wolters-Everhardt et al., 1986). Estos estudios marcan una tendencia a reconocer un rol activo del semen durante la transmisión viral, aunque su análisis en conjunto no permite aún concluir si la acción seminal es predominantemente protectora o promotora de la infección (Doncel et al., 2011; Sabatte et al., 2011).

1.2 Fisiología de la respuesta inmune en la mucosa genital femenina.

Nuestra percepción de la respuesta inmune ha cambiado mucho en la última década. Anteriormente, la mayoría de las investigaciones sobre el sistema inmune se limitaban al compartimento linfático y a las respuestas observadas en sangre. Sin embargo, ha aumentado nuestro conocimiento sobre los tejidos que abarcan la piel y las mucosas, que son los sitios de contacto con el ambiente y donde se contienen la mayoría de las infecciones. Además, con el número creciente de estudios que abordan la respuesta inmune en las

mucosas, se han identificado factores en los tejidos que le dan improntas características a las células inmunes que en ellos residen (Beura et al., 2018; Mackay et al., 2013; Pizzolla y Wakim, 2019; Schenkel et al., 2014). La mucosa genital no escapa a esta definición; las células que residen en la vagina, el cérvix y el útero, están adaptadas para funcionar en contextos muy específicos de estos tejidos, como la menstruación, la concepción o el parto (Zhou et al., 2018). Estas adaptaciones, en parte, son coordinadas por hormonas y otros factores presentes en la mucosa (Zhou et al., 2018). A diferencia de la mucosa intestinal, la mucosa genital no presenta estructuras linfoides encapsuladas, como las placas de Peyer, pero sí cuenta con la generación de estructuras linfoides secundarias, particularmente en procesos infecciosos (Yeaman et al., 1997). La mucosa vaginal interactúa con una nutrida microbiota dominada por el género *Lactobacillus* y en menor medida *Atopobium*, *Prevotella*, *Bifidobacterium* y *Firmicutes*. En numerosos estudios de disbiosis se ha podido comprobar el rol central de la microbiota en modular los procesos infecciosos, particularmente a la adquisición de ETS, pero también se ha asociado esta al parto pretérmino (Hyman et al., 2014; Kindinger et al., 2016; Ma et al., 2012).

En la mucosa cérvico-vaginal residen, principalmente células linfoides innatas (ILCs), células presentadoras de antígenos profesionales, células plasmáticas B y células T residentes de memoria (Trm). Las células NK son, dentro de las ILCs, las más abundantes. En contraste con el tejido uterino, las células NK tienen un fenotipo citotóxico similar al observado en sangre periférica y median la defensa contra patógenos, aunque a su vez se han reportado roles inmunoregulatorios sobre las células Trm (Luci et al., 2015; Mselle et al., 2007). Tanto en humanos como en ratones, se han caracterizado al menos tres

poblaciones de células presentadoras de Ag. profesionales: células de Langerhans (CL; langerina⁺), CDs (CD11c⁺, CD11b⁺, F4/80⁻) y macrófagos (CD11c⁻, CD11b⁺, F4/80⁺). Estas tres poblaciones se originan a partir de precursores mieloides, residen por mucho tiempo en el tejido y pueden ser renovadas por diferenciación de monocitos derivados de sangre en contextos de infección o de injuria, pero no en condiciones homeostáticas (Iijima et al., 2008; Zhao et al., 2003). Aunque no se sabe específicamente que rol cumple cada una de estas poblaciones en la defensa contra infecciones, se ha identificado a las CDs como las únicas capaces de generar una respuesta Th1 durante la infección herpética (Zhao et al., 2003). Este hecho refleja observaciones en humanos donde las CDs aisladas de vagina fueron capaces de inducir una respuesta productora de IFN- γ en células T CD4⁺, en contraste con las CLs (Bursch et al., 2007).

En cuanto a las células de la inmunidad adaptativa, la mucosa cérvico-vaginal aloja células plasmáticas productoras de anticuerpos que, contrariamente con otras mucosas, producen mayores títulos de IgG que de IgA. La producción de IgA de hecho, está ligada al ciclo hormonal, tanto en ratones como en humanos (Wira et al., 2015).

El compartimento de LT en la mucosa cérvico-vaginal se caracteriza por una profusa presencia de células T CD8⁺ y T CD4⁺. Experimentos de parabiosis, donde se definen a las células T residentes por su incapacidad de recircular, identificaron más de tres poblaciones de linfocitos T_{rm} en vagina: CD103⁺CD69⁺, CD103⁻CD69⁺, CD103⁺CD69⁻ (Steinert et al., 2015). Mayoritariamente, las células T CD8⁺ en vagina mantienen un fenotipo

citotóxico efector (Mackay et al., 2013; Schiffer et al., 2018). Asimismo, se ha valorado el rol de las células Trm CD4⁺ que, interactuando con macrófagos y LB en nichos específicos de la vagina, coordinan la activación de las células Trm CD8⁺, a través de la producción de IFN- γ (Iijima y Iwasaki, 2014; Nakanishi et al., 2009).

En cuanto a la mucosa uterina, muchas de las células de la inmunidad innata, como macrófagos, células NK uterinas y neutrófilos, están involucradas en facilitar los cambios estructurales y fisiológicos asociados al ciclo menstrual, liberando proteasas, factores angiogénicos y quimiocinas. Asimismo, a lo largo del útero se pueden observar agregados linfoides donde residen principalmente células T CD8⁺ y LB productores de anticuerpos, aunque si las células T CD8⁺ son aisladas y estimuladas *ex vivo*, estas no presentan la actividad citotóxica que caracteriza a las células T CD8⁺ de cérvix o vagina (Figura 3).

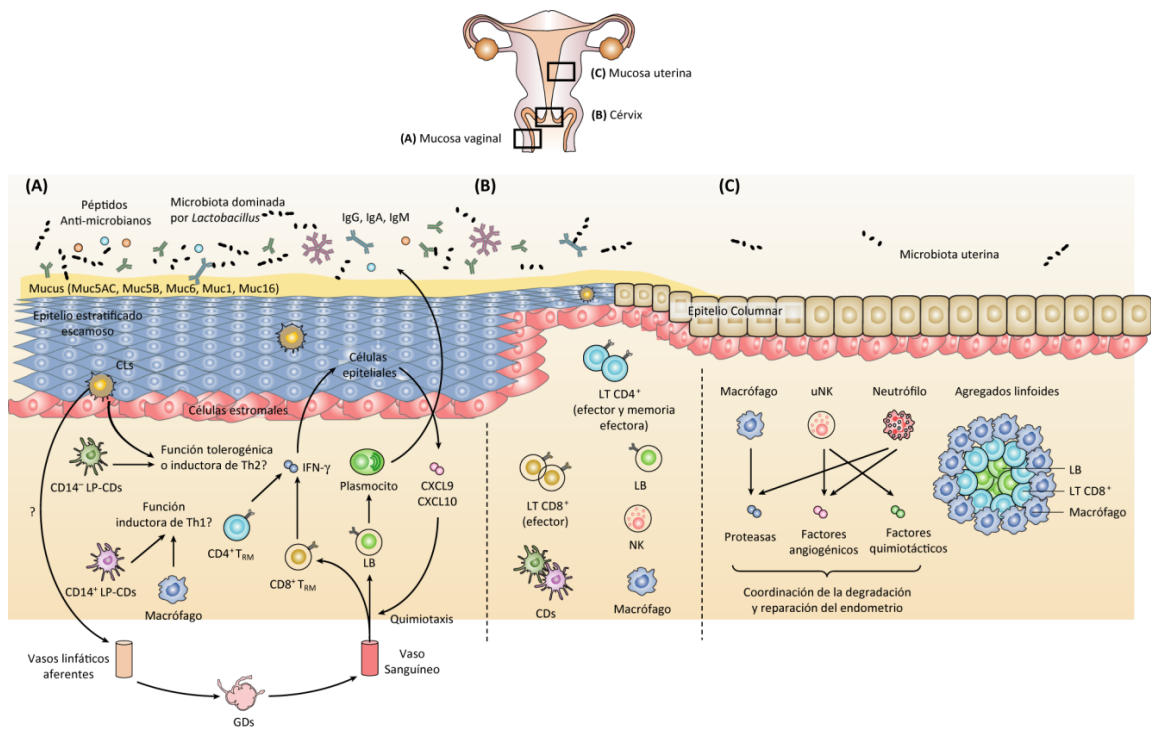


Figura 3 Topología de la respuesta inmune en la mucosa genital femenina. Componentes y diferencias que caracterizan a la mucosa vaginal (A), cervical (B) y uterina (C). Adaptado de (Zhou et al., 2018)

1.2.1 Implicancia de la respuesta inmune en la mucosa vaginal en el desarrollo de vacunas.

Actualmente, no existen vacunas preventivas para la mayoría de las ETS, a pesar de los enormes esfuerzos hechos hasta el momento (Gottlieb y Johnston, 2017). La mucosa genital es el sitio de entrada para la gran mayoría de los casos de transmisión sexual, y generalmente alberga al patógeno antes de que este se disemine hacia otros compartimentos. Por lo tanto, para el desarrollo de vacunas efectivas contra estas enfermedades es necesario generar una respuesta de memoria potente en la mucosa cérvico-vaginal. Esto representa un gran desafío que puede observarse en las evaluaciones hechas a partir de los ensayos clínicos de vacunas para el HIV-1 o el HSV-2 (Gottlieb y Johnston,

2017; Wijesundara et al., 2017). Los niveles de anticuerpos neutralizantes generados en respuesta a la vacunación en la vagina suelen ser muy bajos e ineficaces para evitar la infección (Kaufmann y Flechtner, 2016).

Frente a esta evidencia, se le ha dado creciente importancia a la respuesta de memoria celular en el tejido, particularmente a los linfocitos Trm CD8⁺. Como mencionamos anteriormente, las células Trm CD8⁺ funcionan de una manera similar a la inmunidad innata, en el sentido que, al contactar epítopes antigénicos rápidamente montan una fuerte respuesta citotóxica eliminando las células infectadas y liberando citocinas (principalmente IFN- γ). El primer intento de generar linfocitos Trm CD8⁺ en vagina fue en el contexto de la vacunación por HSV-2 (Shin y Iwasaki, 2012). En este estudio, se inmunizó por vía subcutánea a ratones con HSV-2 atenuado y luego se les administró CXCL9 y CXCL10 de manera intravaginal para reclutar las células generadas al tejido, lo que resultó en una mejor respuesta frente a una infección vaginal (Shin y Iwasaki, 2012). En numerosos modelos animales se observó que la presencia de células Trm CD8⁺ en el tejido vaginal implica protección ante desafíos locales (Fernandez-Ruiz et al., 2016; Mueller y Mackay, 2016; Pizzolla et al., 2018). Por estos motivos, se están realizando grandes esfuerzos para entender los requerimientos para generar linfocitos Trm en la mucosa vaginal en respuesta a una infección o una vacunación (Wijesundara et al., 2017).

1.3 La transmisión sexual de HSV-2

El virus herpes simplex tipo 2 (HSV-2) es el patógeno de transmisión sexual de mayor prevalencia en el mundo (Sperling et al., 2008). Se estima que afecta

aproximadamente a 530 millones de personas, cifra que actualmente continua ampliándose (Looker et al., 2017; McQuillan et al., 2018; Schiffer y Corey, 2013; Xu et al., 2006). En Argentina, la prevalencia de HSV-2 en mujeres, en los últimos 15 años, es entre 31-40% de la población total (Schiffer y Corey, 2013) (Figura 4). Este patógeno causa comúnmente ulceraciones genitales, aunque en neonatos y adultos inmunocomprometidos puede llegar a producir encefalitis letal (Chentoufi et al., 2012; Gershon, 2011). En cuanto a las ulceraciones, se ha observado que estas aumentan enormemente la probabilidad de contraer una infección por HIV-1 (Corey et al., 2004). La infección por HSV-2 es una infección latente, permanece toda la vida, y puede ser tanto sintomática como asintomática (Fife et al., 2008). Es por ello que existen en la población numerosos individuos infectados sin diagnóstico (Belshe et al., 2012; Gilbert et al., 2011), produciendo y liberando partículas virales infectivas en los fluidos sexuales aun siendo estos asintomáticos (Phipps et al., 2011).

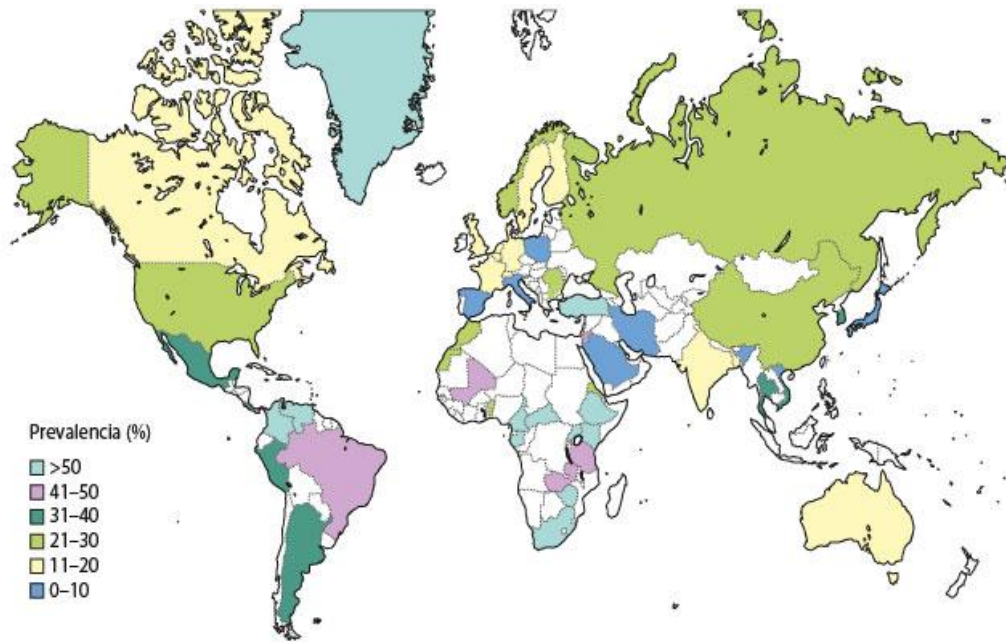


Figura 4 Prevalencia de la infección por HSV-2 en mujeres. Mapa basado en los análisis serológicos de 15 años (previos a 2012) que distinguen entre HSV-2 y HSV-1. Países en blanco no tienen datos disponibles. (Schiffer y Corey, 2013)

Actualmente no existe una cura efectiva para las infecciones por HSV-2 y tampoco vacunas preventivas. La única opción terapéutica disponible es el uso de antivirales durante los períodos de manifestación de la enfermedad que restringen el daño causado por las ulceraciones. Los esfuerzos actuales para encontrar una vacuna preventiva no son pocos y numerosas preparaciones han llegado a pruebas clínicas, aunque sin éxito aparente (Gottlieb y Johnston, 2017; Kaufmann y Flechtner, 2016; Koelle y Corey, 2008; Morello et al., 2012)

El virus HSV-2 pertenece a la familia *Herpesviridae*, orden *alphaherpesvirus*. Posee una envoltura que expresa las glicoproteínas virales y una estructura llamada tegumento que rodea a la cápside icosaédrica. Esta última protege al ADN genómico viral (Figura 5).

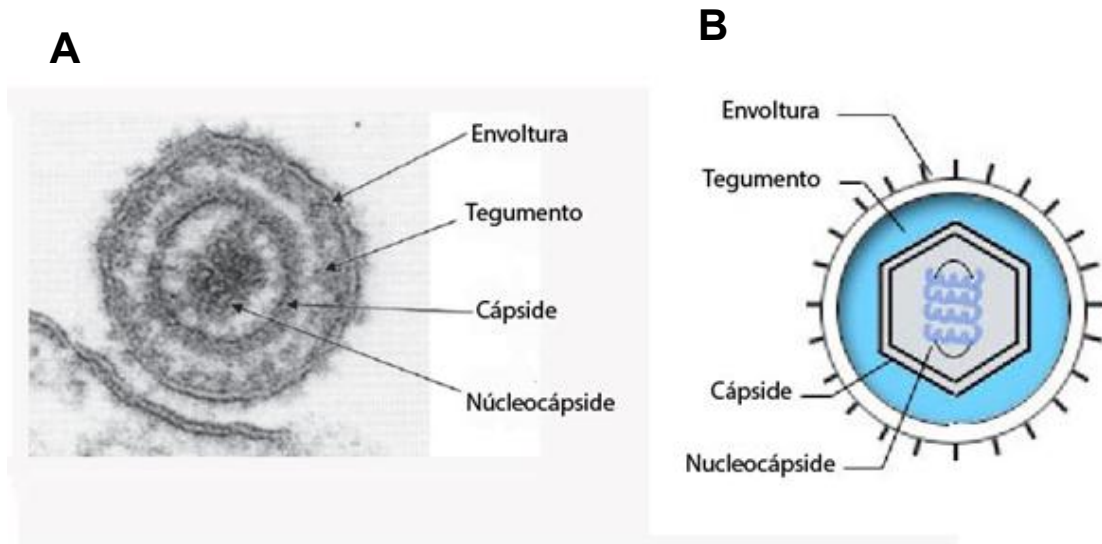


Figura 5 Estructura de HSV-2. A) Microscopía electrónica mostrando la interacción de HSV-2 con una célula blanco (Mettenleiter, 2003). B) Esquema de la estructura de HSV-2.

El HSV-2 infecta productivamente las células de la epidermis media y baja del epitelio vaginal, a las que puede acceder a través de microabrasiones generadas en el acto sexual (Schiffer y Corey, 2013). El virus egresa de la célula infectada e infecta rápidamente al queratinocito vecino, induciendo la lisis y causando úlceras en la mayoría de los casos (Roizman y Taddeo, 2007). El HSV-2 se une a distintos receptores celulares, como el HVEM, de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (Montgomery et al., 1996), y componentes de la membrana bastante ubicuos, como el heparán sulfato. En este sentido puede acceder a distintos tipos celulares: células epidérmicas de la mucosa vaginal, ciertas células del sistema inmune y neuronas sensoriales, una peculiaridad repetida entre varios integrantes de la familia *Herpesviridae* (Figura 6). Al ir propagándose el virus consigue ingresar a las terminales axónicas de neuronas sensoriales, y acceder al ganglio sacro por transporte retrógrado. Allí, entra en estado de latencia (Liu et al., 2000). Una vez controlados los focos de infección, el virus permanece latente en las neuronas

y puede reactivarse, estableciendo nuevos focos infecciosos (Dasgupta y BenMohamed, 2011).

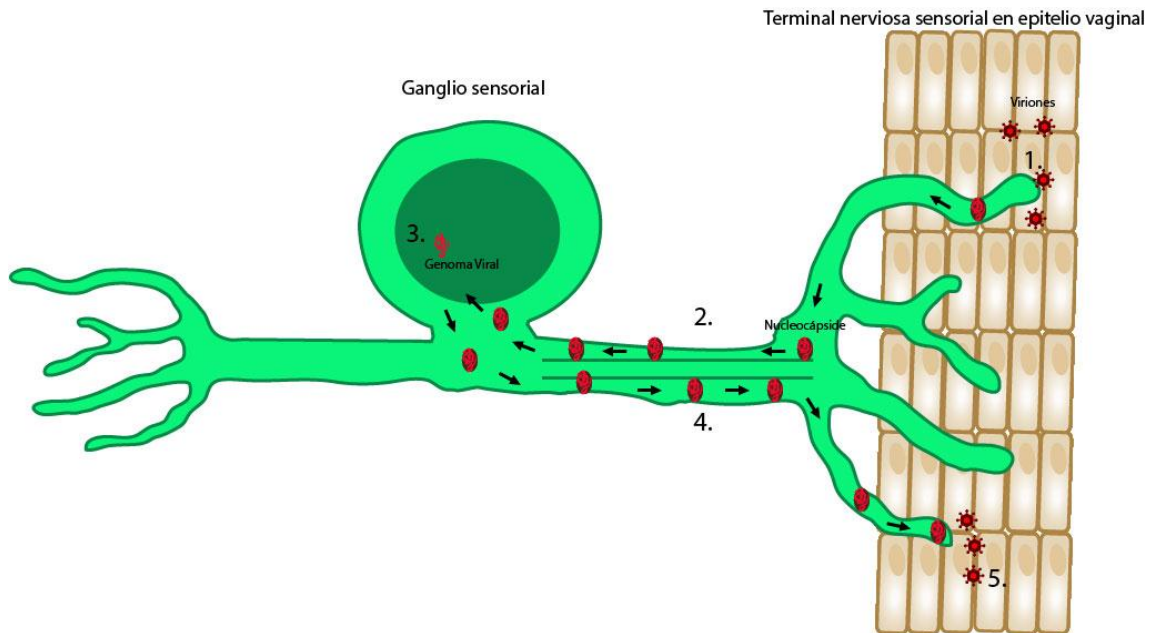


Figura 6 Transporte axonal de HSV-2. 1. El virus que infecta las células epiteliales de la vagina logra infectar una neurona sensorial. El virus al ingresar a la neurona libera su nucleocápside. 2. Las proteínas de la nucleocápside interaccionan con dineínas que transportan el complejo a través de los microtúbulos axonales, hasta el ganglio sensorial por transporte retrógrado. 3. El genoma viral ingresa al núcleo de la neurona donde establece la latencia. En este estado se expresan transcritos denominados LATs que causan la heterocromatización del genoma viral y el silenciamiento parcial de sus genes. 4. Cuando ocurre la reactivación, se expresan las proteínas virales y se ensambla la nucleocápside. Esta interacciona con kinesinas que la transportan a través de los microtúbulos, por transporte anterógrado. 5. En las terminales nerviosas el virus brota y reinfecta células epiteliales.

1.3.1 El rol del semen en la infección por HSV-2

Los trabajos que han abordado la importancia del semen en la infección por HSV-2 son aislados y muy escasos. Se puede cuantificar al virus tanto en semen como en hisopados vaginales en humanos y en modelos animales por

qPCR (Morrison et al., 1998; Wald et al., 1999). Hay tres formas de viriones infectivos dentro del semen: libres en el plasma seminal, unidos a espermatozoides e infectando células redondas o epiteliales del semen (Pallier et al., 2002; Sherman y Morgan, 1989). Se ha descrito que el HSV-2 induce la apoptosis, resultando en una disminución en el número de espermatozoides en individuos infectados, aunque mantienen su estructura y movilidad (Monavari et al., 2013).

Los estudios previos que han evaluado el impacto del plasma seminal sobre la infección por HSV-2, se han focalizado tanto en la eficiencia de la infección como en la efectividad de los microbicidas tópicos vaginales. Estos trabajos muestran que el plasma seminal no modifica la infección por HSV-2 *in vitro* ni el curso de la infección primaria en ratones (Patel et al., 2007; Sherman y Morgan, 1989). Sin embargo, observaron que el plasma seminal reduce la efectividad de los microbicidas polianiónicos (Patel et al., 2007). Por otro lado, contrastando estas observaciones que indican que el plasma seminal no afecta la replicación *in vitro*, Torres y col. reportaron que el plasma seminal humano aumenta la infección de células por HSV-2 *in vitro* (Torres et al., 2015).

1.3.2 La respuesta inmune frente a HSV-2

La respuesta inmune frente a la infección por HSV-2 del aparato genital femenino, comienza tempranamente durante la infección de los queratinocitos (Figura 7). Se han descrito numerosos mecanismos por los cuales el virus es detectado: por la vía del receptor citosólico RIG-1 (Chiu et al., 2009), por los receptores tipo Toll, como el TLR-9 (Lund et al., 2003) o por la activación del

Inflamasoma (Muruve et al., 2008). Todos estos mecanismos estimulan la secreción de IFNs de tipo I, que activarán distintos procesos inflamatorios. Esta señal será amplificada por CD plasmocitoides, presentes en la epidermis (Lund et al., 2006). Como demuestran varios trabajos es fundamental el reclutamiento de neutrófilos y la presencia de células NK (Milligan, 1999; Orange, 2006). La importancia de las células NK en las primoinfecciones por HSV-2 ha sido demostrada en modelos murinos y deficiencias humanas naturales (Ashkar y Rosenthal, 2003; Orange, 2006; Thapa et al., 2007). El mecanismo efector que se atribuye a las células NK como esencial durante la respuesta innata de la mucosa vaginal, es la secreción temprana de IFN- γ (Ashkar y Rosenthal, 2003; Lee et al., 2017). Los linfocitos T $\gamma\delta$ intraepiteliales también serían importantes en la defensa contra el virus (Nishimura et al., 2004). De igual manera se reclutarán CDs con fenotipo CD11c⁺ CD11b⁺ y monocitos circulantes de la sangre con el receptor CCR2, hacia la mucosa vaginal (Iijima et al., 2011; Iwasaki, 2007). Estos últimos dos tipos celulares, madurarán ante el contacto con HSV-2 y migrarán hacia los ganglios drenantes donde inducirán la proliferación de linfocitos T CD4⁺, activándolos hacia un perfil Th1, y de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Lee et al., 2009; Zhao et al., 2003).

Estudios realizados en ratones deficientes en la expresión de los factores de transcripción T-bet y STAT4, necesarios para la producción de IFN- γ , han demostrado la importancia del perfil Th1 en la inmunidad anti-HSV-2 (Svensson et al., 2005; Svensson et al., 2012). El efecto de estas deficiencias se revierte al suplementar a los ratones con IFN- γ , demostrando que la secreción de esta citoquina es el mecanismo efector más importante en la respuesta Th1 anti-HSV-2 (Svensson et al., 2005; Svensson et al., 2012). Además, se ha

demostrado que el desarrollo de la memoria celular T CD4⁺ y T CD8⁺, es esencial en el control de la latencia (Janssen et al., 2003; Schiffer y Corey, 2013). La secreción de anticuerpos por linfocitos B, también es muy importante en el control de la infección. Las IgG neutralizan al virus por unión a sus glicoproteínas (Kwant-Mitchell et al., 2009). Asimismo, la IgA, puede mediar la captura de virus en la luz vaginal (Ashley et al., 1994). Los ensayos de vacunación para prevenir la infección por HSV-2, han demostrado una importante contribución de los anticuerpos a la protección, aunque en ausencia de una respuesta celular robusta, son insuficientes (Boukhvalova et al., 2015; Halford et al., 2015; Kohl et al., 2000; Petro et al., 2015).

Se han observado focos de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, junto con CD4, macrófagos y linfocitos B cerca de las terminales axónicas de neuronas infectadas (Zhu et al., 2007) y el alineamiento de estas células en toda la región subepitelial de la vagina, aun cuando ya la infección aguda ha sido controlada (Iijima et al., 2008). En estos casos, las células B y CD4 en los focos serían las encargadas de la rápida reestimulación de los linfocitos efectores en la respuesta de memoria (Iijima et al., 2011). Sorprendentemente, se ha descrito un mecanismo efector de los linfocitos T CD8⁺ sobre el virus dentro de las neuronas que no es citolítico, mediado por la granzima B que es capaz de clivar la proteína viral ICP4 y evitar la transcripción del genoma viral (Knickelbein et al., 2008).

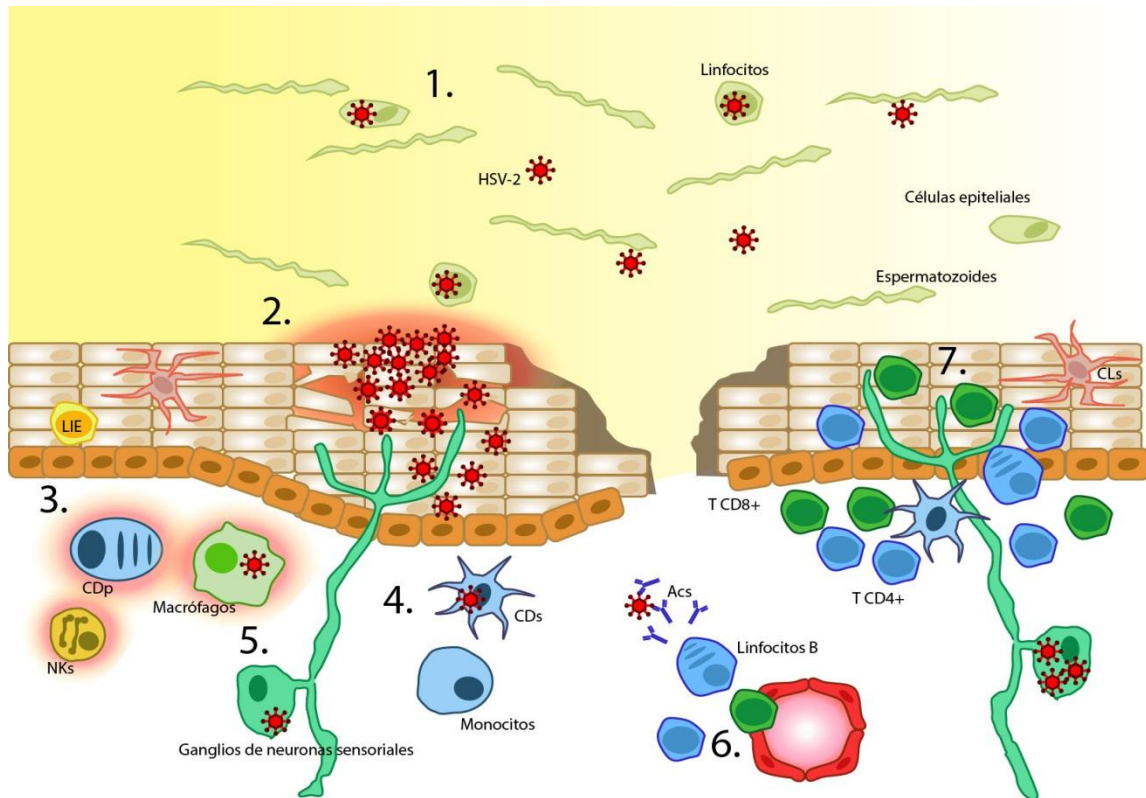


Figura 7 Eventos de la infección por HSV-2. 1. El virus puede ingresar en el semen, libre, unido a los espermatozoides o dentro de las células infectadas. 2. El HSV-2 puede infectar a las células epiteliales de la vagina donde se multiplica y pasa de célula a célula. A medida que replica el virus causa la apoptosis de las células infectadas, dando lugar a las lesiones características de estas infecciones. Las células epiteliales infectadas activan sus mecanismos de defensa intrínsecos, asociados a la secreción de IFNs de tipo I. 3. La señalización del epitelio es amplificada por las células dendríticas plasmocitoides (CDP). Además se activan células NK, que secretan IFN- γ , y macrófagos que median la señalización de reclutamiento y actividad antiviral innata. 4. Tanto el epitelio como las células activadas por este liberan quimiocinas que reclutan CDs de la submucosa y monocitos circulantes al sitio de infección. Estos podrán adquirir antígenos virales, por procesamiento de viriones o células infectadas, que presentarán en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I y II. Estas células presentadoras migrarán a los ganglios drenantes de la mucosa vaginal donde activarán linfocitos. 5. A medida que progresa la infección el HSV-2 infecta neuronas sensoriales. Dentro de estas viaja por transporte retrógrado a través del axón hasta el ganglio sacro, donde establece un estado de latencia. 6. La activación de la inmunidad adaptativa específica, consiste en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ de perfil Th1, linfocitos T CD8⁺ y linfocitos B (LB). Estos tipos celulares mediarán la secreción de IFN- γ , la actividad citotóxica contra células infectadas y la secreción de IgGs e IgAs respectivamente. 7. La respuesta inmune adaptativa logra controlar al virus activo pero el virus latente en los ganglios permanece. Este podrá reactivarse, dando lugar a la infección de células epiteliales cerca de sus terminales. Estos focos son rápidamente controlados ya que las células T CD4⁺, T CD8⁺ y

LB de memoria permanecen alineadas a lo largo de la submucosa genital. Al ocurrir la reactivación viral, CD4, macrófagos y LB podrán reestimar rápidamente a las células de memoria para que respondan eficazmente frente al virus.

Como fue mencionado anteriormente, algunos individuos cursan una infección asintomática. Se ha observado que los pacientes asintomáticos tienen una respuesta Th1 aumentada (Eriksson et al., 2004; Singh et al., 2003). Diferentes haplotipos de HLA también pueden mostrar correlación en este sentido (Lekstrom-Himes et al., 1999). También se han asociado al mejor control viral, la modificación de ciertos epítopes inmunodominantes (Chentoufi et al., 2012), altos niveles de lectinas que unen manano (Gadjeva et al., 2004), infecciones previas por HSV-1 (Langenberg et al., 1999) y variantes genéticas del gen de TLR2 (Bochud et al., 2007) y de lectinas que unen manosa (Seppanen et al., 2009).

En resumen, el plasma seminal depositado en la mucosa genital femenina induce una reacción inflamatoria que recluta leucocitos al epitelio, pero simultáneamente dispara mecanismos tolerogénicos hacia los Ags seminales. Ambos aspectos de la función seminal, aparentemente contrapuestos, pueden tener implicancias en un evento de transmisión de HSV-2 y en el curso de la respuesta inmune específica.

En el presente trabajo de tesis, mediante un modelo de infección herpética intravaginal, evaluamos si el contenido de vesículas seminales (VS), que representa el 60% del plasma seminal, es capaz de modular la respuesta inmune anti-HSV-2. Se observó que VS incrementa considerablemente el efecto protector inducido por la vacunación intravaginal con HSV-2 inactivado,

potenciando la respuesta T de memoria. La alta prevalencia de enfermedades de transmisión sexual revela la importancia de esta temática de estudio que define un campo de conocimiento muy poco explorado.

1.4 Hipótesis

El presente proyecto aborda una temática frecuentemente asumida en la literatura científica, pero que no ha sido aún examinada con rigurosidad; el impacto del semen sobre la capacidad del sistema inmune, presente en las mucosas receptoras (tracto reproductor femenino), de montar una respuesta inmune efectiva contra patógenos de transmisión sexual.

Nuestra hipótesis sostiene que el semen, al ser depositado en la vagina, es capaz de modular la respuesta inmune anti-infecciosa. En el contexto de una infección por HSV-2, esperamos que el semen altere el desarrollo de los eventos posteriores a la transmisión. Más allá de los trabajos previos de nuestro grupo, hay escasos estudios en la literatura, y no hay trabajos en modelos *in vivo* que hayan examinado esta temática, aun cuando es conocido que el semen contiene altas concentraciones de agentes inmunomoduladores.

El tema en estudio adquiere particular relevancia en relación a la problemática actual de las ETS. El semen podría afectar el curso de la respuesta inmune anti-infecciosa, como así mismo las respuestas obtenidas a partir de la vacunación, extendiendo de esta manera el interés de la temática al campo de la inmunoprofilaxis.

2 CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis es evaluar la capacidad del fluido contenido en las vesículas seminales (VS), que representa el 60% de los componentes del plasma seminal murino, de modular el curso de la infección y la respuesta inmune anti-infecciosa operativa en la mucosa vaginal y en sus ganglios drenantes en el modelo de la infección intravaginal por HSV-2.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Objetivo específico 1

Evaluar la capacidad de VS de modular *in vivo* la infección primaria por HSV-2 adquirida por vía intravaginal, mediante la administración en forma simultánea, o no, de VS de ratones singénicos. En estos evaluamos:

I. El curso y la severidad de la infección primaria.

- a) La producción viral en lavados vaginales.
- b) Los signos y síntomas de la enfermedad herpética de acuerdo a criterios establecidos en la literatura (Morrison et al., 1998).
- c) El peso de los ratones infectados.
- d) La supervivencia de los ratones a la infección.

2.2.2 Objetivo específico 2

Evaluar la capacidad de VS de modular *in vivo* la respuesta inmune de memoria inducida por la inmunización con el virus HSV-2 inactivado por vía intravaginal, en un modelo murino. Caracterizar los mecanismos subyacentes responsables de la actividad inmunomoduladora ejercida por el contenido de las vesículas seminales. Con tal fin, se vacunaron por vía intravaginal con HSV-2 inactivado hembras BALB/c en presencia o no de VS de ratones singénicos. Posteriormente, a los 30 días, se desafiaron con una dosis letal de HSV-2 por vía intravaginal. Evaluamos:

I. El curso y la severidad de la infección.

- a) Los signos y síntomas de acuerdo a criterios establecidos en la literatura (Morrison et al., 1998).
- b) El peso de los ratones infectados.
- c) La supervivencia de los ratones a la infección.

II. La respuesta inmune específica ante el desafío letal.

- a) Las poblaciones celulares presentes en el tracto genital y en los ganglios drenantes de la mucosa vaginal (GDs).
- b) La funcionalidad de la respuesta inmune humoral específica en términos de los niveles séricos y en lavados vaginales de IgA e IgG.
- c) La funcionalidad de la respuesta inmune celular específica en términos de la producción de IFN- γ en los GDs y la mucosa genital ante estímulos específicos.

- d) La frecuencia de las células T regulatorias (CD4⁺, FOXP3⁺, CD25⁺) y expresión de las citocinas IL-10 y TGF-β en los GDs y en la mucosa vaginal.

III. El tipo de respuesta de memoria que induce la presencia de VS durante la inmunización intravaginal con HSV-2 inactivado.

- a) Las poblaciones de memoria celular en los GDs en términos de su fenotipo (Centrales o Efectoras).
- b) La relevancia de la acción ejercida por la respuesta T de memoria en términos de su capacidad de producción de IFN-γ y de controlar la infección herpética mediante un ensayo de transferencia adoptiva de células T en hembras no inmunizadas.

IV. Los mecanismos tempranos que induce la inmunización en presencia de VS.

- a) El ambiente inflamatorio, en términos de la presencia de IFN-γ, TNF-α e IL-6, en los GDs y la mucosa vaginal.
- b) La presencia y el fenotipo de las células dendríticas luego de la inmunización, en la mucosa genital y en los GDs.

3 CAPÍTULO 3: MÉTODOS

3.1 Reactivos y medios de cultivo

El cultivo de células murinas se realizó con RPMI 1640 (*Invitrogen*) y el de las líneas celulares con DMEM (*Invitrogen*) en ambos casos suplementados con 50 U/ml penicilina (*Invitrogen*), 50 µg/ml streptomina (*Invitrogen*) y suero fetal bovino (SFB) (*Gibco*), (medio completo). Para cultivos de más de 18 horas, las células de ratón se cultivaron en RPMI 1640 (*Invitrogen*) suplementado con 5% SFB (*Gibco*), 50 U/ml penicilina (*Invitrogen*), 50 µg/ml streptomina (*Invitrogen*), Hapes 10mM (*Thermoscientific*) y 2-mercaptoetanol 55 µM (*Thermoscientific*).

Los ratones fueron tratados con acetato de medroxiprogesterona 50 mg/ml (*Singestar Köing*), y anestesiados con Ketamina 50 mg/ml y Xilacina 20 mg/ml (*Laboratorios Richmond*), usando la dosis recomendada de 2 mg/20gr ratón y 0,2 mg/20gr ratón respectivamente.

3.2 Animales

Para todos los ensayos presentados en esta tesis se utilizaron ratones de la cepa BALB/cJ. En las inmunizaciones se utilizaron hembras de esta cepa de 6 a 8 semanas de edad al momento de la primera inoculación. Para la obtención de VS se usaron machos de 11 semanas de edad. Todos los ratones fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad Nacional de La Plata y criados según los estándares de calidad exigidos. Estos ensayos fueron aprobados por el

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Tanto los machos como las hembras fueron criados en jaulas con 4-5 ratones, en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con cama de viruta y acceso libre a alimento y agua, respetando las recomendaciones de cuidado y uso de animales de laboratorio. Los experimentos se diseñaron usando un enfoque de reducción, replazo y refinamiento. Los ratones hembra fueron asignados a cada grupo experimental de manera aleatoria por azar, y se adoptó un diseño de bloques para disminuir la variabilidad aportada por variables no estudiadas.

3.3 Cepas virales

Se usó el Virus Herpes Simplex de tipo 2 (HSV-2) de la cepa G, cedido por el Dr. Carlos Puyol, identificado por qPCR y secuenciación. Esta cepa fue inactivada para realizar ciertas inmunizaciones, exponiendo al virus a luz UV a una distancia de 5 cm durante 30 minutos. La inactivación fue comprobada por el método de recuento de unidades formadoras de placas. Para estímulos *ex vivo* se usó virus vaccinia (VacV cepa Ankara) inactivado usando luz UV, cedido por la Dra. Magdalena Gherardi.

3.4 Obtención del contenido de vesículas seminales

A partir de ratones machos vírgenes de la cepa BALB/cJ de 11 semanas de edad se extrajo el contenido de las vesículas seminales en condiciones asépticas. Para ello los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y las vesículas removidas con tijera, excluyendo en el proceso la glándula

accesoria. El contenido se recuperó, en condiciones asépticas, con pipeta y se diluyó al medio en PBS estéril. Se realizó un “pool” con el contenido de las vesículas de 20 ratones. En lo posible el fluido fue utilizado para inmunizar hembras inmediatamente después de la extracción, de no ser posible éste se guardó a -80°C hasta su uso.

Considerando que el eyaculado murino tiene un volumen final de 2-4 μ l y que la concentración proteica de la vesícula seminal es de 21 mg/ml, calculamos que la cantidad de proteína depositada luego del coito es entre 42-84 μ g (Anderson y Tarter, 1982; Anderson et al., 1983). Para aproximarnos a esos valores, todas las inoculaciones intravaginales se realizaron con 15 μ l de una solución conteniendo 5 mg/ml de proteína, ya sea VS o BSA, resultando en una cantidad proteica de 75 μ g, valor comparable a lo observado en luego del coito natural del ratón.

3.5 Protocolos de inoculación

En todos los protocolos, cinco días antes de cualquier inoculación intravaginal, los ratones fueron tratados con medroxiprogesterona 2 mg en 200 μ l, en el lomo. Antes de las inoculaciones intravaginales (ivag), las hembras fueron anestesiadas y se las sometió a microabrasiones vaginales usando una pinza de disección con algodón en la punta.

Para explorar la respuesta frente a una primoinfección los ratones fueron inoculados de manera intravaginal (ivag) con HSV-2 (10^5 ufp/ratón) en un inóculo de 15 μ l, diluyendo el virus en PBS/BSA 5% o en contenido de

vesículas seminales (VS) (5 mg/ml). La concentración proteica y el volumen de VS utilizados fueron determinados en función de la cantidad de proteínas en el eyaculado murino (Anderson y Tarter, 1982; Anderson et al., 1983). Se realizaron lavados vaginales a día 1, 3, 5 y 7. Para la obtención de muestras, los ratones se sacrificaron y las vaginas fueron removidas y separadas del resto del aparato genital. En los ensayos de supervivencia los ratones fueron monitoreados diariamente hasta el día 20 post infección, siendo sacrificados aquellos que alcanzaron el estado mórbido.

Para evaluar la respuesta de memoria las hembras fueron vacunadas intravaginalmente con 10^4 ufp/ratón de HSV-2 inactivado en presencia o no de VS (5 mg/ml) en 15 μ l. Como control se utilizaron ratones tratados intravaginalmente con PBS-BSA 5% o con VS pero sin inóculo viral. Treinta días después se desafió intravaginalmente a todos los ratones con una dosis letal de HSV-2 (2×10^6 UFP/ratón). Se realizó luego un seguimiento del estado clínico de los ratones y de su supervivencia y se obtuvieron lavados vaginales al día 4 post desafío. Este protocolo se interrumpió, de acuerdo al objetivo de cada experimento, a día 2 post inmunización, a día 28 post inmunización, a día 3 post desafío o a día 7 post desafío para explorar la respuesta inmune (esquemas en figura 8)

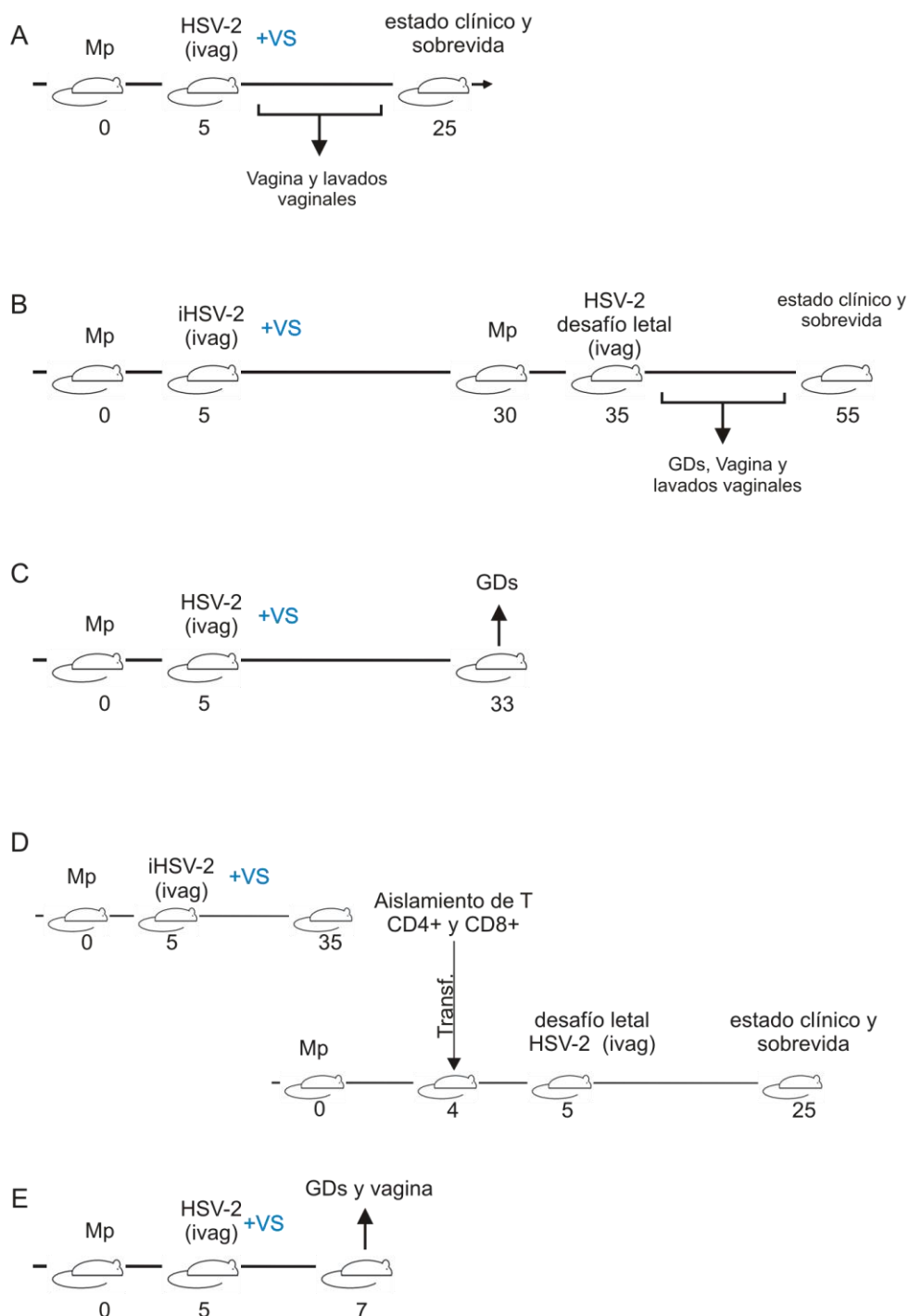


Figura 8 Protocolos de inmunización. En todos los protocolos se utilizó, 5 días antes de la inmunización, una dosis de 2mg/ml de medroxiprogesterona (mp.) inyectada en un volumen de 200 μ l en el lomo, para sincronizar el ciclo menstrual de las ratonas. A) Ensayo de infección. Los ratones fueron infectados intravaginalmente (ivag) con HSV-2 (10^5 ufp/ratón) en PBS-BSA 5% en presencia o ausencia del contenido de vesículas seminales (VS) (5 mg/ml). Se evaluó la supervivencia y la sintomatología al igual que los títulos virales en vagina y lavado vaginal (Resultados en figuras 8 y 9). B) Ensayo de inmunización con desafío. Para analizar

la respuesta de memoria, los ratones fueron inmunizados i.v. con HSV-2 inactivado usando luz UV (10^4 ufp/ratón) en PBS-BSA 5% o en VS (5mg/ml). Treinta días después de la inmunización se desafió a todos los grupos con HSV-2 en dosis letal (2×10^6 ufp/ratón). Se evaluó en este protocolo la supervivencia, sintomatología y parámetros inmunes en ganglios drenantes (GDs), vagina y lavados vaginales. (Resultados en figuras 10-19). C) Ensayo de inmunización Los ratones fueron inmunizados como en B pero fueron sacrificados 28 días después sin ser sometidos a un desafío. Se obtuvieron los GDs para evaluar la respuesta de memoria (Resultados en figuras 12C, 20-21) D) Transferencia adoptiva. 30 días después de la inmunización con HSV-2 inactivado (10^4 ufp/ratón) en PBS-BSA 5% o en VS (5mg/ml), se sacrificaron a los ratones y se purificaron las células T CD4⁺ y T CD8⁺ a partir de bazo. Mezclas en la proporción 3:2 (CD4:CD8) de estas células fueron, transferidas a ratones tratados previamente con medroxiprogesterona por vía retro orbital. Luego estos fueron desafiados con una dosis letal de HSV-2 (2×10^6 ufp/ratón) La sobrevivencia y el estado clínico de los ratones receptores fueron evaluados durante 20 días (Resultados en figura 22). E) Evaluación de la respuesta temprana. Ensayos para analizar la respuesta ante la inmunización con HSV-2 inactivado (10^4 UFP/ratón) en PBS-BSA 5% o en VS (5mg/ml) a día 2 en GDs y vagina (Resultados en figuras 23-24).

3.5.1 Lavados vaginales y evaluación del estado clínico

Para evaluar los títulos de HSV-2, la producción de citocinas y la producción de Ig en la mucosa vaginal se realizaron lavados vaginales a distintos días post-inmunización. Los lavados se hicieron con pipeta bajo anestesia usando dos repeticiones de 35 μ l de PBS 1x estéril.

Para evaluar el estado clínico de los ratones inoculados con HSV-2 se asignaron valores de 0 a 5; 0: sin signos aparentes; 1: eritema y edema genital suave; 2: inflamación genital moderada; 3: lesiones genitales purulentas; 4: parálisis de las extremidades posteriores; y 5: estado moribundo (Morrison et al., 1998). Los ratones fueron sacrificados al llegar al estado mórbido. El puntaje se asignó cada día a partir de la inmunización y además se tomó el peso de cada ratón como parámetro de estado clínico.

3.5.2 Obtención de muestras

Al momento del sacrificio o de cualquier intervención, el orden de los ratones fue determinado al azar. Luego del sacrificio por dislocación cervical, los ganglios ilíacos fueron identificados y separados cuidadosamente del tejido graso circundante. Por ratón se extrajeron los tres ganglios más evidentes. En el caso de las vaginas, se removió el aparato genital completo de las hembras y se removió la grasa circundante. Luego se realizaron dos cortes para separar la vagina del útero y la vulva. En ambos casos, las muestras recuperadas fueron mantenidas en RPMI 1640 con 5% de SFB a 4°C hasta que fueron procesadas y las células separadas.

Para obtención de suero se realizó la práctica de punción cardíaca en los ratones anestesiados de manera terminal y respetando las indicaciones éticas.

3.5.3 Separación de células y suero de las muestras

En todos los casos los bazos se disgregaron sobre mayas descartables (*strainers*) de 40 μm (*BD Biodinamics*) usando un émbolo estéril. El disgregado se resuspendió en 50 ml de RPMI completo. Luego fueron centrifugados a 1500 rpm 5 minutos y para lisar los glóbulos rojos, el precipitado fue tratado 4 minutos con una solución de NH_4Cl 0,1M frío diluido en agua tridestilada, usando 4 ml de esta solución por cada bazo en el procesado. Terminada la incubación se completó el volumen del tubo con RPMI completo con SFB 5% y se centrifugó nuevamente 5 minutos a 1500rpm. Se efectuaron dos lavados más con RPMI con SFB 5% y se contaron las células totales usando una

cámara de Neubauer y con Azul Tripán.

Los ganglios ilíacos fueron disgregados, usando mayas descartables (*strainers*) de 40 µm y émbolos estériles, y recolectando el volumen en tubos de 50ml. Las células fueron lavadas tres veces con RPMI completo con SFB 5% y centrifugando 5 minutos a 1500rpm. Se tomó una alícuota del procesado para contar en cámara de Neubauer con Azul Tripán.

Las vaginas fueron lavadas con PBS 1x para remover el mucus remanente. Estas se disgregaron parcialmente por cortes con tijera y luego se trataron con 10 ml de colagenasa IV (0.2 mg/ml) y DNAsa I (25 U/ml) (*Sigma-Aldrich*) durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente se filtraron las mezclas a través de mayas (*strainers*) de 40 µm, usando 15 ml de PBS y fueron lavadas por centrifugación 5 minutos a 1500rpm. Se tomó una alícuota del procesado para contar en cámara de Neubauer con Azul Tripán. En el caso del análisis del título viral en el epitelio vaginal, las vaginas enteras fueron trituradas mecánicamente en TRIzol (*Thermo Scientific*) para la posterior extracción de ARN.

Las muestras de sangre se mantuvieron separadas para analizarlas individualmente. Estas se dejaron a temperatura ambiente 4 horas y luego 12 horas a 4°C para provocar su coagulación. Posteriormente se extrajo del sobrenadante todo el suero posible y el remanente se centrifugó 4000rpm 10 minutos, para recuperar el resto del suero del sobrenadante. Hasta su uso, las muestras fueron conservadas a -80°C.

3.6 Titulación de virus

3.6.1 Líneas celulares

Para titular HSV-2 en los lavados vaginales, se usó la línea celular Vero E6 (*American Type Culture Collection – ATCC*) procedente de células epiteliales de riñón de mono verde africano. Las células fueron mantenidas con DMEM completo. Para hacer pasajes se utilizó solución fisiológica para lavar el medio seguido de un tratamiento con *Trypsina Express* (Invitrogen) 1 minuto a 37°C. Las células fueron mantenidas en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C.

3.6.2 Método de recuento de unidades formadoras de placas

Las células Vero fueron sembradas en placas de 12 pocillos (Nunc) (3x10⁶ células por placa), en DMEM con 10% SFB. Durante 24 horas se crecieron las células hasta alcanzar una confluencia de 80-90% y luego se procedió a inocularlas con virus. Para ello se preparó el inóculo en DMEM completo sin suero usando distintas diluciones de la muestra a titular. El medio fue retirado de las células, se lavaron y luego se mantuvieron con el inóculo durante 2 horas, en estufa, agitando la placa cada 15 minutos. Terminada la incubación se retiró el inóculo, se lavaron las células con solución fisiológica y se agregó DMEM 5% SFB con metilcelulosa (0,8 ml por cada 2ml de DMEM).

Al observarse la formación de placas de lisis, se procedió a fijar las células con para-formaldehído 3,7% en solución fisiológica durante 1 hora, y luego se practicó una tinción con cristal violeta 5% en metanol/acetona (1:1). Luego de 10 minutos se lavó el colorante con agua y se dejó secar. Las placas se

cuentan en aquellos pocillos donde hay entre 20-200 placas y se cuantifican teniendo en cuenta el volumen usado para inocular a las células y la dilución de las muestras usada para cada caso.

3.6.3 Determinación de la capacidad del contenido de vesícula seminal (VS) de comprometer la infectividad viral.

Para evaluar si el VS usado en las inmunizaciones tiene efecto sobre la infectividad viral, se procedió según el método descrito en 3.5.2 pero al inocular se agregaron distintas diluciones de VS junto con el virus.

Para evaluar la viabilidad de las células Vero expuestas a VS, estas fueron incubadas 2 horas con el fluido, luego fueron lavadas y cultivadas en DMEM completo con sal de tetrazolio (MTT). Dos horas después se evaluó por colorimetría la reducción de esta sal como medida de viabilidad. Se midió la absorbancia a 492nm de los sobrenadantes usando el equipo *MicroDrop* (*Thermo Scientific*)

3.7 Transferencia adoptiva de linfocitos T

Las células de bazo totales fueron recuperadas por cada grupo como indicado anteriormente y luego se purificaron por selección negativa los LT CD4⁺ y CD8⁺ usando columnas MACS (*Miltenyi*) (purificados en paralelo). Se corroboró la pureza de las preparaciones por citometría de flujo y se contaron las células. Se prepararon 5x10⁶ LT totales en una proporción CD4:CD8 3:2, en RPMI solo. Luego se inyectaron estas células con una aguja G27 en el seno retro orbital de ratones tratados con medroxiprogesterona anestesiados. Dieciocho horas

después estos ratones fueron desafiados intravaginalmente con una dosis letal de HSV-2 (esquemático en figura 6)

3.8 ELISA

La presencia de citocinas fue evaluada mediante ELISA utilizando como muestras los sobrenadantes provenientes de cultivos de células extraídas de vagina o ganglios ilíacos o también de lavados vaginales. En todos los casos las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su uso. Se utilizaron *kits* comerciales siguiendo las indicaciones del fabricante para medir las citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17A, IL-10 y TNF- α (*BioLegends*).

3.9 Determinación de los títulos de IgG e IgA específicos

Se midió IgA e IgG en lavados vaginales o IgG en muestras de suero por ELISA. Brevemente, microplacas de 96 pocillos fondo plano (*Greiner Bio-One*) fueron tratadas con un lisado de HSV-2 inactivado por luz UV (5 mg/ml) en *buffer* carbonato (0.05M; pH 6) durante 18 horas a 4°C . Las placas fueron luego bloqueadas con PBS-BSA 2% por una hora a temperatura ambiente. Después se sembraron diluciones de las muestras y se incubaron 2 horas. Posteriormente se lavaron las placas con PBS-*Tween* 0,05% y fueron incubadas con anticuerpos anti-IgG o anti-IgA de ratón hechos en cabra y acoplados a la enzima peroxidasa (*Jackson Immuno Research*). Una hora después se realizó otro lavado y se reveló utilizando el sustrato TMB (*BD biosciences*). Se midió la absorbancia a 450nm usando el equipo *MicroDrop* (*Thermo Scientific*).

3.10 PCR cuantitativa

El ARN total fue extraído a partir de 2×10^6 células obtenidas como se indica en la sección 3.4.4. Estas fueron lisadas con TRIzol (*Invitrogen*) durante 5 min y el homogenato fue incubado 2 min con CHCl_3 . Tras separar las fases por centrifugación (15min a 10000 g), el ARN fue precipitado de la fase acuosa mediante incubación por 15min con isopropanol. El ARN precipitado fue lavado por centrifugación en etanol 75% (5min a 7500 g), secado por evaporación y resuspendido en 20 μl de agua libre de ARNsas (*SIGMA-Aldrich*).

El ARN extraído fue utilizado como sustrato para la generación de ADN complementario (ADNc) mediante una reacción de transcripción reversa con la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV). Para ello, 500ng de ARN fueron incubados durante 50 min a 37°C junto con 200ng de *primers* aleatorios (*Invitrogen*), 0,01M de ditioneitol (DTT), 10mM de una mezcla de deoxinucleótidos y 0,25 U de MMLV (*Invitrogen*). Al término de la incubación, la MMLV fue inactivada por tratamiento térmico (10 min a 70°C) y el ADNc resultante fue utilizado para cuantificar la expresión de los genes *Il10*, *Tgfb*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl2* y *Ccl5* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). En el caso de la cuantificación del genoma viral se extrajo el ADN total a partir de muestras de vaginas según el *kit* de purificación de ADN viral (*Roche*). En todos los casos se eligieron los genes de referencia *Bactina* o *Hprt* de acuerdo al rango dinámico de cada gen en cuestión.

Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando la enzima Taq polimerasa y el colorante *SYBR Green* provistos en el reactivo *SYBR Green PCR Master Mix*

(*Invitrogen*), junto con los *primers* correspondientes y agua hasta completar 20 μ l finales. Todos los *primers* se utilizaron en una concentración final de 200nM, a excepción de los correspondientes a *Cxcl10* que se usaron a una concentración de 50nM *forward* y 900nM *reverse* (Carvalho-Gaspar et al., 2008). En todos los experimentos se corrieron reacciones sin muestra para comprobar la ausencia de contaminaciones. La especificidad de los productos fue comprobada por medición de la temperatura de fusión (melting).

Los *primers* usados se detallan a continuación:

<i>Cxcl9</i>	5'-TTTTCTTTTGGGCATCATCTT-3'	(<i>forward</i>)
	5'-AGCATCGTGCATTCTTATCACT-3'	(<i>reverse</i>)
<i>Cxcl10</i>	5'-GAAATCATCCCTGCGAGCCT-3'	(<i>forward</i>)
	5'-TTGATGGTCTTAGATTCCGGATTC-3'	(<i>reverse</i>)
<i>Ccl2</i>	5'- TTCACAGTTGCCGGCTGG-3'	(<i>forward</i>)
	5'-TGAATGAGTAGCAGCAGGTGAGTG-3'	(<i>reverse</i>)
<i>Ccl5</i>	5'- CAGCAGCAAGTGCTCCAATCTT-3'	(<i>forward</i>)
	5'-TTCTTGAACCCACTTCTTCTCTGG-3'	(<i>reverse</i>)
<i>Tgfb</i>	5'-AATTCCTGGCGTTACCTTGG-3'	(<i>forward</i>)
	5'-ATCGAAAGCCCTGTATTCCG-3'	(<i>reverse</i>)
<i>Hprt</i>	5'-ATCATTATGCCGAGGATTTGGAA-3'	(<i>forward</i>)
	5'-TTGAGCACACAGAGGGCCA-3'	(<i>reverse</i>)
<i>Bactina</i>	5'-TGTCCACCTTCCAGCAGCAGATGT-3'	(<i>forward</i>)
	5'-AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA-3'	(<i>reverse</i>)

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el método de cuantificación relativa de $\Delta\Delta C_t$ utilizando el gen *Bactina* o *Hprt* como referencia (Livak y

Schmittgen, 2001).

3.11 Citometría de flujo

Todas las mediciones se realizaron en un citómetro de flujo FACS Canto II (*Beckton Dickinson*). Para el análisis de los datos se utilizó el software FlowJo (*Tree Star Inc.*). Los resultados se expresan como intensidad media de fluorescencia (IMF) o porcentaje de células positivas según se indica en cada figura.

3.11.1 Evaluación de marcadores de membrana

Se utilizaron anticuerpos monoclonales conjugados con los fluorocromos FITC, PE, PerCP y APC contra los siguientes marcadores: CD3, CD44, CD62L, CD86, IAd (CMH II), DX5 (NK), CD8, CD4, CD11c, CD11b, Ly6G y la citocina IFN- γ .

Para las marcaciones, se incubaron 10^6 células con una cantidad previamente optimizada de anticuerpos por 15 min a 4°C en un volumen final de 20 μ l. En todos los casos también se marcaron células con los correspondientes controles de isotipo y de compensación. Al término de la incubación, las células fueron lavadas con solución fisiológica suplementada con SFB al 1%. Las células fueron resuspendidas en 150 μ l de *buffer FACS Flow* para su paso por el citómetro.

3.11.2 Evaluación de la producción de IFN- γ por tinción intracelular

La producción de IFN- γ fue evaluada por tinción intracelular en células permeabilizadas, tratadas previamente durante 4h con Brefeldina A (10 μ g/ml, *BD Biosciences*). Para la estimulación, las células fueron cultivadas en presencia de HSV-2 inactivado (1 x 10⁶ células/1 x 10⁵ UFP). Además, las células fueron cultivadas 18h en presencia de un *pool* de péptidos derivados de antígenos de HSV-2 específicos para la respuesta T CD4⁺ (NLPVLDQL (gpD) y KDVTVSQVWFGHRYSQ (gpB)) y para la respuesta T CD8⁺ (HGPSLYRTF (ICP27)yKMADPNRFRGK (gpD)) (Platt et al., 2013) a una concentración proteica final de 25 μ g cada uno cada 10⁶ células. Se utilizó Concanavalina A como control positivo, medio solo como control negativo y VacV inactivado por exposición a luz UV (1 x 10⁶ células/1 x 10⁵ UFP) como control inespecífico. Terminada la incubación, las células fueron marcadas con anticuerpos para marcadores de superficie, fijadas, permeabilizadas y marcadas con anticuerpos específicos para IFN- γ , según las indicaciones del fabricante. Finalmente se cuantificó la marca por citometría de flujo.

3.11.3 Ensayo de proliferación celular

Para evaluar la respuesta proliferativa inducida por HSV-2, las células aisladas de GDs fueron marcadas con 1mM de Éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) (*Molecular Probes*) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos fondo en U por 5 días en presencia de HSV-2 inactivado por exposición a luz UV (10⁵ ufp cada 10⁶ células) o medio solo. Luego las células fueron cosechadas, lavadas y

marcadas por 20 minutos a 4°C con anticuerpos monoclonales para CD3, CD4 y CD8 de ratón. La proliferación fue evaluada en estas poblaciones celulares por pérdida de la marca de CFSE por citometría de flujo.

3.12 Estadística

Los resultados están expresados como la media +/- el desvío estándar (DE). En las figuras que describen resultados de estado clínico, varianza de peso o títulos virales, se utiliza la media +/- el error estándar de la media (EEM) de los duplicados, y para el análisis de supervivencia se usó el test de Cox-Mantel y de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Para determinar si las diferencias encontradas entre distintos tratamientos son estadísticamente significativas, se utilizó la prueba t de *Student* de dos colas para comparaciones entre dos tratamientos, o ANOVA de uno o dos factores para realizar comparaciones de múltiples tratamientos, con la prueba de Bonferroni. En todos los casos, se consideró una diferencia significativa cuando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,005$ (***). Todo el análisis se realizó usando el software *Graph Pad Prism 6*.

4 CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 El contenido de la vesícula seminal no compromete la capacidad infecciosa del virus HSV-2.

Con el objeto de estudiar la capacidad del semen de modular la respuesta inmune anti-infecciosa, utilizamos en todos los ensayos el contenido de la vesícula seminal que representa el 60% del eyaculado murino. Dada la dificultad de obtener semen completo murino y la imposibilidad de aparear a los ratones e infectarlos simultáneamente, utilizamos este fluido que aunque carece de las secreciones de la próstata y del epidídimo, presenta los componentes inmunomodulatorios del semen completo. En trabajos anteriores, ha sido demostrado que apareamientos con machos cuyas vesículas seminales han sido removidas, fallan en inducir la inmunoregulación característica del semen. Por otro lado, apareamientos con machos vasectomizados, que carecen de las secreciones de la próstata y del epidídimo, no mostraron diferencias comparados con los ratones sin intervenir en términos de la inmunoregulación (Robertson et al., 2009a; Robertson et al., 1996; Sharkey et al., 2007). Se recolectaron muestras del contenido de vesículas seminales (VS) de 20 ratones macho de 11 semanas de edad de la cepa BALB/c, y se obtuvo un *pool* de los mismos. Se realizó una dilución al medio en PBS y se midió la concentración proteica para estandarizar la cantidad de proteínas usadas en cada ensayo.

Inicialmente se evaluó si VS era capaz de modular *in vitro* la infectividad del virus del herpes simplex de tipo II (HSV-2). Se realizaron infecciones de HSV-2

con distintas multiplicidades de infección (MOI) en células Vero en presencia o no (control) de diferentes concentraciones de VS (0.1, 0.5, 1 y 5mg/ml), y examinamos la producción viral a las 48hs pi por recuento de placas de lisis (Figura 9). No encontramos diferencias significativas al comparar los títulos virales obtenidos en los ensayos de infección realizados en ausencia o presencia de las diferentes diluciones de VS (Figura 9A), como tampoco en lo relativo a la viabilidad celular (Figura 9B). Concluimos entonces que VS no tiene actividad anti-viral *per se*.

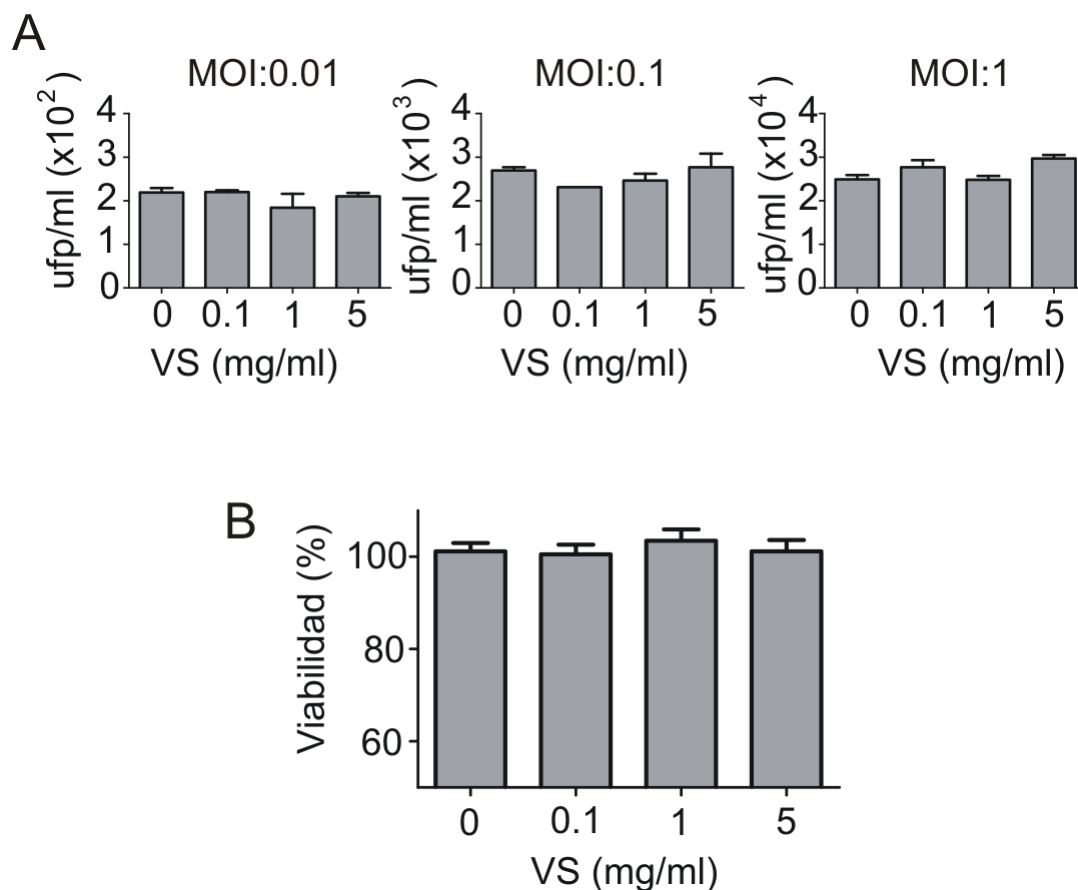


Figura 9 El contenido de vesículas seminales (VS) no modifica la infectividad de HSV-2. (A) Se infectaron células Vero con HSV-2 a distintas multiplicidades de infección (MOI: 0.01; 0.1 y 1), en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de VS. La replicación viral fue cuantificada por la técnica de unidades formadoras de placas (ufp) por triplicado después de 48 horas de cultivo. **B)** Células vero fueron incubadas con distintas cantidades de VS durante 2 horas. Luego se evaluó la viabilidad de las células usando cloruro de tetrazolio

(MTT) durante 2 horas y se reveló por absorbancia a 492nm. Los resultados están expresados como la media \pm DE. Los resultados que se muestran son representativos de tres experimentos independientes.

Una vez determinada la falta de actividad directa sobre el virus a utilizar en las infecciones, proseguimos a evaluar el efecto de VS *in vivo*.

4.2 El contenido de vesícula seminal no modula el curso de la infección primaria por HSV-2.

Para evaluar el impacto de VS durante la infección por HSV-2 adoptamos un modelo de infección intravaginal. Este se utiliza ampliamente en la literatura científica y resulta conveniente por los claros síntomas que genera la infección en los ratones hembra (Iijima et al., 2011; Shin y Iwasaki, 2012; Soerens et al., 2016; Svensson et al., 2012). En este modelo la replicación viral está inicialmente limitada a la mucosa vaginal, seguida por la diseminación por transporte axonal retrógrado al sistema nervioso central, resultando en la parálisis y la muerte de la hembra. Para ello infectamos hembras de la cepa BALB/c con 1×10^5 ufp de HSV-2 por vía intravaginal en un volumen final de 15 μ l. Trabajamos con un grupo experimental infectado con HSV-2 en PBS-BSA (5mg/ml) y otro infectado con HSV-2 en presencia de VS (5mg/ml). Las concentraciones de proteína usadas fueron elegidas tomando en cuenta la concentración proteica en un eyaculado normal (Anderson y Tarter, 1982; Anderson et al., 1983). Las hembras fueron examinadas diariamente durante 20 días para observar la inflamación genital, los daños neurológicos y el peso. Particularmente, se clasificaron los signos y síntomas de acuerdo a criterios establecidos en la literatura (Morrison et al., 1998): 0: sin signos aparentes; 1:

eritema y edema genital suave; 2: inflamación genital moderada; 3: lesiones genitales purulentas; 4: parálisis de las extremidades posteriores; y 5: estado moribundo, momento en el cual, por razones éticas, los animales fueron sacrificados. Se tomaron muestras de lavados vaginales para medir la carga viral de los animales los días 3, 4 y 5 post-infección. Dadas las características inmunosupresoras del semen, hipotetizamos que el VS podría agravar el curso de la infección. Sin embargo, al analizar los títulos virales obtenidos de lavados vaginales el día 3 pi (pico máximo de replicación viral en vagina) pudimos observar que las hembras infectadas en presencia de VS mostraban un título viral menor que las hembras control (Figura 10A), diferencia que se mantenía hasta el día 5 post infección (Figura 10B). Existen múltiples reportes en la literatura que muestran que el semen humano es capaz de modular la interacción de virus con sus células blanco (Kim et al., 2010; Muller et al., 2018; Munch et al., 2007). Por ello procedimos a evaluar si VS afecta la unión de HSV-2 a la mucosa vaginal. Con este interrogante infectamos ratones como mencionamos previamente y tres horas después se extrajo el tejido vaginal y se evaluó por qPCR la cantidad de genomas virales presentes en cada condición. En la figura 10C se muestra que la presencia de VS en el inóculo de infección no modifica la interacción de HSV-2 con la mucosa vaginal.

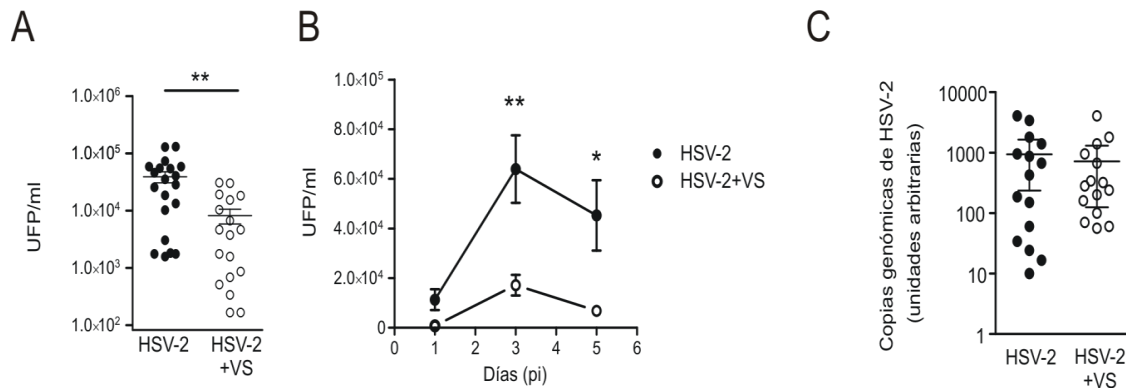


Figura 10 El contenido de vesícula seminal (VS) disminuye la producción viral en ratones hembras infectadas por vía intravaginal con HSV-2. Dos grupos de ratones (n=10) fueron infectados con HSV-2 (10^5 ufp/ratón) en presencia de VS (HSV-2+VS) o PBS-BSA 5% (HSV-2). Se realizaron dos lavados vaginales con 35 μ l de PBS estéril, con los ratones bajo anestesia. El título viral fue cuantificado por recuento de ufp, para cada ratón por duplicado. A) Título viral en los lavados vaginales a día 3 pi. B) Curva de virus obtenida en lavados vaginales a días 1, 3 y 5. C) Las hembras fueron infectadas y 3 horas después sacrificadas. Se extrajeron las vaginas, se lavaron con PBS de manera exhaustiva y se recuperó el ADN total del tejido para cuantificar los genomas virales por qPCR. Los resultados se expresan como la media \pm EEM, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**). Se muestran los resultados individuales por ratón de 2 experimentos independientes.

Seguidamente, estudiamos el curso de la infección primaria en HSV-2 evaluando la sintomatología (Figura 11A), la pérdida de peso asociada a la enfermedad (Figura 11B) y la supervivencia (Figura 11C). A pesar de las diferencias observadas en los títulos virales, tanto la sintomatología, el peso y la supervivencia no se vieron afectadas por la presencia de VS durante la infección. Como reportan trabajos previos, la modulación de la respuesta adaptativa anti-herpética es muy difícil de observar al usarse un virus no atenuado en una primo infección, ya que este ingresa al sistema nervioso antes que la respuesta inmune adaptativa pueda actuar, y una vez allí produce la muerte del ratón irremediablemente (Soerens et al., 2016). Teniendo en cuenta las limitaciones que tiene el modelo usado para evaluar la respuesta inmune adaptativa anti-

HSV-2, decidimos utilizar un modelo de vacunación y posterior desafío para evaluar la respuesta inmune adaptativa y de memoria.

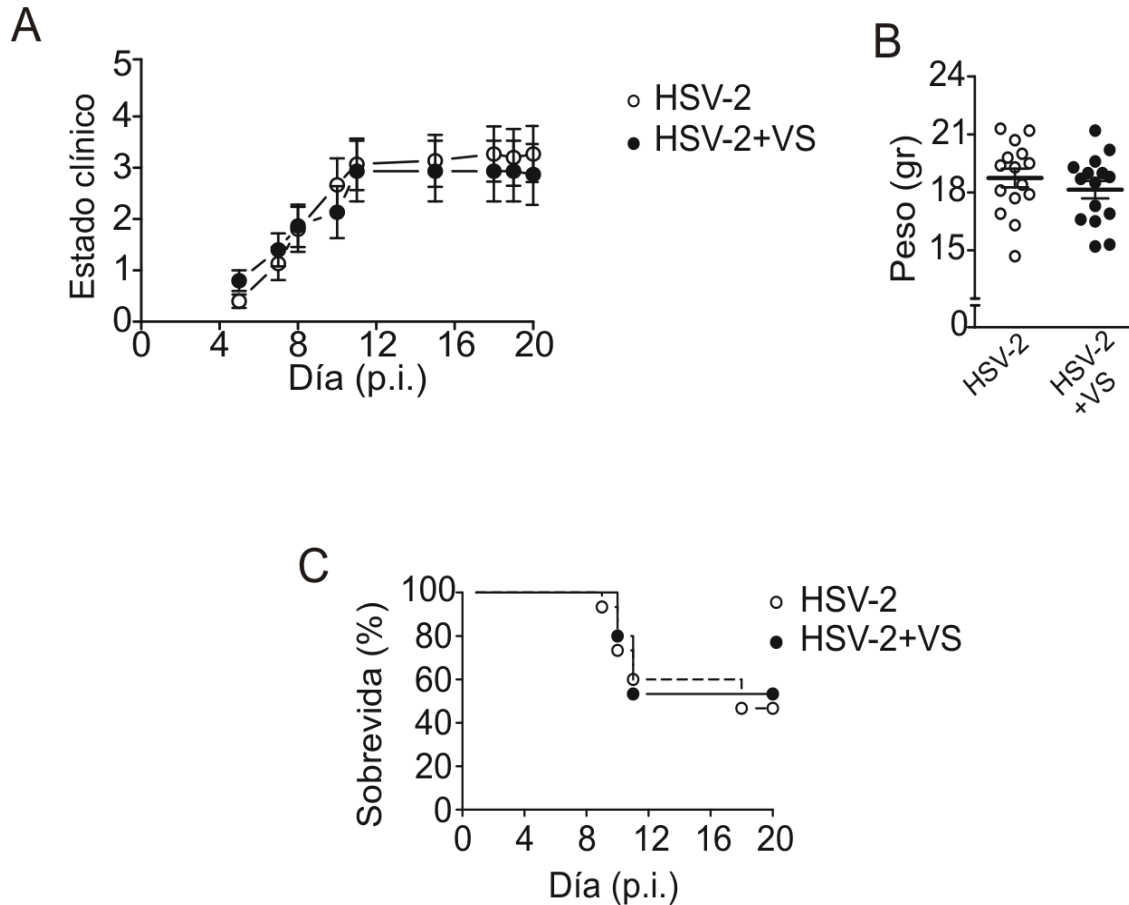


Figura 11 El contenido de vesículas seminales (VS) no modifica la infección intravaginal por HSV-2. Dos grupos de ratones (n=15) fueron infectados intravaginalmente con HSV-2 (10^5 ufp/ratón) en presencia de VS (HSV-2+VS) o PBS-BSA 5% (HSV-2), a una concentración final de VS de 5 mg/ml. Los ratones fueron examinados de manera diaria por su estado clínico (0, asintomáticos; 1, eritema genital suave; 2, inflamación genital moderada; 3, lesiones genitales purulentas; 4, parálisis de los miembros traseros; y 5, estado pre-moribundo) (A), peso (a día 7 post-infección) (B), y sobrevida (C). Los resultados están expresados como la media \pm EEM del estado clínico, el peso, o la sobrevida de 15 ratones por grupo. Los datos son representativos de tres ensayos independientes

4.3 El contenido de vesícula seminal mejora la eficacia de la vacunación intravaginal con HSV-2 inactivado.

Decidimos entonces analizar si VS era capaz de comprometer la inducción de la respuesta de memoria inducida por una vacunación intravaginal con HSV-2 inactivado. Para ello utilizamos un protocolo de inmunización intravaginal con HSV-2 inactivado y posterior desafío intravaginal con una dosis letal de HSV-2. Para determinar la dosis viral que permitiera establecer la magnitud de protección conferida por la inmunización, vacunamos intravaginalmente ratones con 10^2 , 10^4 o 10^6 ufp de HSV-2 inactivado en un volumen final de 15 μ l. Luego todos los ratones fueron desafiados con 2×10^6 ufp de HSV-2 por vía intravaginal en 15 μ l (Figura 12A) y evaluamos la sintomatología y sobrevida de los ratones diariamente (Figuras 12B y C). Como se observa en la figura 12, la dosis más alta de HSV-2 inactivado (10^6 ufp) es suficiente para conferir una protección casi absoluta al desafío letal, ya que solo 1/6 ratones llegó al estado moribundo y el resto solo mostró sintomatología leve o nula. Contrariamente, la dosis más baja empleada (10^2 ufp) resultó en 5/6 ratones en estado moribundo luego del desafío letal. Para evaluar la modulación de la respuesta inmune de memoria por VS decidimos usar una dosis de inmunización de 10^4 ufp de HSV-2 inactivado, ya que a esta dosis se genera una protección parcial al desafío letal que permite analizar variaciones en la respuesta inmune de memoria por exceso o defecto.

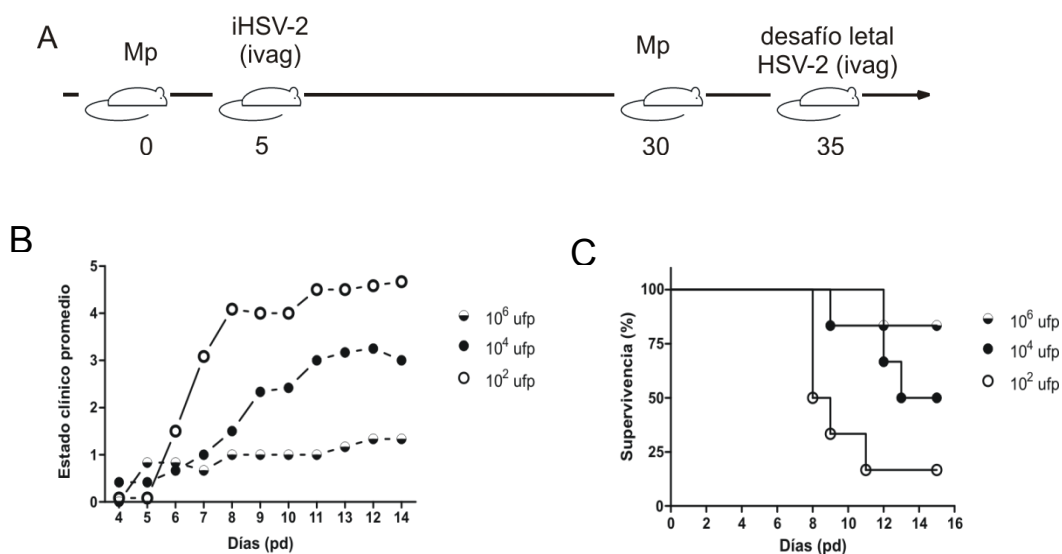


Figura 12 Determinación de la dosis de HSV-2 inactivado para inmunizar ratones por vía intravaginal. Grupos de 6 ratones tratados previamente con mp. fueron inoculados intravaginalmente con tres dosis distintas de HSV-2 inactivado en PBS-BSA 5% (10^2 ufp, 10^4 ufp y 10^6 ufp en $15 \mu\text{l}$). Treinta días después, los ratones fueron tratados nuevamente con Mp. y cinco días después fueron desafiados con una dosis letal de HSV-2 intravaginal (2×10^6 ufp/ $15 \mu\text{l}$) (A). Los ratones fueron evaluados en su estado clínico (B) y sobrevivencia (C). Los resultados están expresados como la media del estado clínico o como la sobrevivencia. Se muestran los datos de un ensayo preliminar.

Cuatro grupos de 10 hembras, previamente sincronizadas con medroxiprogesterona fueron inoculados intravaginalmente con HSV-2 inactivado solo (In.) o en presencia de VS (In.+VS), a una concentración de proteínas final de 5 mg/ml. Además, incluimos en el estudio un grupo de ratones inoculado con VS sin HSV-2 inactivado y un grupo sin tratamiento que se inoculó únicamente con PBS-BSA 5%. Treinta días después todos los grupos fueron tratados nuevamente con medroxiprogesterona y luego de 5 días desafiados con una dosis letal de HSV-2 (2×10^6 ufp/ $15 \mu\text{l}$) por vía intravaginal (Figura 13A). Las hembras fueron examinadas diariamente y se evaluó la

sintomatología asociada a la infección (Figura 13B), se registró su peso (Figura 13C), y se tomó nota de la sobrevivencia de cada grupo (Figura 13D). Encontramos que la inmunización en presencia de VS mejoró marcadamente la protección frente al desafío letal. De hecho, el 70% de los ratones vacunados sin VS sucumbieron a la infección mientras que solo el 20% de los ratones que fueron vacunados con VS murieron. Además, la sintomatología presentada por estos y la pérdida de peso fueron significativamente menores comparado con el grupo de ratones vacunados sin VS. Como era de esperar, los grupos controles sin vacunar, con o sin VS, no pudieron controlar la infección y murieron de manera similar al grupo vacunado sin VS (Figura 13). Por esta razón y respetando las normas de cuidado animal, el resto de los experimentos fueron realizados excluyendo estos dos últimos grupos control. Paradójicamente, y en contra de nuestras presunciones, estos resultados demuestran que VS, lejos de actuar como inmunosupresor de la respuesta anti-HSV-2, ejerce el efecto opuesto, induciendo protección frente a un desafío letal. Seguidamente nos enfocamos en los mecanismos inmunes que protegen a los ratones previamente inmunizados con VS.

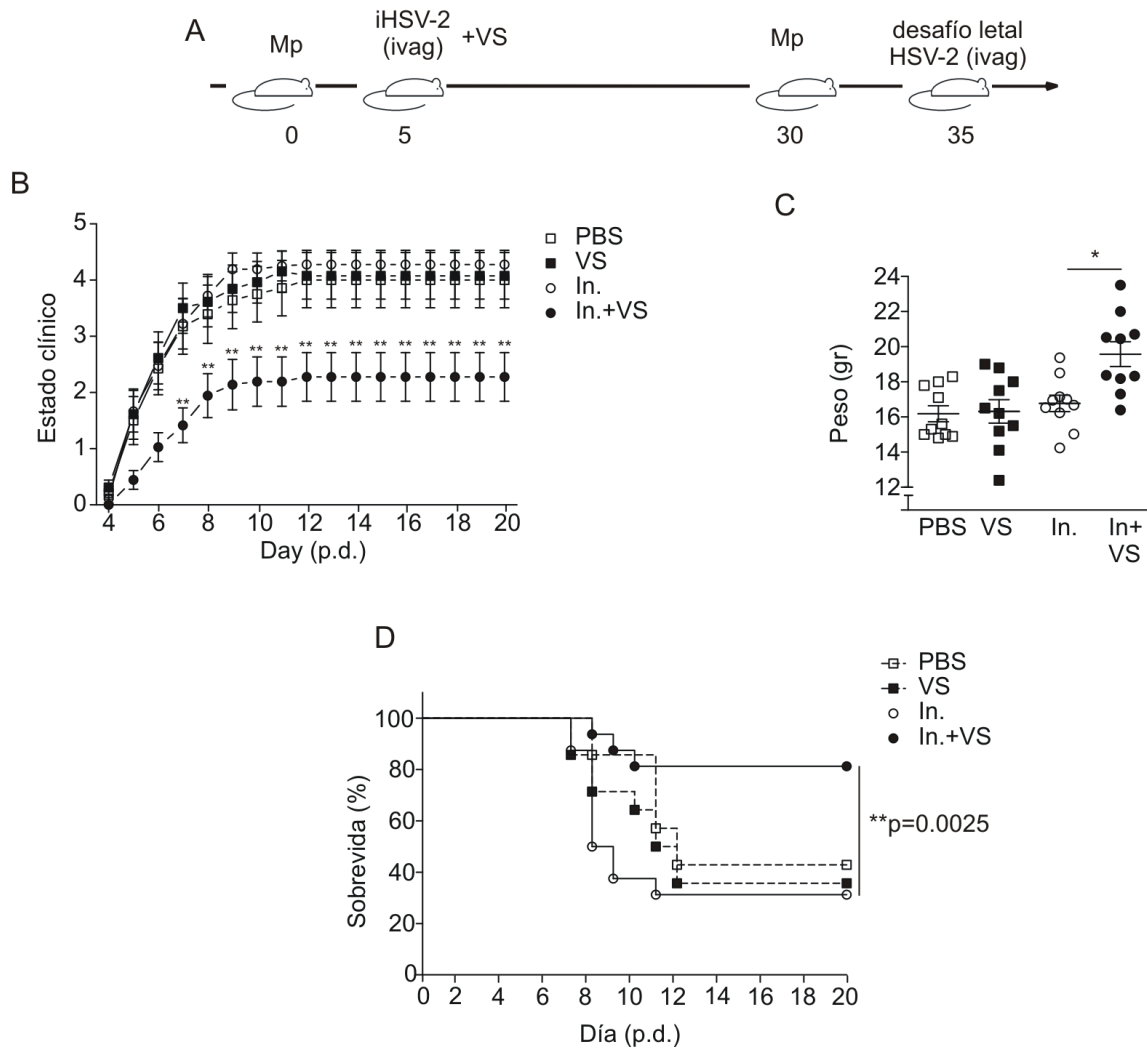


Figura 13 El fluido contenido en las vesículas seminales mejora la eficacia de la vacunación por HSV-2 intravaginal. Grupos de 10 ratones tratados previamente con Mp. fueron inoculados intravaginalmente con: PBS-BSA (5mg/ml) (PBS), VS (5mg/ml), y HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l) sin (In.) y con VS (In. + VS), a una concentración de proteínas final de 5 mg/ml. Treinta días después, los ratones fueron tratados nuevamente con Mp. y cinco días después fueron desafiados con una dosis letal de HSV-2 intravaginal (2×10^6 ufp/15 μ l) (A). Los ratones fueron evaluados en su estado clínico (B), peso a día 7 post-desafío (p.d.) (C), y sobrevivida (D). Los resultados están expresados como la media \pm EEM del estado clínico (B), peso (C), o como la sobrevivida (D) de 10 ratones por grupo. Se muestran los datos de 1 de 3 experimentos independientes (* $p < 0,05$, y ** $p < 0,01$).

4.4 La inmunización en presencia del contenido de vesícula seminal mejora la respuesta de memoria T en los ganglios drenantes (GDs)

Durante el curso de la infección por HSV-2 la respuesta humoral, mediada por linfocitos B secretores de IgG y especialmente de IgA en las mucosas, puede conferir protección como muestran ensayos de vacunación en humanos (Petro et al., 2015). Por otro lado la respuesta de memoria celular, mediada por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, a través de la producción de IFN- γ , ha demostrado ser de crucial importancia en estos modelos de infección murina, al igual que en humanos (Iijima y Iwasaki, 2014; Iijima et al., 2011; Schiffer y Corey, 2013; Svensson et al., 2005; Svensson et al., 2012). La respuesta de memoria celular, ha cobrado mucha relevancia ya que en los últimos años se han descubierto nuevas sub-poblaciones de células capaces de ingresar y permanecer en las mucosas y así mediar una protección inmediata ante una re-infección (Beura et al., 2018; Mueller y Mackay, 2016; Schenkel et al., 2014).

Para evaluar ambos compartimentos de la respuesta inmune, en primera instancia, cuantificamos los títulos de anticuerpos en los ratones inmunizados o no en presencia de VS. Realizamos el mismo protocolo de inmunización mencionado anteriormente y evaluamos el título de IgG e IgA específica luego del desafío (día 3 pd) en el fluido vaginal (Figura 14A). También cuantificamos la IgG específica en plasma los días 3 y 7 post desafío (Figura 14B) y previo al desafío (Figura 14C) por ELISA. No observamos diferencias significativas en los títulos de anticuerpos específicos en los ratones inmunizados en presencia de VS, a pesar de la respuesta protectora. Nuestros resultados indican que los anticuerpos no cumplirían un rol fundamental en el efecto protector inducido por

la inmunización en presencia de VS.

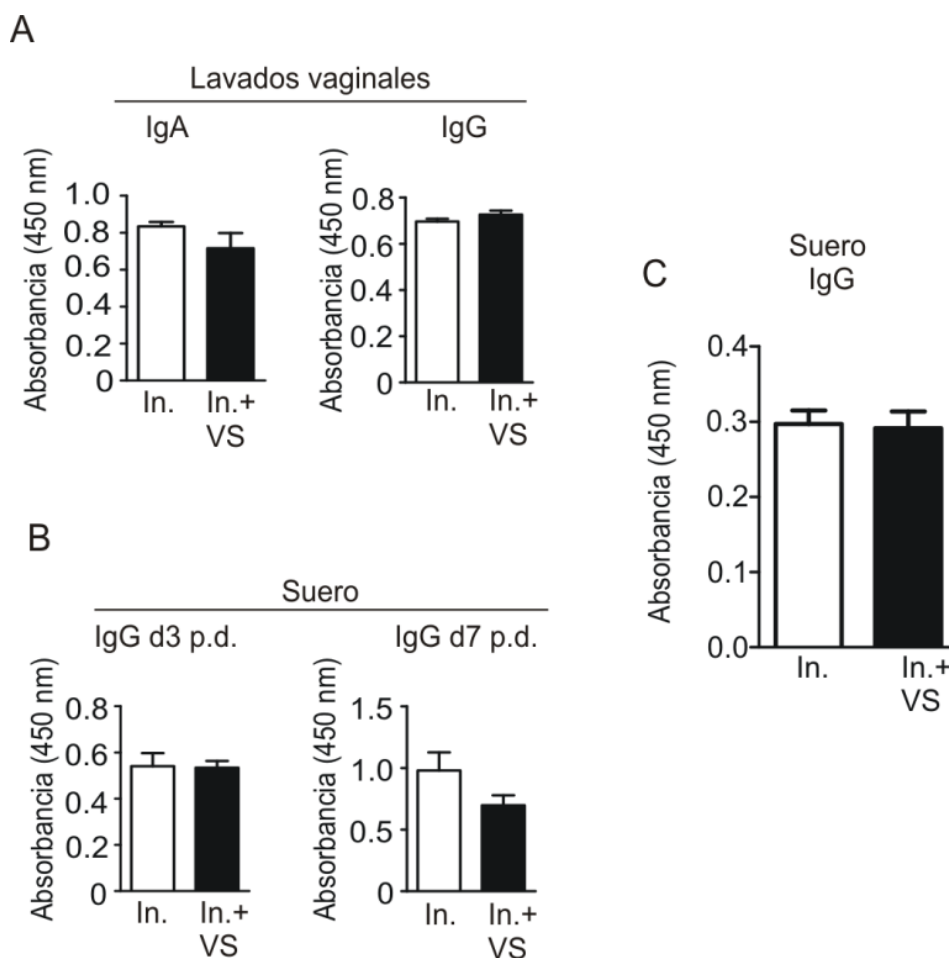


Figura 14 La vacunación en presencia del contenido de vesícula seminal (VS) no modifica los títulos de anticuerpos. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Treinta días después los ratones fueron tratados nuevamente con mp. y cinco días después fueron desafiados intravaginalmente con HSV-2 (2×10^6 ufp/15 μ l). (A) Tres días post desafío se obtuvieron lavados vaginales y se determinaron los anticuerpos IgG e IgA específicos para HSV-2 por ELISA (usando una dilución 1:5) (B) Se obtuvieron muestras de suero a partir de sangre extraída por punción cardíaca los días 3 o 7 post desafío. En estos sueros se midió la presencia de anticuerpos IgG específicos contra HSV-2 por ELISA (usando una dilución 1:10). (C) Se cuantificaron los títulos de IgG sérica previos al desafío. Para ello se inmunizaron ratones como se describió anteriormente y 30 días después fueron sacrificados sin recibir un desafío letal. La sangre se obtuvo por punción cardíaca. Los resultados están expresados como el media \pm EEM de 10 ratones por grupo

Para estudiar el efecto adyuvante ejercido por el VS en la vacunación intravaginal contra HSV-2, analizamos la respuesta T de memoria en los ganglios drenantes (GD) de la mucosa genital. Los ganglios ilíacos del ratón drenan la mucosa genital a través de la linfa y así los linfocitos T de memoria circulantes se reencuentran con los epítopes antigénicos para los cuales son específicos y montan una robusta respuesta que conlleva a la proliferación clonal y a la adopción de un fenotipo efector, productor de IFN- γ en el caso de la infección herpética (Schiffer y Corey, 2013). Realizamos el mismo protocolo de inmunización descrito anteriormente: grupos de 10 hembras, previamente sincronizadas con medroxiprogesterona fueron inoculadas intravaginalmente con HSV-2 inactivado solo (In.) o en presencia de VS (In.+VS), a una concentración de proteínas final de 5 mg/ml. Treinta días después todos los grupos fueron tratados nuevamente con medroxiprogesterona y luego de 5 días desafiados con una dosis letal de HSV-2 (2×10^6 ufp/15 μ l) por vía intravaginal. Tres días después del desafío, fueron sacrificados y se les extrajeron los ganglios ilíacos. Hembras sin vacunar pero tratadas con medroxiprogesterona fueron usadas para evaluar la respuesta basal en ausencia de infección (C). Encontramos que los GDs de los ratones inmunizados en presencia de VS mostraban mayor número de células totales y, aunque las proporciones de LT CD4⁺ y CD8⁺ eran similares en los dos grupos, en este grupo el número absoluto en ambas poblaciones era mayor (Figura 15A y 15B). Para evaluar de donde procedía esta diferencia, evaluamos la respuesta proliferativa de las células T CD4⁺ y CD8⁺ *ex vivo*. Para ello generamos suspensiones celulares de GDs y estimulamos las células con HSV-2 inactivado durante 18hs. Evaluamos la respuesta proliferativa midiendo la pérdida de CFSE en las células

CD3⁺CD4⁺ o CD3⁺CD8⁺ por citometría de flujo (Figura 15C). Consistentemente con el aumento en los números observados y el mantenimiento de la proporción CD4/CD8 entre los grupos de ratones, observamos que tanto las células T CD8⁺ como las CD4⁺ provenientes de ratones inmunizados en presencia de VS mostraban una mayor respuesta proliferativa al estar expuestos a antígenos de HSV-2.

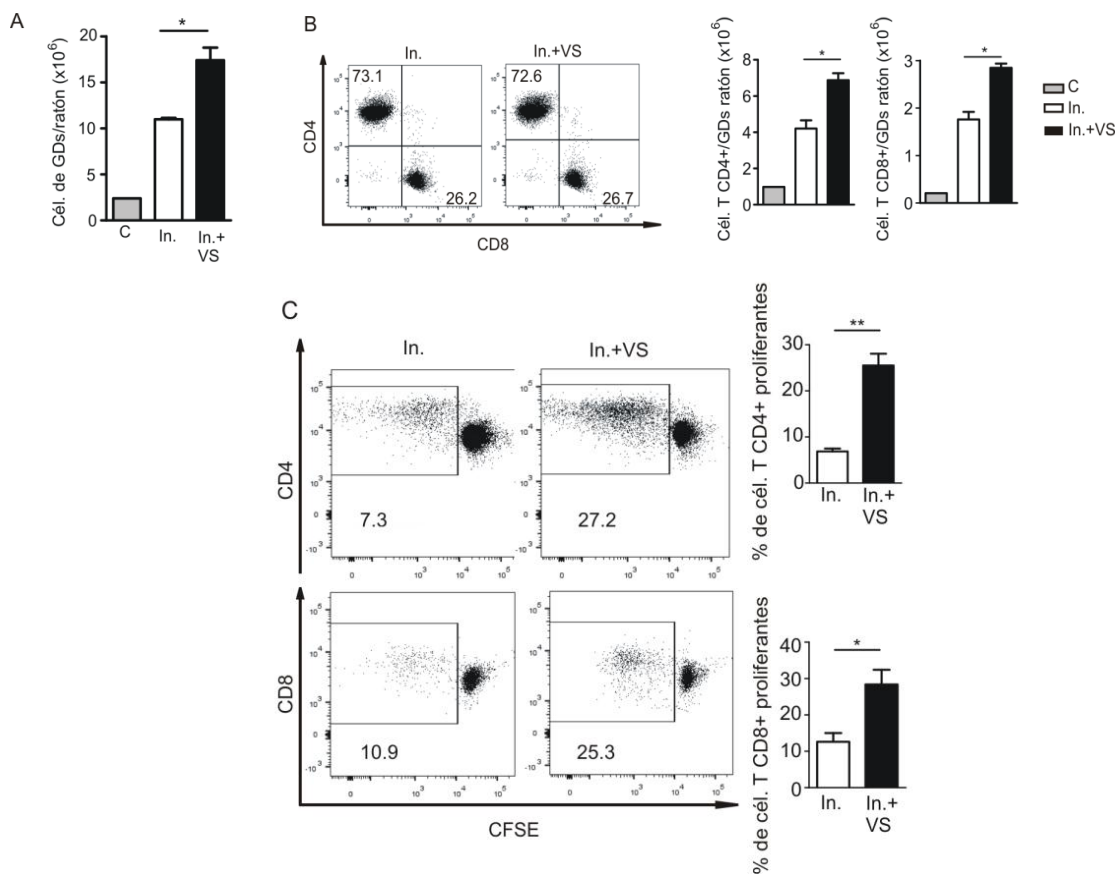


Figura 15 El fluido contenido por las vesículas seminales aumenta la magnitud de la respuesta de memoria celular en los GDs ante un desafío letal. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Treinta días después los ratones fueron tratados nuevamente con mp. y cinco días después fueron desafiados intravaginalmente con HSV-2 (2×10^6 ufp/15 μ l). Tres días después del desafío los ratones fueron sacrificados, los GDs fueron extraídos, procesados por grupo y las células fueron recuperadas. Ratones tratados con mp pero sin vacunar ni

desafiar fueron usados como control (C). (A) Número total de células cosechadas por GD por ratón. Los resultados se presentan como la media \pm DE de uno de tres experimentos independientes. (B) Frecuencia de células T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺. Se presentan los citogramas representativos y la cuantificación del número total de células T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ por ratón. Los resultados están expresados como la media \pm DE de tres experimentos distintos. (C) Las células recuperadas de GDs fueron marcadas con CFSE y estimuladas con HSV-2 inactivado por luz UV (iHSV-2) (1×10^5 ufp/ 1×10^6 células) por 5 días. La proliferación celular se midió por pérdida de CSFE en las células CD4⁺ y CD8⁺. Los resultados están expresados como el media \pm DE de tres experimentos distintos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

Seguidamente, indagamos la respuesta productora de IFN- γ , ya que este mecanismo es crucial para el control de la infección herpética (Svensson et al., 2005; Svensson et al., 2012), y podría explicar la protección mediada por la inmunización en presencia de VS. Realizamos suspensiones celulares de GDs 3 días después del desafío con HSV-2. Estas fueron estimuladas *ex vivo* con HSV-2 inactivado por 48hs y se evaluó la producción de IFN- γ por los LT CD4⁺ y CD8⁺ (Figura 16A). De la misma manera que la respuesta proliferativa, la producción de IFN- γ se encontraba potenciada en las células provenientes de ratones inmunizados en presencia de VS, tanto en los LT CD4⁺ como en los LT CD8⁺.

Teniendo en cuenta que el HSV-2 completo inactivado no solo es una fuente de antígenos sino que también incluyen PAMPs, como control estimulamos a las células con otro virus completo inactivado, virus vaccinia (iVacV). Además, con el objeto de confirmar que el VS mejoró la respuesta de memoria mediada por células T específicas contra antígenos de HSV-2, estimulamos a las células provenientes de los GDs con un conjunto de péptidos antigénicos de HSV-2 capaces de ser reconocidos por células T CD4⁺ o T CD8⁺. Nuestros resultados

muestran de manera contundente que la respuesta observada es Ag-específica, dado que observamos un mayor número de células T CD4⁺ y T CD8⁺ productoras de IFN- γ en los animales vacunados en presencia de VS luego de la estimulación *ex vivo* con los péptidos antigénicos o con HSV-2 inactivado, pero no con iVacV. (Figura 16 A-B).

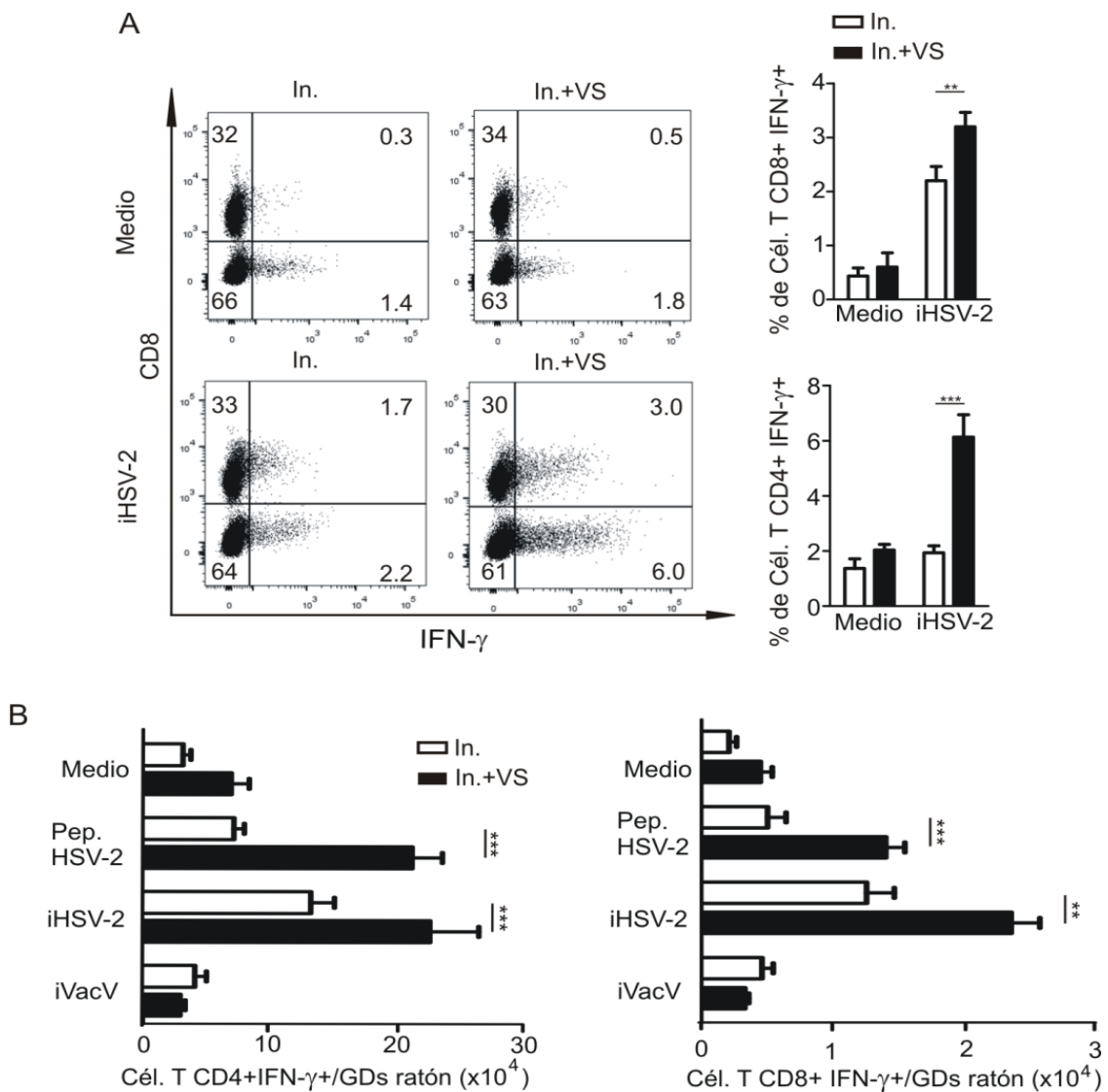


Figura 16 El fluido contenido por las vesículas seminales potencia la funcionalidad de la respuesta de memoria específica en los GDs ante un desafío letal. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una

concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Treinta días después los ratones fueron tratados nuevamente con mp. y cinco días después fueron desafiados intravaginalmente con HSV-2 (2×10^6 ufp/15 μ l). Tres días después del desafío los ratones fueron sacrificados y los GDs fueron extraídos, procesados por grupo y las células fueron recuperadas. (A) Las células de GDs fueron estimuladas por 18hs con iHSV-2 (10^5 ufp/ 10^6 células) y las células CD3⁺ productoras de IFN- γ fueron cuantificadas por citometría de flujo. Se muestran los citogramas representativos para las células estimuladas y sin estimular (medio). Los gráficos de barra cuantifican las células T productoras de IFN- γ por ratón, en tres experimentos independientes. (B) Las células fueron estimuladas como en A con: iHSV-2, un *pool* de péptidos específicos de HSV-2 para células T CD4⁺ y CD8⁺, virus Vaccinia inactivado por luz UV (iVacV) o medio sin estímulos. Las células T productoras de IFN- γ fueron cuantificadas por citometría y se graficaron las medias de cada grupo por ratón de dos experimentos diferentes. Los resultados están expresados como el media \pm DE de tres experimentos distintos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

Como mencionamos anteriormente, el semen es capaz de inducir células T regulatorias (CD4⁺,FOXP3⁺,CD25⁺; Treg) para favorecer la tolerancia a los aloantígenos paternos y propiciar la implantación (Robertson et al., 2018). Además, recientemente se ha demostrado que las Treg son necesarias para la respuesta inmune anti-herpética, ya que pueden coordinar la respuesta T de memoria efectora a través de la liberación de quimiocinas (Lund et al., 2008; Soerens et al., 2016). Para definir si la protección frente al virus que observamos en los ratones inmunizados en presencia de VS era producto de la acción de las células Treg decidimos evaluar su frecuencia y la producción de IL-10 y TGF- β en los GDs 3 días después del desafío (Figura 17). En contraposición a la producción aumentada de IFN- γ , encontramos que la producción de IL-10 y TGF- β , al igual que la frecuencia de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Tregs), evaluadas luego de la estimulación *ex vivo* con HSV-2 inactivado, no mostraron diferencias entre los animales vacunados en presencia o ausencia de VS (Figura 17 A, B, C).

Como conclusión podemos decir que la presencia de VS en la inmunización mejora la respuesta T efectora en los GDs de la mucosa vaginal, a través del aumento de la producción de IFN- γ y la proliferación de los LT CD4⁺ y CD8⁺ específicos.

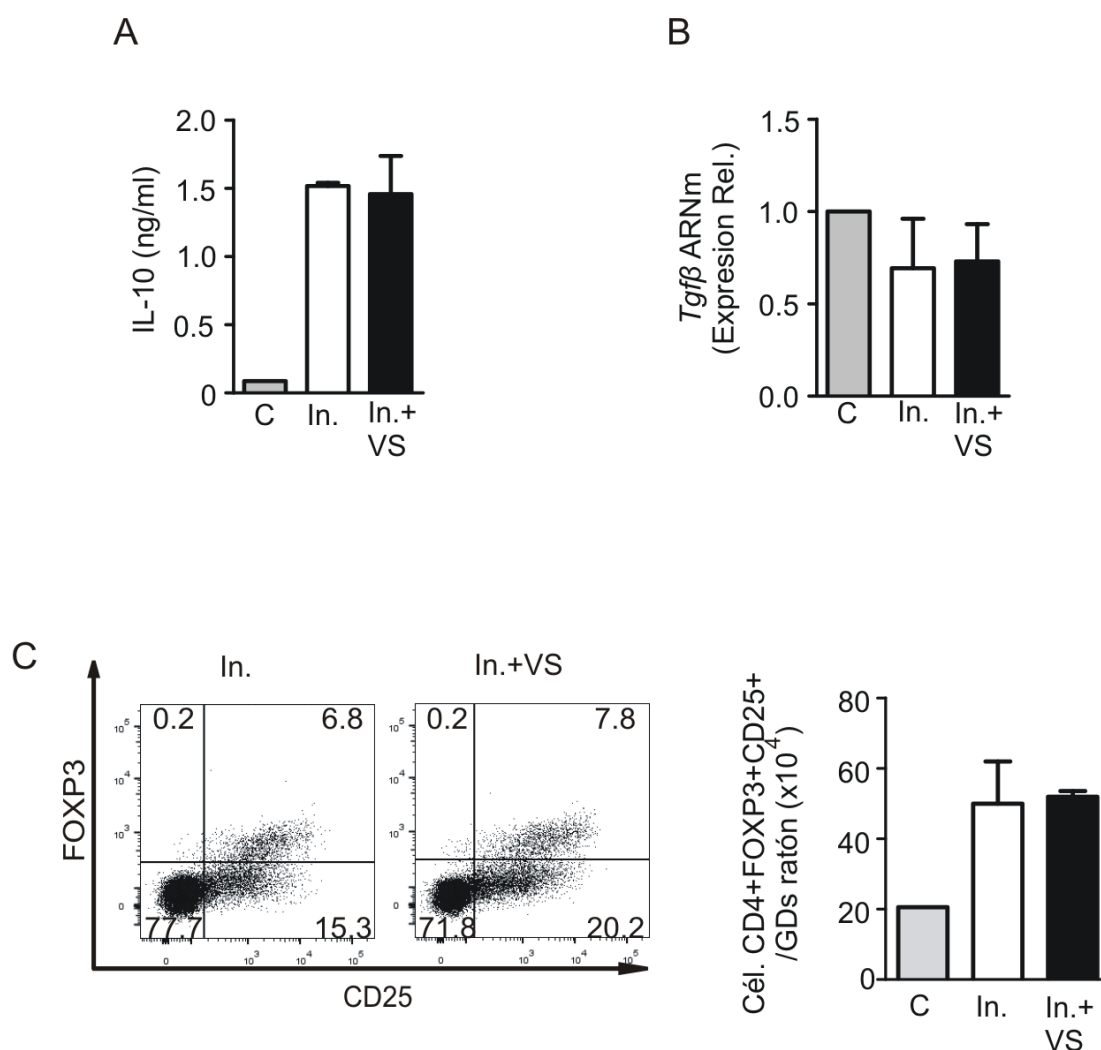


Figura 17 La vacunación en presencia del fluido contenido en las vesículas seminales no induce una respuesta inmune regulatoria ante un desafío letal. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l), en ausencia (In) o presencia de VS (In + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Treinta días después los ratones fueron tratados nuevamente con mp. y cinco días después fueron desafiados intravaginalmente con HSV-2 (2×10^6 ufp/15 μ l). Tres días después del desafío los ratones fueron sacrificados y los GDs fueron

extraídos, procesados por grupo y las células fueron recuperadas. Ratones tratados con mp pero sin vacunar ni desafiar fueron usados como control (C). (A) En células derivadas de ganglios drenantes (GDs) cultivadas por 3 días con iHSV-2 (1×10^6 células/ 1×10^5 ufp) evaluamos: (A) la producción de IL-10 por ELISA (media \pm DE, n=3), (B) la producción de TGF- β por qPCR (media \pm DE, n=3), (C) la frecuencia y número de las células FOXP3⁺CD25⁺CD4⁺ evaluadas por citometría en cultivos estimulados 18 hs con PMA (20 ng/ml) e Ionomycina (1 μ g/ml). Los resultados están expresados como el media \pm DE de tres experimentos distintos (*p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,005).

4.5 La inmunización en presencia del contenido de vesícula seminal potencia la respuesta T de memoria en el sitio de infección.

Una vez caracterizada la respuesta protectora de los ratones inmunizados en presencia de VS en los sitios inductivos asociados a la mucosa, evaluamos el estado de la respuesta inmune en la mucosa/sitio de infección. Con tal fin, aislamos células de las mucosas vaginales de ratones que fueron inmunizados o no en presencia de VS y luego desafiados con una dosis letal de HSV-2. En la figura 18A demostramos que los ratones inmunizados en presencia de VS muestran un mayor infiltrado de células T CD8⁺ en la mucosa vaginal 3 días después del desafío. Este aumento podría explicarse por un aumento en el reclutamiento de LT CD8⁺ al tejido de la mucosa. Esto es consistente con la naturaleza de las células T residentes de memoria, que tienen una proliferación modesta, pero que pueden originarse a partir del reclutamiento de células T de memoria circulantes (Beura et al., 2018; Pizzolla y Wakim, 2019; Schenkel et al., 2014)

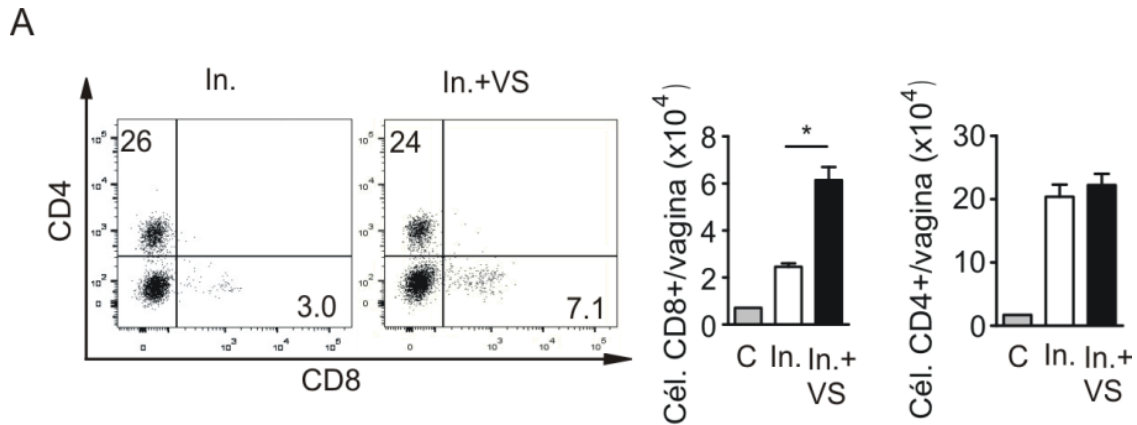


Figura 18 La inmunización en presencia del contenido de vesícula seminal (VS) promueve el aumento de células T CD8⁺ en la mucosa vaginal. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Treinta días después los ratones fueron tratados nuevamente con mp. y cinco días después fueron desafiados intravaginalmente con HSV-2 (2×10^6 ufp/15 μ l). Tres días después del desafío los ratones fueron sacrificados y sus vaginas fueron extraídas, procesadas por grupo y las células fueron recuperadas. Ratones tratados con mp pero sin vacunar ni desafiar fueron usados como control (C). (A) Frecuencia de células CD4⁺ y CD8⁺ en la mucosa vaginal analizadas por citometría de flujo a día 3 post desafío. Se presentan gráficos representativos y la cuantificación a partir de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$).

Al analizar la funcionalidad, tanto las células T CD4⁺ como las T CD8⁺ de los ratones inmunizados en presencia de VS mostraron una producción aumentada de IFN- γ después de ser estimuladas *ex vivo* con HSV-2 inactivado (Figura 19A). Al ampliar el análisis del ambiente inmune de la mucosa vaginal encontramos que el aumento en la proporción de células T CD8⁺ en los ratones inmunizados en presencia de VS estaba acompañado por un aumento en la concentración de IFN- γ e IL-6 en los lavados vaginales tres días después del desafío letal (Figura 19B). Incluso cuando aislamos células de la mucosa de estos ratones 7 días después del desafío mostraron una mayor capacidad de producción de IFN- γ , IL-6, IL-17A y TNF- α , pero, llamativamente, una

disminución en IL-10 (Figura 19C). Esto demuestra que los ratones inmunizados en presencia de VS tienen un ambiente proinflamatorio asociado a la inducción de las respuestas Th1 (IFN- γ y TNF- α) y Th17 (IL-17A), sugiriendo también, la activación de macrófagos en un perfil inflamatorio (alta IL-6 y baja IL-10) en la mucosa vaginal luego del desafío.

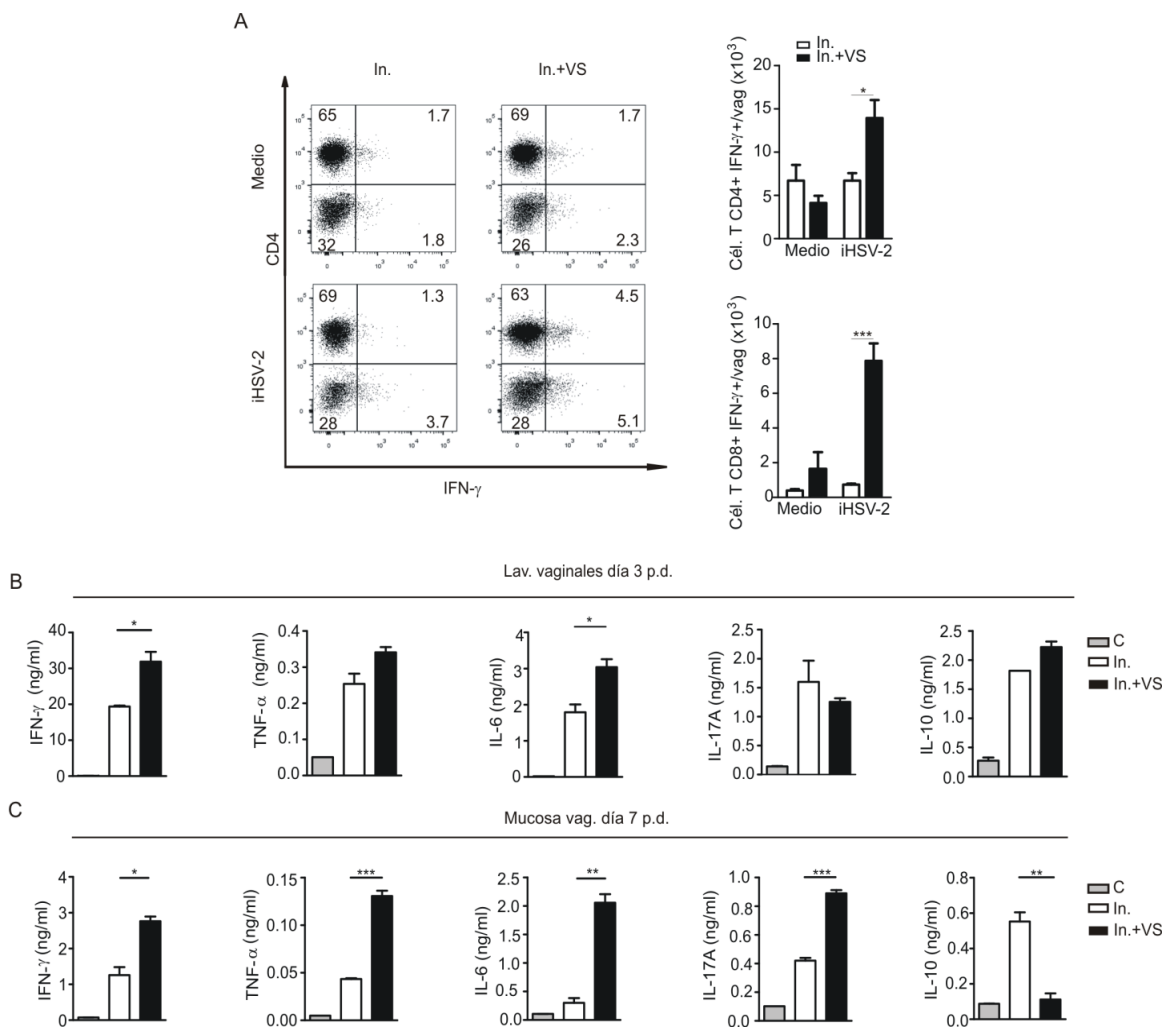


Figura 19 El contenido de vesícula seminal incrementa la respuesta de memoria T en la mucosa vaginal ante un desafío letal. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Treinta días después los ratones fueron tratados nuevamente con mp. y cinco días después fueron desafiados intravaginalmente con HSV-2 (2×10^6 ufp/15 μ l). Tres días después del desafío los

ratones fueron sacrificados y sus vaginas fueron extraídas, procesadas por grupo y las células fueron recuperadas. Ratones tratados con mp pero sin vacunar ni desafiar fueron usados como control (C). **(A)** Análisis de la producción de IFN- γ por células T en la mucosa vaginal evaluada por citometría de flujo. Las células fueron re estimuladas *ex vivo* por 18hs con iHSV-2 (1×10^6 células/ 1×10^5 ufp) o cultivadas con medio solo. **(B)** La concentración de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17A, e IL-10 fue evaluada por ELISA en lavados vaginales obtenidos a día 3 post desafío. **(C)** Evaluamos la producción de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17A, e IL-10 en suspensiones celulares obtenidas de mucosa vaginal re estimuladas *ex vivo* con iHSV-2. Los resultados están expresados como el media \pm DE de tres experimentos distintos. (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

En cuanto a las células Treg que podrían encontrarse infiltrando la mucosa, no encontramos diferencias ni en su número (Figura 20A), ni en la producción de TGF- β (Figura 20B). Esta observación refuerza aún más la idea de que las células Treg no participarían de la inmunidad protectora producto de la inmunización en presencia de VS.

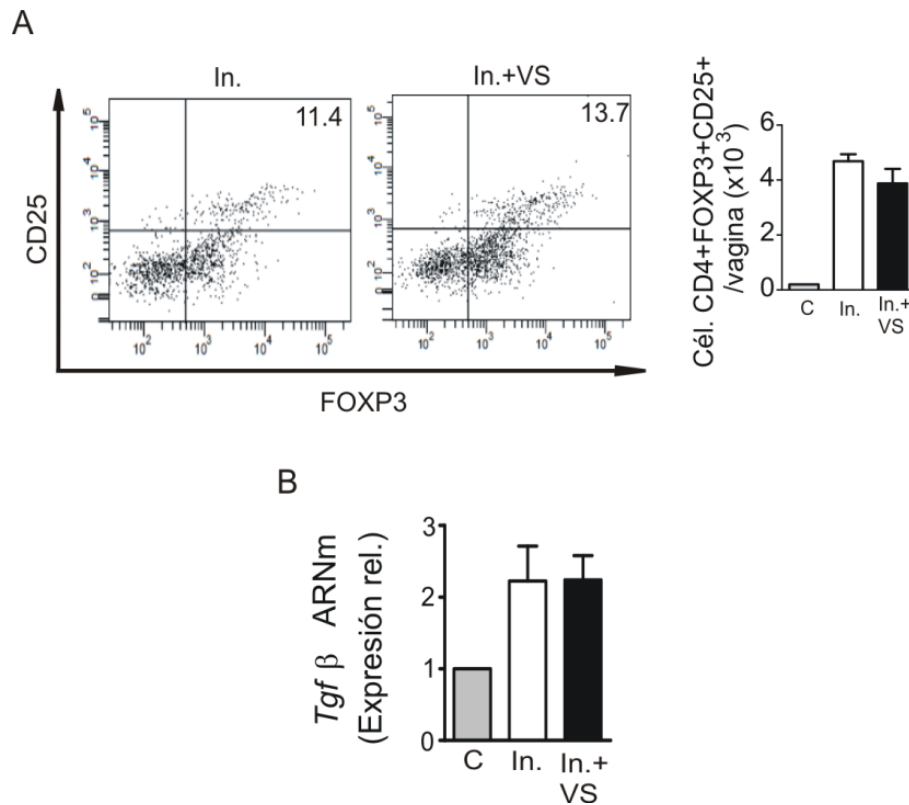


Figura 20 La vacunación en presencia del contenido de vesícula seminal no incrementa la inducción de células T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ ni la producción de TGF-β en la mucosa vaginal ante un desafío letal. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1 x 10⁴ ufp/15 μl), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Treinta días después los ratones fueron tratados nuevamente con mp. y cinco días después fueron desafiados intravaginalmente con HSV-2 (2 x 10⁶ ufp/15 μl). Tres días después del desafío los ratones fueron sacrificados y sus vaginas fueron extraídas, procesadas por grupo y las células fueron recuperadas. Ratones tratados con mp pero sin vacunar ni desafiar fueron usados como control (C). (A) Se estimularon las células obtenidas a partir de la mucosa vaginal con PMA (20 ng/ml) y Ionomycina (1μg/ml) por 18hs para medir la frecuencia de células T FOXP3⁺CD25⁺CD4⁺ por citometría de flujo. (B) Las suspensiones celulares obtenidas a partir de la mucosa vaginal fueron estimuladas con iHSV-2 por 72hs y se evaluó la expresión de TGF-β por qPCR. Los resultados están expresados como el media ± DE de tres experimentos distintos.

Finalmente, dado que las quimiocinas pro-inflamatorias guían la respuesta T para resolver la infección, nos preguntamos si los ratones inmunizados en presencia de VS, que cuentan con una mejor respuesta T, tanto en los GDs

como en la mucosa después del desafío con HSV-2, podrían tener una expresión diferencial de quimiocinas que permitan explicar esta mejor respuesta. Con tal fin, evaluamos la expresión de mensajeros de un panel de quimiocinas proinflamatorias relevantes para la migración de las células T durante la infección por HSV-2 (Figura 21). No encontramos diferencias en la expresión de los ARNm de *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl2* y *Ccl5* en la mucosa vaginal (Figura 21A). En cambio, en los GDs encontramos un aumento en la expresión de ARNm de *Cxcl9* aunque *Cxcl10*, *Ccl2* y *Ccl5* no se vieron modificadas (Figura 21B). Ha sido descrito que CXCL9 tiene un rol crucial en la inducción de la respuesta Th1 anti-herpética (Nakanishi et al., 2009; Schenkel et al., 2014) y en la activación de la respuesta de memoria T en los GDs (Sung et al., 2012), ya que esta quimiocina guía las células T de memoria central hacia la zona cortical de los GDs para que estas entren en contacto con los Ags provenientes de la linfa y así responder de manera efectiva frente a la infección. En parte la producción de CXCL9 en los ganglios de los ratones inmunizados en presencia de VS podría explicar la respuesta protectora. Sin embargo, es probable que sea una consecuencia de la respuesta T potenciada ya que son estos mismos LT los que la liberan al activarse (Sung et al., 2012).

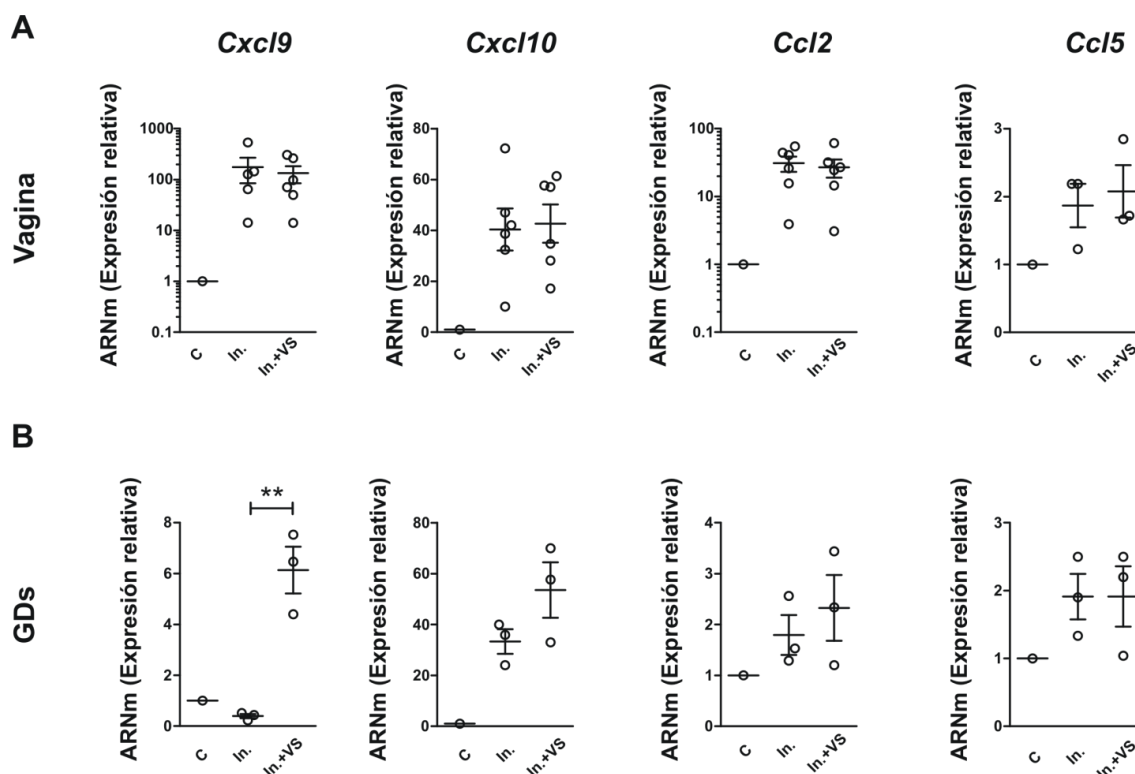


Figura 21 El contenido de vesícula seminal (VS) aumenta la expresión de CXCL9 en los GDs frente al desafío letal con HSV-2. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Treinta días después los ratones fueron tratados nuevamente con mp. y cinco días después fueron desafiados intravaginalmente con HSV-2 (2×10^6 ufp/15 μ l). Tres días después del desafío los ratones fueron sacrificados y las vaginas y las células de GDs fueron recuperadas. Ratones tratados con mp pero sin vacunar ni desafiar fueron usados como control (C). Luego, se extrajo el ARN total y se cuantificaron los niveles de expresión de *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl2* y *Ccl5* por qPCR en células provenientes de vagina (A) o células provenientes de GDs (B). Los resultados están expresados como el media \pm EEM de un experimento representativo (n=10) de tres experimentos distintos para B o de un experimento n=5 con datos individuales para cada ratón en A (**p<0,01).

4.6 El contenido de vesícula seminal induce una robusta respuesta de memoria celular en los ganglios drenantes (GDs).

Todos los resultados descriptos en la figuras anteriores (14-21) fueron realizados luego del desafío letal con HSV-2 y por ende luego de la

reestimulación de la respuesta inmune de memoria. Para estudiar los mecanismos de la respuesta de memoria inducida al inmunizar en presencia de VS, sacrificamos ratones 28 días después de ser inmunizados como describimos anteriormente pero sin ser desafiados (Figura 22A). Analizamos las poblaciones de memoria presentes en los GDs usando los marcadores CD44 y CD62L en las células T CD4⁺ y T CD8⁺. Encontramos que, en los ganglios de los ratones inmunizados en presencia de VS, el número y frecuencia de células T de memoria efectora (CD44^{high}CD62L^{low}) y memoria central (CD44^{high}CD62L^{high}) eran más altos que en los ratones inmunizados sin VS, tanto para el compartimento T CD4⁺ como para el T CD8⁺ (Figura 22B y C). Esto indica que VS tiene un efecto adyuvante en la inmunización con HSV-2 inactivado, ya que genera una respuesta de memoria celular de mayor magnitud.

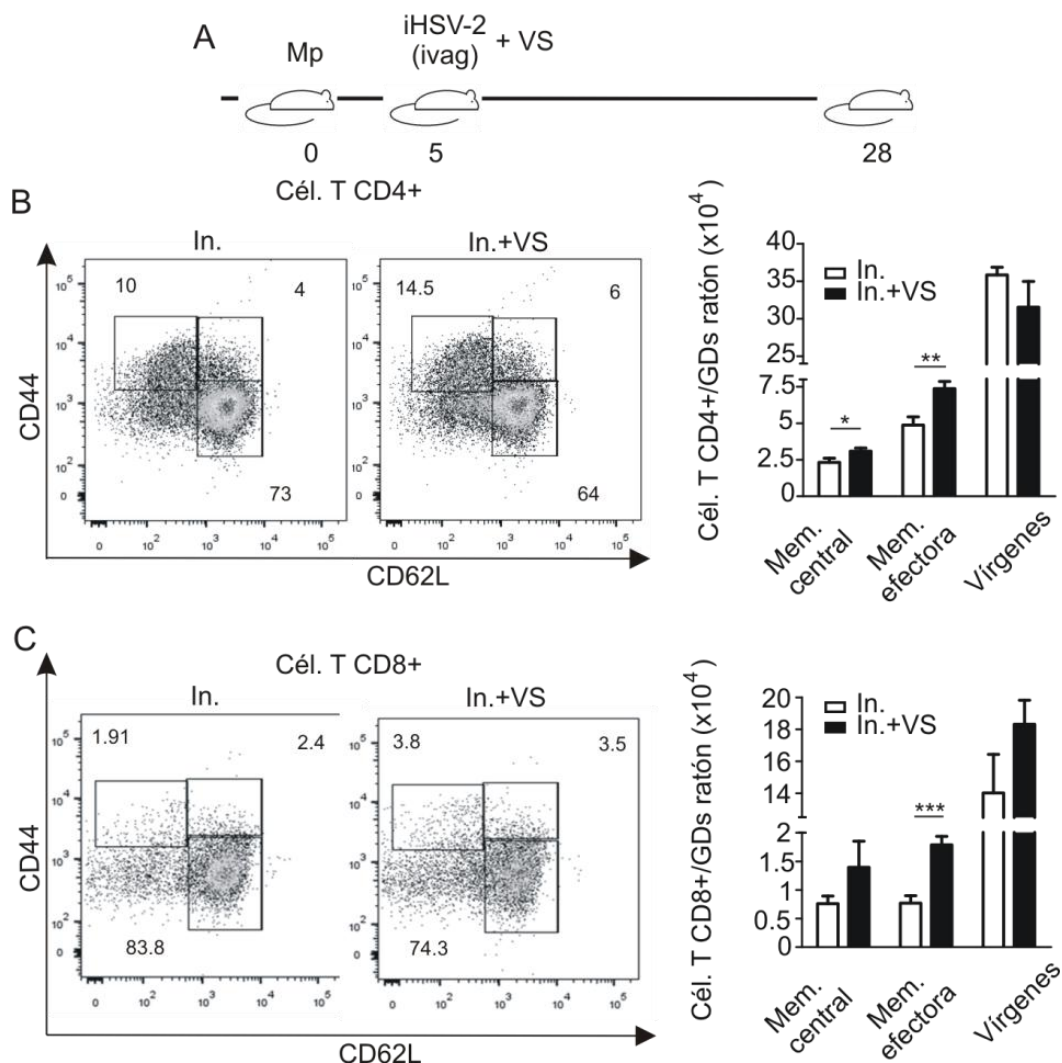


Figura 22 La vacunación en presencia del fluido contenido en las vesículas seminales aumenta la respuesta de memoria T CD4⁺ y T CD8⁺ en los GDs. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Veintiocho días después, estos fueron sacrificados y se extrajeron los GDs (A). Las células fueron recuperadas para analizar las poblaciones de células de memoria T CD4⁺ (B) o T CD8⁺ (C) por citometría de flujo usando los marcadores CD44 y CD62L para diferenciar entre memoria central (CD44^{high}CD62L^{high}), memoria efectora (CD44^{high}CD62L^{low}) y células T vírgenes (CD44^{low}CD62L^{high}). Se presentan los citogramas de un experimento representativo junto con la cuantificación a partir de tres experimentos independientes (media \pm DE).

No solo la magnitud de la respuesta de memoria se vio afectada por la inmunización en presencia de VS. Al analizar la funcionalidad de las células de

memoria provenientes del ganglio encontramos una mayor producción de IFN- γ luego de la estimulación *ex vivo* con HSV-2 inactivado (Figura 23A). Consistentemente observamos un aumento en la producción de IFN- γ y TNF- α en los sobrenadantes de dichas células (Figura 23B y C). Al igual que con los LT después del desafío, pudimos comprobar que la producción de IFN- γ ante estímulos específicos se veía aumentada (péptidos de HSV-2 y HSV-2 inactivado), y no así cuando fueron estimulados con VacV inactivado (Figura 23D). Igualmente, encontramos el mismo efecto potenciador de la respuesta de memoria celular ag-específica en el bazo de los ratones que recibieron VS con la inmunización (datos no mostrados). Concluimos que la presencia de VS en el momento de la inmunización induce una fuerte respuesta de memoria celular en los GDs, mediada principalmente por las células T CD4⁺ y T CD8⁺ Ag específicas.

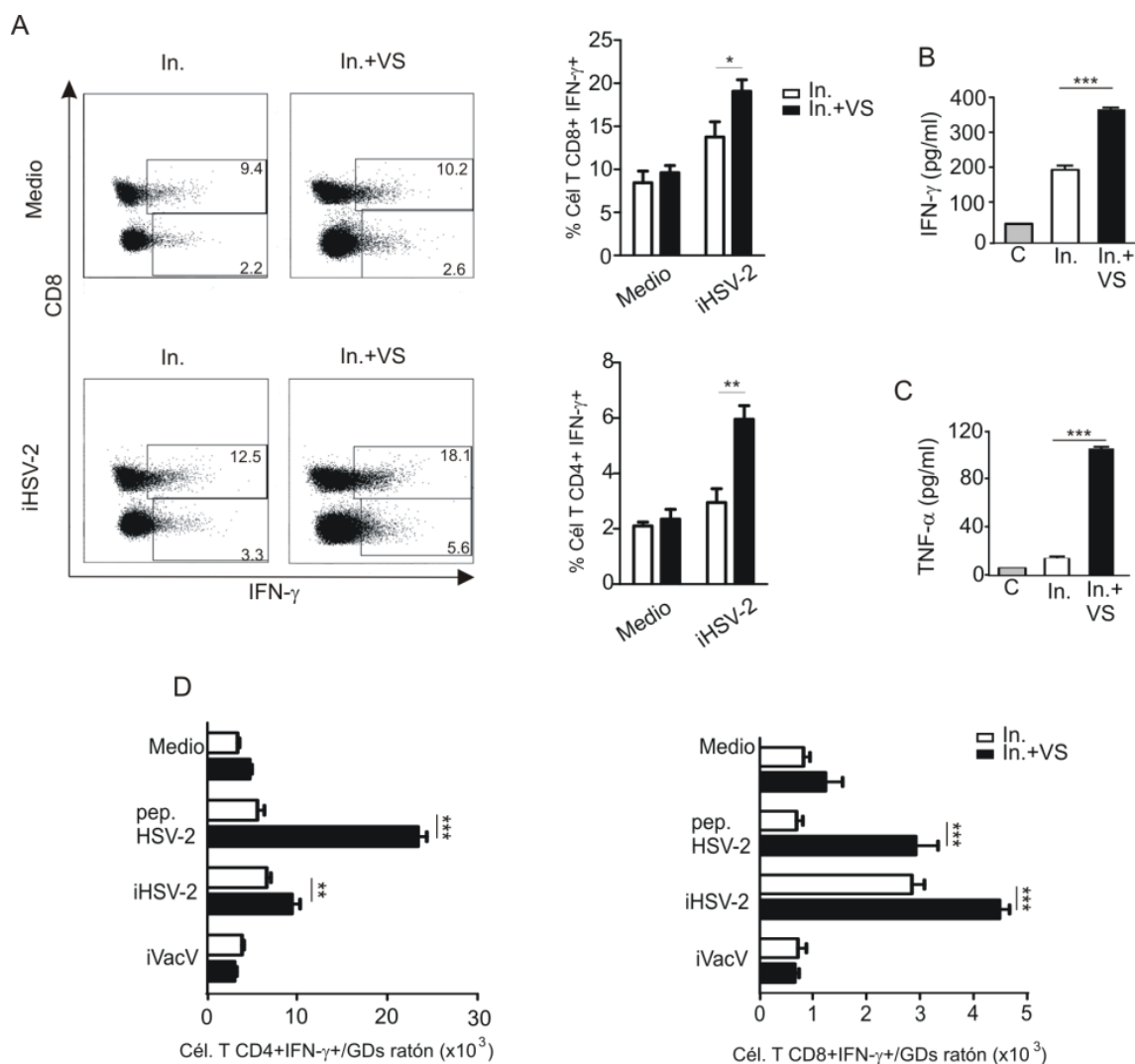


Figura 23 La vacunación en presencia del fluido contenido en las vesículas seminales aumenta la funcionalidad de la respuesta de memoria T CD4⁺ y T CD8⁺ en los GDs. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Veintiocho días después, estos fueron sacrificados y se extrajeron los GDs. A) Las células provenientes de GDs fueron estimuladas por 18 h con HSV-2 inactivado por luz UV (iHSV-2) o con medio solo y las células CD3⁺ productoras de IFN- γ fueron cuantificadas por citometría de flujo. Mostramos citogramas representativos y la cuantificación de tres experimentos independientes para los compartimentos T CD4⁺ y T CD8⁺. Los resultados están expresados como el promedio \pm DE (n=10 ratones por grupo). Las células de GDs fueron estimuladas *ex vivo* con iHSV-2 y se cuantificó la producción de IFN- γ (B) y TNF- α (C) por ELISA. (D) Las células fueron estimuladas como en A con: iHSV-2, un *pool* de péptidos de HSV-2 específicos para células T CD4⁺ y T CD8⁺, iVacV o medio. Las células CD3⁺ productoras de IFN- γ fueron cuantificadas por citometría de flujo. Mostramos la cuantificación de dos experimentos independientes para los compartimentos T CD4⁺ y T CD8⁺. Los resultados

es expresan como el promedio \pm DE (n=3) (*p<0,05, **p<0,01 y *** p<0, 005).

4.7 Las células T median la protección conferida por la presencia del contenido de vesículas seminales durante la inmunización frente a un desafío letal.

Para demostrar concluyentemente que las células T median la protección asociada a la vacunación en presencia de VS realizamos un experimento de transferencia adoptiva. Ratones inmunizados con HSV-2 inactivado en presencia (In.+VS) o no (In.) de VS fueron sacrificados treinta días después del inóculo y se purificaron las células T CD4⁺ y T CD8⁺ del bazo. Se obtuvieron además, células T CD4⁺ y T CD8⁺ aisladas de ratones inoculados con PBS-BSA o VS sin HSV-2 inactivado y se utilizaron como controles. Cinco millones de estas células fueron mezcladas en una proporción CD4:CD8 3:2 e inyectadas por vía retro orbital en ratones no inmunizados. Dieciocho horas después de la transferencia de células estos ratones fueron desafiados con una dosis letal de HSV-2. Los animales fueron examinados diariamente para evaluar su sintomatología, el peso y la supervivencia (Figura 24A). Contundentemente, observamos que los ratones que recibieron células T CD4⁺/CD8⁺ de ratones inmunizados en presencia de VS sobrevivieron más (90% vs. 30%) y desarrollaron menos signos y síntomas que los ratones que recibieron células de ratones inmunizados sin VS, o de ratones que solo recibieron VS o PBS (Figura 24B, C, D). Estos resultados demuestran que las células T son responsables de la protección aumentada observada en los ratones inmunizados con HSV-2 inactivado en presencia de VS.

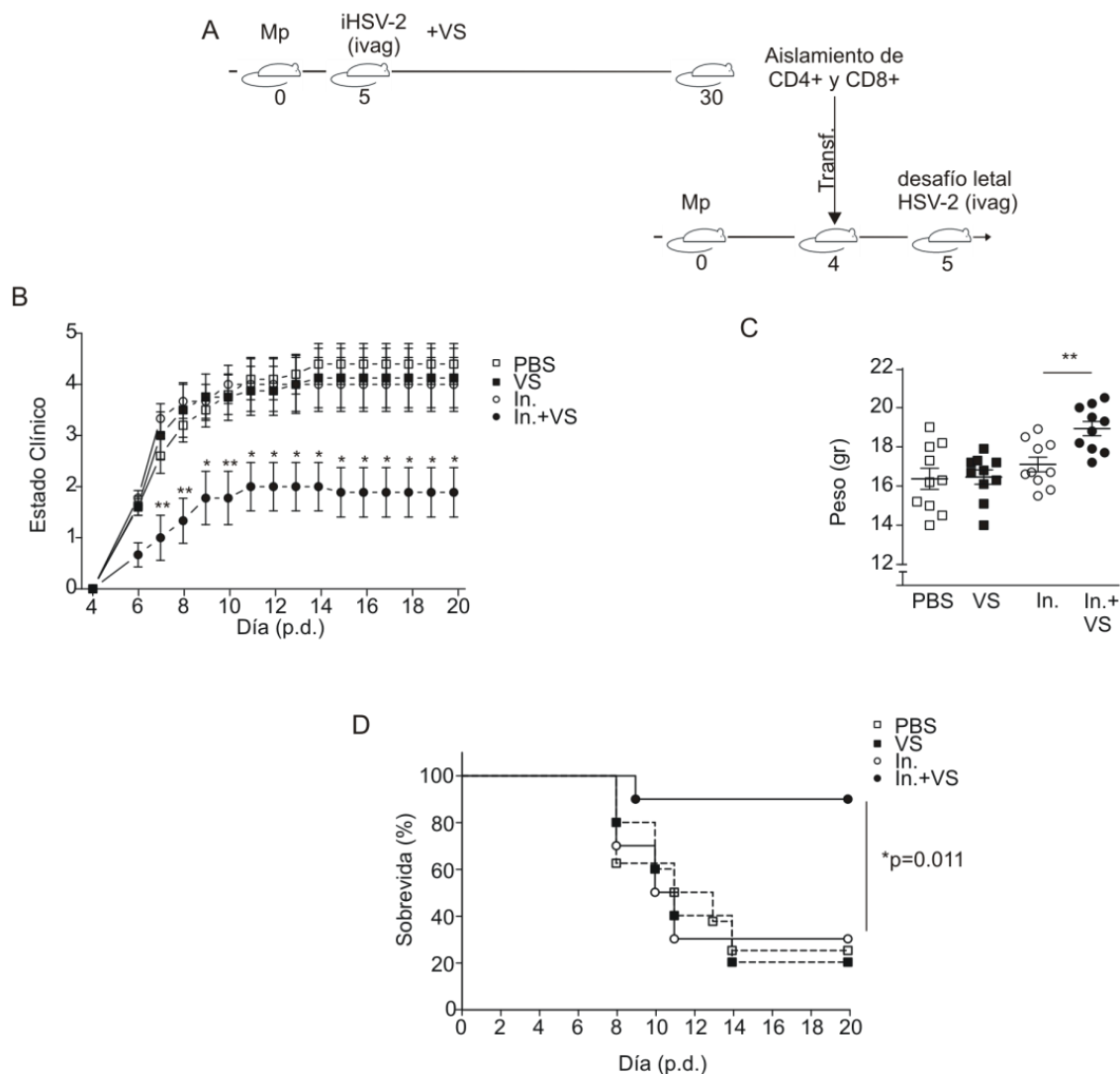


Figura 24 La transferencia adoptiva de células T $CD4^+$ y T $CD8^+$ provenientes de ratones inmunizados en presencia de VS es suficiente para proteger ratones no inmunizados frente a un desafío letal con HSV-2. Grupos de 10 ratones tratados anteriormente con mp. fueron inoculados intravaginalmente con: a) PBS-BSA (5mg/ml) (PBS), b) VS (5mg/ml), c) HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l) (In.), o d) HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l) más VS (In. + VS), a una concentración final de 5 mg/ml. Treinta días después, los ratones de los cuatro grupos fueron sacrificados y se purificaron los esplenocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ usando esferas magnéticas acopladas a anticuerpos (selección negativa). Cinco millones de estas células (en una proporción $CD4:CD8$ de 3:2) fueron transferidas a ratones sin inmunizar, previamente tratados con mp., por inyección retro orbital. Dieciocho horas después estos ratones receptores fueron infectados con una dosis letal de HSV-2 por vía intravaginal (2×10^6 ufp/15 μ l), como indicado en (A). Los ratones fueron examinados diariamente para determinar su estado clínico (B), peso (a día 7 post desafío) (C), y su supervivencia (D). Los resultados están expresados como el media \pm EEM del estado clínico (B), peso (C), o como la supervivencia

(D) de 10 ratones por grupo. Datos de un experimento representativo de dos experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$).

4.8 La vacunación en presencia del contenido de vesícula seminal induce una respuesta inflamatoria temprana.

Se ha demostrado en trabajos anteriores que la deposición del semen en la mucosa vaginal, tanto en humanos como en ratones, induce una respuesta inflamatoria local que recluta monocitos de sangre que se diferencian a CD4 y macrófagos (Sharkey et al., 2007). En base a estos reportes y a nuestros resultados, hipotetizamos que esta respuesta inflamatoria podría estar aportando el ambiente adecuado para la generación de una respuesta Th1 robusta observada en los ratones inmunizados en presencia de VS. Para probar esta hipótesis, se vacunaron ratones con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l) con y sin VS y 48 horas después fueron sacrificados. Analizando las células de mucosa vaginal encontramos que los ratones inmunizados en presencia de VS, pero no los ratones inmunizados sin VS o con VS sin inmunizar, mostraron una mayor producción de IFN- γ , TNF- α e IL-6 (Figura 25A). Posteriormente analizamos las poblaciones celulares que podrían estar implicadas en esta inflamación temprana. Si bien no observamos grandes diferencias en macrófagos, neutrófilos y monocitos (datos no mostrados), sí encontramos un aumento en el número de células NK en la mucosa vaginal (Figura 25B). Dada la capacidad de las células NK de producir IFN- γ a tiempos tempranos, podríamos atribuir a estas el aumento observado.

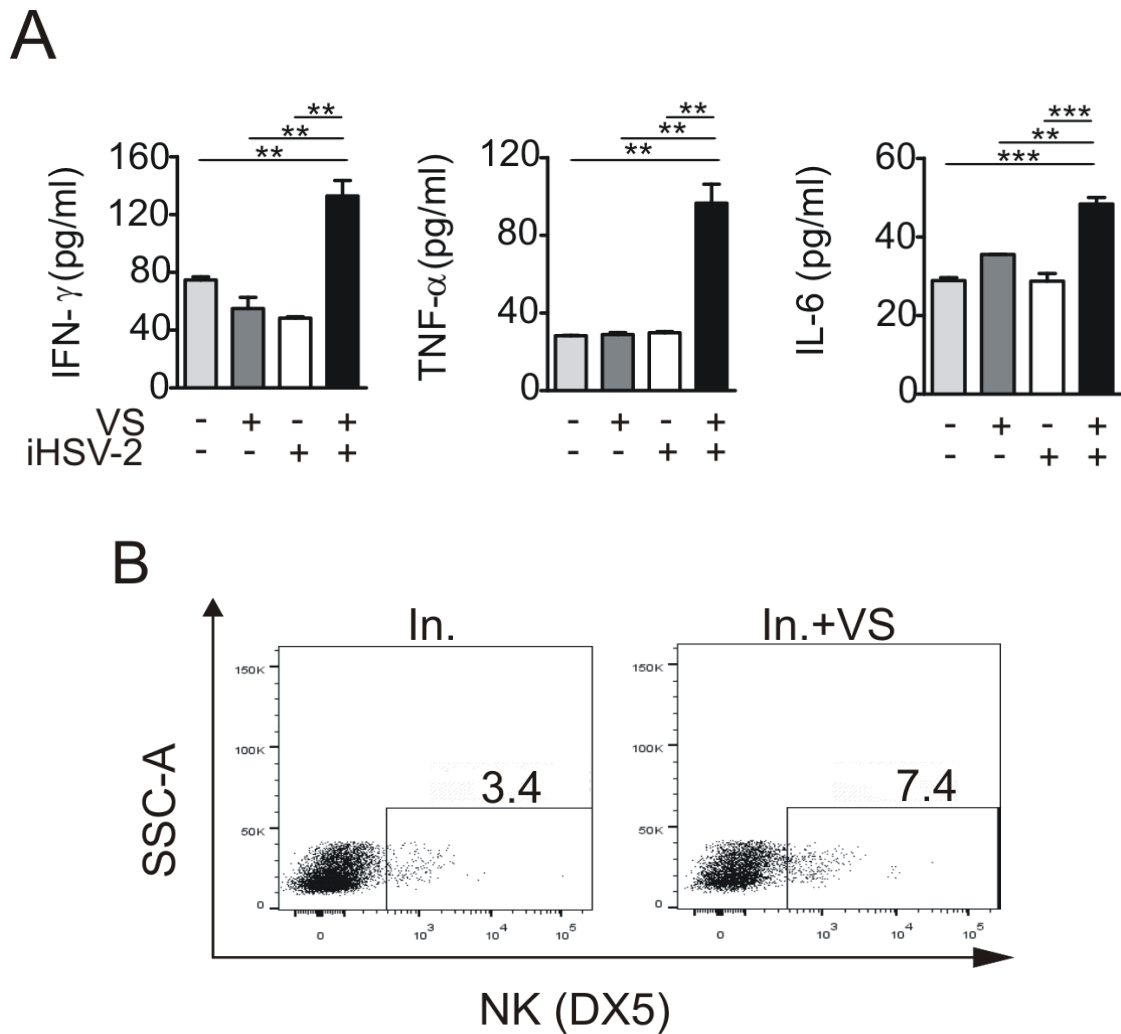


Figura 25 La vacunación en presencia del fluido contenido en la vesícula seminal induce una respuesta inflamatoria temprana en la mucosa vaginal. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/ $15 \mu\text{l}$), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Dos días después de la inmunización, los ratones fueron sacrificados para analizar la respuesta inmune en la mucosa vaginal. (A) Se evaluó la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-6 en los sobrenadantes de suspensiones de células extraídas de la mucosa vaginal por ELISA (B) Frecuencia de células NK (DX5+) en el tejido vaginal por citometría de flujo. Los resultados están expresados como el media \pm DE (1 experimento representativo de 3 experimentos independientes). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,005$).

A la vez analizamos la respuesta inmune temprana en los GDs de la vagina, ya que en estos sitios se induce la respuesta adaptativa que luego dará lugar a la respuesta de memoria. Considerando nuestros resultados anteriores es lógico

pensar que el ambiente en el cual se induce la respuesta adaptativa se puede encontrar modificado en los ratones que son inmunizados conjuntamente con VS. Al sacrificar a los ratones pudimos observar un aumento en el tamaño de los GDs en los ratones inmunizados en presencia de VS. Cuantificamos este efecto pesando los ganglios de cada ratón en una balanza analítica (Figura 26A). De manera consistente encontramos un ambiente pro-inflamatorio, caracterizado por IFN- γ , TNF- α e IL-6 en los GDs de estos ratones (Figura 26B).

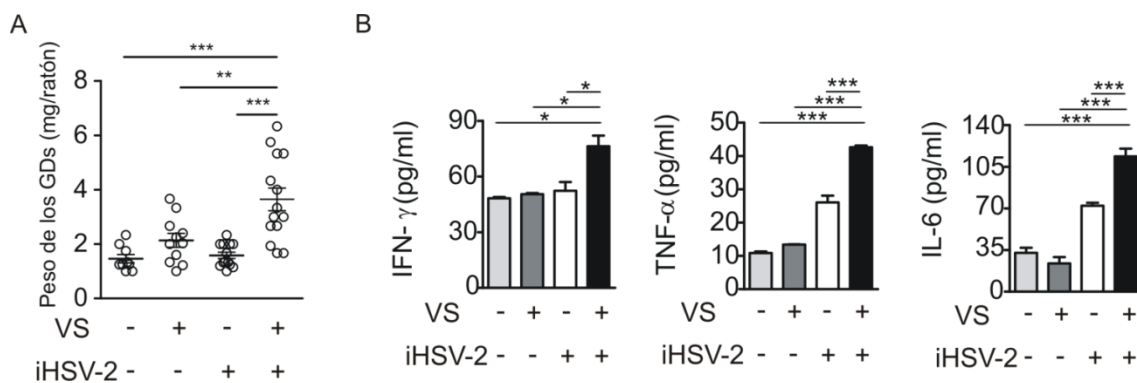


Figura 26 La vacunación en presencia del fluido contenido en la vesícula seminal induce una respuesta inflamatoria temprana en los ganglios drenantes. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Dos días después de la inmunización, los ratones fueron sacrificados para analizar la respuesta inmune en los GDs. (A) Se evaluó el peso de los ganglios de cada ratón. Los resultados están expresados como el peso de todos los ganglios extraídos de cada ratón (3-4 por ratón) dividido el número de ganglios. Se presentan los datos individuales, el media y EEM. (B) Se evaluó la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-6 en los sobrenadantes de suspensiones de células extraídas de los GDs por ELISA. Los resultados están expresados como el media \pm DE (1 experimento representativo de 3 experimentos independientes). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,005$).

Habiendo demostrado que el ambiente que induce la vacunación en presencia de VS es proinflamatorio nos preguntamos cómo afectaría este contexto a las

CDs, encargadas de inducir la respuesta Th1 en los GDs. Para ello buscamos CDs en mucosa vaginal y GDs, identificando estas células por los marcadores CD11c y CMH-II. En primer lugar, notamos que los números de CDs no se encontraban modificados en la mucosa de los ratones inmunizados en presencia de VS. Sin embargo, este análisis demostró que las CDs de la mucosa vaginal expresaban mayores cantidades de CD86, marcador característico de su activación (Figura 27A).

Además, observamos un aumento en el número de las CDs en los GDs de dichos ratones (Figura 27B). Estos resultados sugieren que el ambiente proinflamatorio generado por la presencia de VS en la vacunación induce la maduración de las CDs de la mucosa y la migración a los GDs, donde en un ambiente proinflamatorio inducen la producción de una robusta respuesta Th1.

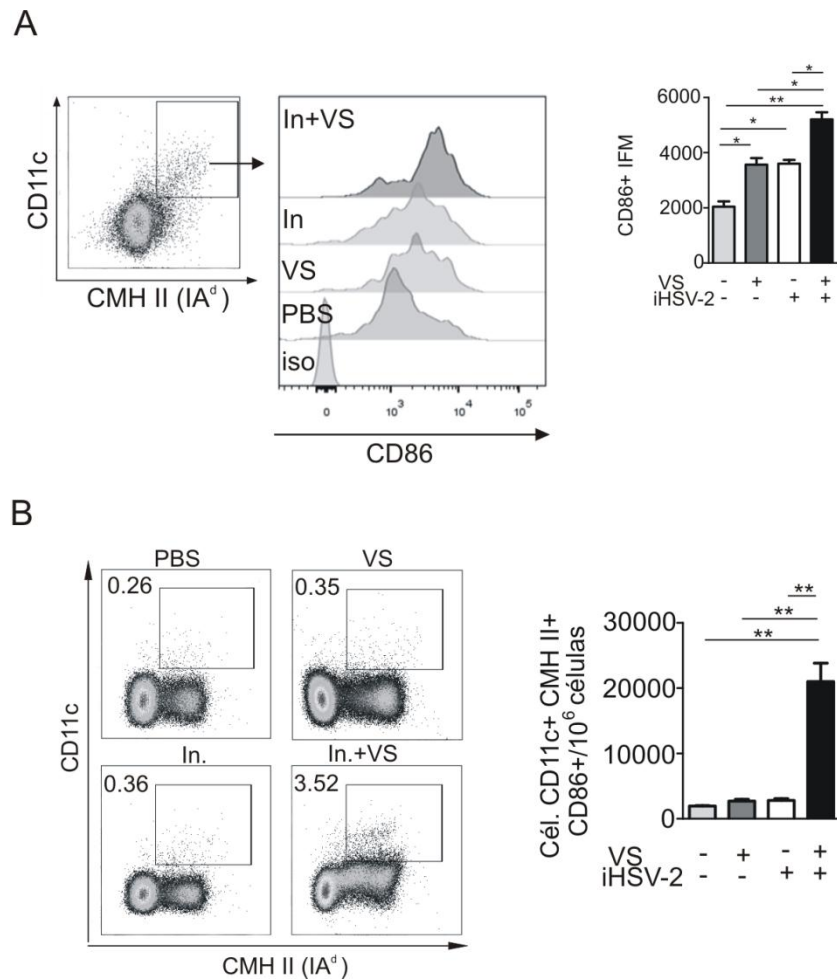


Figura 27 La vacunación en presencia del fluido contenido en la vesícula seminal induce la activación y migración de las CDs hacia los gánglios drenantes. Grupos de 10 ratones previamente tratados con mp. fueron vacunados intravaginalmente con HSV-2 inactivado (1×10^4 ufp/15 μ l), en ausencia (In.) o presencia de VS (In. + VS), a una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. Dos días después de la inmunización, los ratones fueron sacrificados para analizar la respuesta inmune en la mucosa vaginal y los GDs. (A) Expresión de CD86 en CDs ($CD11c^+$ CMHIII (IA^d) $^+$) extraídas de vagina (media \pm DE (n=2)). (B) Frecuencia de CDs ($CD11c^+$ CMHIII (IA^d) $^+$) en los GDs de la mucosa vaginal por citometría de flujo. Se muestra la media de CDs $CD86^+$ por millón de células. Los resultados están expresados como el media \pm DE (1 experimento representativo de 3 experimentos independientes). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,005$).

5 CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

El objetivo central de este trabajo de tesis fue evaluar el impacto del semen en la respuesta inmune anti-infecciosa en el contexto de una transmisión sexual. Con tal fin usamos un modelo de infección intravaginal murina por HSV-2, muy estudiado en la literatura científica. El hallazgo más importante de este trabajo de tesis es que el fluido contenido en la vesícula seminal (VS) mejora considerablemente la protección ante un desafío letal, inducida por la vacunación intravaginal. Notablemente, el agregado de VS a la vacuna compuesta por HSV-2 inactivado, aumenta la sobrevivencia de los animales de un 30% a un 80%. Los resultados obtenidos sugieren que el efecto adyuvante ejercido por VS es debido al mejoramiento de la respuesta inmune de memoria inducida por la vacuna. Nuestros resultados cambian la noción que establece que el plasma seminal suprime la respuesta inmune independientemente del estímulo que la gatille, y plantean un interrogante acerca de los mecanismos a través de los cuales el plasma seminal induce dos efectos aparentemente contrapuestos luego de su deposición en el tracto genital femenino: una respuesta tolerogénica contra los antígenos paternos mediante la inducción de Tregs y un mejoramiento de la respuesta inmune de memoria protectora de agentes de transmisión sexual.

5.1 ¿El semen participa activamente en la transmisión de agentes virales?

El semen media la transmisión sexual de numerosas infecciones de etiología bacteriana y viral. Llama la atención, por lo tanto, que no haya sido investigado aún, en forma rigurosa, en modelos *in vivo*, la posible acción moduladora

ejercida por componentes del semen, sobre el desarrollo temprano de los procesos infecciosos y/o sobre la respuesta inmune inducida en el hospedador. Esta falencia es consistente con la visión predominante en la literatura científica que considera al semen un reservorio y/o vehículo de transmisión de patógenos, asignándole de este modo un papel meramente pasivo. Sin embargo, ha sido demostrado que el semen es capaz de inducir un conjunto de cambios a nivel de las mucosas receptoras que podrían modular el curso inicial de los procesos infecciosos transmitidos sexualmente: a) neutraliza el pH de la mucosa vaginal (Bouvet et al., 1997); b) opsoniza microorganismos (Bouhlal y Kaveri, 2012); c) promueve la quimiotaxis de células de Langerhans vía secreción de la quimiocina CCL20 por células del epitelio vaginal (Berlier et al., 2006); y d) estimula la producción de un conjunto de citosinas y quimiocinas en el ectocervix, con la consecuente inducción de una reacción inflamatoria local e infiltrado leucocitario en la mucosa cérvico-vaginal (Sharkey et al., 2007).

En lo que respecta al impacto del semen en la transmisión sexual del HSV-2, inicialmente observamos que en presencia de VS el virus retuvo su capacidad de infectar, multiplicarse y lisar células Vero incluso en concentraciones altas de VS (dilución al medio). Por otra parte, observamos que este fluido no tiene efecto citotóxico en las concentraciones evaluadas. Estudios previos analizaron directamente el papel del plasma seminal sobre la infección por HSV-2 *in vitro*, y evaluaron tanto la eficiencia de la transmisión como la interacción con microbicidas tópicos. Ellos observaron que el plasma seminal no modifica la infección *in vitro* (Patel et al., 2007). Obtuvimos resultados similares en este trabajo de tesis, en ensayos *in vitro* observamos que el fluido contenido en la vesícula seminal no potencia y tampoco compromete la infectividad de HSV-2.

Por otro lado, contrastando con nuestras observaciones que indican que el VS no afecta la replicación *in vitro*, Torres y col. (Torres et al., 2015) reportaron que el plasma seminal humano aumenta la infección *in vitro* por HSV-2, sugiriendo que las secreciones del epidídimo y otras glándulas podrían ser responsables del efecto descrito por este grupo.

5.2 El contenido de la vesícula seminal no modifica la infección primaria por HSV-2 adquirida por vía vaginal.

El sitio de entrada natural de HSV-2 es, principalmente, la vagina. El virus puede ingresar al ser depositado junto con el semen e infecta las células epiteliales del tracto genital. Allí replica y causa lisis celular, causando lesiones genitales, que también pueden ser cutáneas si la infección se extiende a la piel. Seguidamente, el virus logra infectar neuronas sensoriales donde puede permanecer latente (Liu et al., 2000). La infección en el modelo murino, cuando logra progresar, genera lesiones purulentas en las inmediaciones del aparato genital, tanto internas como externas. A la vez la infección puede llegar al sistema nervioso y causar la parálisis de los miembros posteriores del ratón. De este cuadro se progresa indefectiblemente a la muerte (Morrison et al., 1998). Se pueden recuperar partículas infectivas producidas por las células epiteliales de la mucosa genital infectadas, alcanzando la máxima producción al día 3 post-infección (Iijima et al., 2011).

Hemos observado que la inoculación de HSV-2 en presencia de VS no afecta el desarrollo de la enfermedad herpética, de manera similar a lo reportado por otro grupo de investigación (Patel et al., 2007). Hemos evaluado tanto la supervivencia, como la sintomatología y el peso de los ratones y no

observamos diferencias significativas respecto al grupo control. Sin embargo, reportamos una disminución en los títulos virales recuperados en lavados vaginales los días 3 y 5 pi. El VS impide, en cierta medida, la multiplicación del HSV-2 en el tracto genital femenino. Descartamos que el VS esté actuando directamente sobre el virus inactivándolo, ya que como mencionamos anteriormente, nuestros resultados *in vitro* demuestran que este fluido no compromete la infectividad del virus. Confirmamos estos resultados midiendo el ADN genómico del virus en la mucosa genital de las ratonas a las 18 horas post inoculado y observamos que VS no impide que el virus se una e ingrese al epitelio vaginal.

La disminución en la producción viral obtenida al inocular intravaginalmente el virus en presencia de vesícula seminal podría explicarse entonces, por la capacidad del semen de modular la respuesta inmune, particularmente en este caso, por la capacidad del contenido de la vesícula seminal de potenciar la respuesta inmune antiviral y controlar en cierta medida la producción viral.

Estos resultados presentan una aparente incongruencia ya que las diferencias en los títulos virales no se reflejan en el estado clínico de los animales. El modelo empleado para la infección primaria presenta una grave dificultad para evaluar la modulación de la respuesta inmune adaptativa (Iijima et al., 2011; Soerens et al., 2016; Svensson et al., 2005). Esto sucede porque la infección intravaginal por HSV-2 es rápidamente letal, ya que el virus logra escapar a la inmunidad innata e ingresar al sistema nervioso central antes de que la respuesta inmune adaptativa haya logrado llegar al sitio de infección. Por lo tanto, la sintomatología y la supervivencia de los ratones no puede ser modulada por la respuesta inmune innata, por el escape viral a SNC, ni por la

respuesta inmune adaptativa. Para evaluar la respuesta inmune adaptativa en la infección intravaginal por HSV-2 se han desarrollado dos enfoques: el uso de cepas atenuadas que tienen retardado su ingreso a SNC, o el uso de HSV-2 inactivado (Iijima et al., 2011; Soerens et al., 2016; Svensson et al., 2005). Estos datos apoyan en parte nuestros resultados, donde la modulación temprana de la replicación viral en la mucosa es posible, pero es inevitable el acceso a SNC y la muerte de los ratones independientemente de la carga viral. De la misma manera esto nos permite entender por qué el VS no tiene un efecto sobre el desarrollo de la enfermedad herpética durante la infección primaria, aunque muestra una potente modulación al inmunizar previamente con HSV-2 inactivado.

5.3 El semen como inmunomodulador

Induciendo tolerancia frente a los aloantígenos paternos, las células Treg han demostrado un importante rol en el embarazo (Aluvihare et al., 2004; Robertson et al., 2018). Numerosos enfoques experimentales en ratones demuestran que la depleción de estas células causa la reabsorción fetal (Aluvihare et al., 2004). Llamativamente, este efecto es mucho más evidente cuando las Treg están ausentes antes o durante la implantación y es particularmente relevante sobre fetos machos o alogénicos (Shima et al., 2010; Zenclussen et al., 2005). En ratonas y mujeres embarazadas se encuentran números elevados de células Treg en sangre. (Arruvito et al., 2007; Ernerudh et al., 2011). Ha sido descrito que la presencia de células Treg está asociada con una menor tasa de abortos espontáneos recurrentes y preeclampsia en mujeres (Dekker et al., 2011; Munoz-Suano et al., 2011). El semen media la expansión de células Tregs en los GDs del tracto genital, y su subsecuente reclutamiento al endometrio

uterino (Robertson et al., 2013). Se ha observado en mujeres sanas que la exposición al semen está asociada positivamente con el número de células Tregs en sangre (Arruvito et al., 2007; Tilburgs et al., 2008). Además, se ha reportado que el contacto con el semen mejora la tasa de implantación en pacientes bajo fertilización asistida y disminuye el riesgo de preeclampsia (Crawford et al., 2015; Dekker et al., 2011; Saftlas et al., 2014). Esta respuesta tolerogénica es inducida incluso sin necesidad de que ocurra la concepción (Guerin et al., 2011). Este efecto es completamente dependiente de la presencia de VS en el ratón, ya que al aparear ratones sin vesícula seminal no se observa la expansión de Tregs (Guerin et al., 2011). Generalmente se asume que, además de suprimir la autoinmunidad, las células Treg controlan el curso de las respuestas inmunes dirigidas contra antígenos de distintos patógenos para disminuir el daño tisular asociado (Sakaguchi et al., 2008). Sin embargo el rol de las células Treg durante los procesos infecciosos sigue siendo motivo de debate. Si bien son mayoritarios los reportes que indican que la ausencia de Tregs mejora la respuesta inmune antiviral, existen cada vez más trabajos que demuestran que la ausencia de estas provoca mayores títulos virales y un peor control de la infección (Soerens et al., 2016). Esto se ha confirmado especialmente en respuestas asociadas a mucosas, como en la infección intranasal por el Virus Sincicial Respiratorio (RSV), o en la infección oral por *Candida albicans* (Fulton et al., 2010; Pandiyan et al., 2011; Ruckwardt et al., 2009). Tanto en estos dos ejemplos como en la infección por el Virus del Nilo Occidental (WNV), se ha observado que las células Treg mejoran la respuesta T promoviendo la infiltración de las mucosas por células T CD4⁺ y T CD8⁺ (Graham et al., 2014). Llamativamente, usando un modelo murino de

infección intravaginal con HSV-2, Lund y col. demostraron que las células Treg no comprometen la respuesta inmune contra HSV-2 e incluso mejoran esta respuesta promoviendo el reclutamiento de células del sistema inmune a los tejidos infectados (Lund et al., 2008). En ratones cuyas células Treg habían sido depletadas, encontraron menor producción de IFN- γ en el sitio de infección (la mucosa vaginal), aun cuando los niveles de esta citoquina en los GDs se encontraban aumentados (Lund et al., 2008). Esto se vio asociado a un retraso en la llegada de células NK, CD8 y células T al sitio de infección y a una mayor producción de quimiocinas proinflamatorias, CXCL9 y CXCL10, en los GDs (Lund et al., 2008). De hecho, este grupo demostró que las células Treg interaccionan directamente con las CD8 a través de CTLA-4, y así inducen su migración a los GDs para inducir la respuesta T CD4⁺ (Soerens et al., 2016). Esta observación sugiere una conexión entre la habilidad del plasma seminal de inducir la expansión local de Tregs, y nuestros actuales resultados mostrando que VS mejora la protección conferida por la vacunación intravaginal con HSV-2 inactivado. El hecho de no haber registrado cambios en las células Treg 30 días post-vacunación puede deberse a la naturaleza de este efecto, ya que este se observa en tiempos tan tempranos como 3-4 días después del apareamiento (Guerin et al., 2011). Cabe destacar que el uso de ratones singénicos minimiza la presencia de aloantígenos a los antígenos sexuales (asociados al cromosoma Y) y ello podría no ser suficiente para inducir una respuesta tolerogénica aproximable al contexto fisiológico de una transmisión sexual (Robertson et al., 2018).

5.4 El rol adyuvante del contenido de las vesículas seminales en la vacunación intravaginal con HSV-2 inactivado.

Uno de los principales desafíos para el control de las enfermedades de transmisión sexual, es el desarrollo de una vacuna preventiva para este grupo de patógenos. Para la pandemia de HIV-1, el desarrollo de una vacuna que logre prevenir la infección adquirida por vía sexual es el escenario más deseado. Sin embargo, el desarrollo de una buena respuesta inmune de memoria en la mucosa cérvico-vaginal continúa siendo un desafío. (Gottlieb y Johnston, 2017; Wijesundara et al., 2017). En este sentido, los ensayos clínicos reportan dificultades en generar una robusta respuesta humoral en la mucosa vaginal (Gottlieb y Johnston, 2017). Recientemente, se le ha dado creciente importancia a la respuesta T, ya que numerosos ensayos en modelos animales sugieren a las células T CD4⁺ y T CD8⁺ son claves para la protección (Kaufmann y Flechtner, 2016). Ante estas dificultades, entender los requerimientos de una respuesta protectora en la mucosa vaginal será esencial para evaluar la efectividad de las nuevas vacunas.

Un gran número de evidencias indican que la respuesta inmune protectora contra la infección genital por HSV-2 es fuertemente dependiente de la inducción de una respuesta de memoria Th1, y del reclutamiento de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos a la mucosa genital (Iijima y Iwasaki, 2014; Janssen et al., 2003; Nakanishi et al., 2009). Observaciones en humanos también sugieren un rol fundamental para la respuesta T en la infección herpética. No solo los episodios recurrentes son más frecuentes en pacientes con deficiencias de células T, sino que la presencia de células T CD8⁺ específicas en la mucosa genital y la piel disminuyen la severidad y frecuencia de dichas

recurrencias (Koelle et al., 1998; Zhu et al., 2007). Sin embargo, la protección efectiva contra HSV-2 también puede depender de anticuerpos (Boukhvalova et al., 2015; Halford et al., 2015; Kohl et al., 2000; Petro et al., 2015). Los ensayos de efectividad de vacunas contra HSV-2, han dejado importantes lecciones sobre la respuesta inmune necesaria para controlar la infección. Por un lado, el diseño racional de vacunas con proteínas virales de superficie involucradas en la entrada de HSV-2, han demostrado que si bien la inducción de una respuesta humoral mejora el control de las lesiones, no es suficiente para que la vacuna sea efectiva (Cairns et al., 2014). Sí se ha demostrado que la generación de anticuerpos tanto en sangre como en la mucosa vaginal limita la diseminación del virus, reduciendo la sintomatología (Straus et al., 1994). Ante estos fracasos, las vacunas candidatas más recientes, están diseñadas para inducir tanto una buena respuesta humoral como celular (Kaufmann y Flechtner, 2016). Nuestros resultados sugieren que el efecto adyuvante mediado por VS está relacionado a la inducción de una respuesta de memoria mediada por células T pero no por linfocitos B. De hecho, no encontramos diferencias en los niveles de anticuerpos IgG o IgA séricos o vaginales entre los ratones vacunados y los vacunados en presencia de VS. Estas observaciones implican que la contribución de linfocitos T y B en la inmunidad protectora contra HSV-2 podría depender del modelo experimental utilizado.

En este trabajo, analizamos la respuesta de células T inducida por la vacunación intravaginal, estudiando tanto los GDs como la mucosa vaginal. En los GDs observamos que los ratones vacunados en presencia de VS, mostraban un mayor número absoluto de células T CD4⁺ y T CD8⁺ y una mayor respuesta en términos de producción de IFN- γ y proliferación, luego de ser

desafiados intravaginalmente con HSV-2. Resultados comparables se obtuvieron cuando se analizó el sitio de replicación viral: la mucosa vaginal. Observamos, un aumento en las concentraciones de IFN- γ e IL-6 en lavados vaginales, una producción aumentada de IFN- γ , TNF- α , IL-6, e IL-17A por el conjunto de las células de vagina y una pronunciada infiltración del tejido por células T CD8⁺ al comparar los ratones vacunados en presencia de VS con los ratones vacunados sin este. Consistentemente, encontramos altas frecuencias de células T de memoria central (CD44^{high}CD62L^{high}) y de memoria efectora (CD44^{high}CD62L^{low}) en los GDs de los ratones 28 días después de la vacunación en presencia de VS. Cabe destacar que, en el mismo sentido, la transferencia adoptiva de células T CD4⁺ y T CD8⁺, a partir de ratones vacunados en presencia de VS fue suficiente para darle un fenotipo de protección frente al desafío intravaginal a ratones no vacunados, demostrando fehacientemente que la protección conferida por VS es mediada por las células T CD4⁺ y T CD8⁺.

En esta última década ha cobrado creciente importancia la respuesta inmune residente en los tejidos. Hoy se sabe que las observaciones sobre el sistema inmune derivadas de células del compartimento sanguíneo o linfático, no pueden explicar todos los fenómenos presentes en las mucosas, ya que en estas hay un conjunto de factores que definen el comportamiento de las células inmunes. Se ha destacado en este sentido, el rol de las células T residentes en el control de los procesos infecciosos que ocurren en la mucosa gastrointestinal, respiratoria, genital y otras (Fernandez-Ruiz et al., 2016; Mueller y Mackay, 2016; Pizzolla y Wakim, 2019; Schenkel et al., 2014). Recientemente, se han reportado resultados prometedores en macacos que

involucran a las células T CD8⁺ de la mucosa cérvico-vaginal en la protección adquirida por una vacuna recombinante contra el Virus de la Inmunodeficiencia Simiana (SIV) (Wijesundara et al., 2017). Igualmente se han realizado grandes esfuerzos por inducir una fuerte respuesta T CD8⁺ en la mucosa genital. En el caso de HSV-2, el primer intento consistió en la inmunización intradérmica y posterior inoculación intravaginal de CXCL9 y CXCL10 para atraer hacia la mucosa las células T CD8⁺ generadas (Shin y Iwasaki, 2012). Alternativamente se ha demostrado la efectividad de utilizar pseudoviriones del Virus del Papiloma Humano (HPV) para generar linfocitos Trms CD8⁺ en la mucosa genital que confieran protección contra HSV-2 (Cuburu et al., 2015). Es interesante destacar que el uso de agonistas de TLR3 intradérmicos como adyuvantes, generó una respuesta protectora contra HSV-2 en la mucosa vaginal; sugiriendo un enfoque alternativo que promete una posible aplicación en humanos (Bardel et al., 2016). De esta manera, nuestros resultados cobran particular relevancia ya que el efecto observado podría explicarse por la generación de Trm en mucosa. En nuestro trabajo observamos un importante infiltrado de células T CD8⁺ en la mucosa vaginal 3 días después del desafío. Resta evaluar si el fenotipo de esta población coincide con la reportada para las células Trm (CD69⁺ y CD103⁺). En este sentido, el estudio de esta población en nuestro modelo y la identificación de los componentes del semen responsables del efecto adyuvante son de crucial importancia y podrían implicar un interesante aporte al desarrollo de vacunas para enfermedades transmitidas sexualmente.

El mecanismo por el cual el VS induce la generación de una respuesta de memoria robusta no queda del todo claro. Nosotros hipotetizamos que la

habilidad del semen de inducir una respuesta inflamatoria temprana en el tejido vaginal genera un ambiente proinflamatorio adecuado para la inducción de una respuesta adaptativa Th1. Robertson y col. han demostrado que, actuando sobre las células epiteliales, el plasma seminal induce la activación de una respuesta inflamatoria aguda, caracterizada por la secreción de MCP-1, GM-CSF, IL-6 e IL-8 (Schjenken et al., 2015). En el mismo sentido que estas observaciones realizadas en modelos murinos, análisis seriados de muestras de cérvix humano, han revelado que la deposición del semen induce una respuesta inflamatoria que consiste en infiltrado del cérvix por macrófagos, CD8 y células T de memoria, en conjunto con la liberación de IL-1 α , IL-6, IL-8 y CSF2 (Sharkey et al., 2012a; Sharkey et al., 2012b). El rol de la inflamación post coito no es claro, pero se cree que tiene un importante rol promotor de la fertilidad (Robertson et al., 2013). Nosotros analizamos si VS promueve inflamación temprana cuando es co-administrado con la vacuna, midiendo la producción de citocinas en suspensiones de células vaginales o de GDs 48 horas post-vacunación. Encontramos que la inmunización en presencia de VS resulta en la producción aumentada de IFN- γ , TNF- α , e IL-6, al compararse con los ratones inmunizados sin VS. Esta respuesta estuvo asociada además a un aumento de células NK en la mucosa genital, un aumento en la expresión de CD86 en las CD8 vaginales y un aumento en el número de CD8 en los GDs. Dado el reconocido rol del IFN- γ en la diferenciación de células T CD4⁺ a un perfil Th1 (Murphy y Reiner, 2002) y el desarrollo de la respuesta de memoria T CD8⁺ (Williams y Bevan, 2007), especulamos que a través de la estimulación de la producción de IFN- γ y del reclutamiento de CD8 maduras a los GDs, el VS promueve la diferenciación de células T CD4⁺ en un perfil Th1 y la

expansión de la respuesta de memoria T CD8⁺, dos mecanismos cruciales en la protección contra la infección por HSV-2.

5.5 Consideraciones respecto del modelo de estudio

Si bien los resultados presentados en este trabajo se centran en estudiar los mecanismos inmunes antivirales potenciados por la presencia de VS en la vacunación intravaginal con HSV-2 inactivado, es importante tener una visión que contemple la complejidad de señales que recibe el sistema inmune femenino, luego de una deposición con un patógeno de transmisión sexual. Para ello es necesario señalar las diferencias entre nuestro modelo y las condiciones fisiológicas en las que se da la transmisión sexual de un patógeno. Una debilidad de nuestro estudio es que no analizamos si la cópula, en lugar de la administración de VS, mejora la protección conferida ante la vacunación intravaginal. Sin embargo, no es posible administrar la vacuna en el tiempo de cópula. Una solución alternativa podría ser la administración de la vacuna previo al apareamiento, sin embargo, la cantidad de virus que se retenga en la vagina podría ser muy diferente entre ratones que copularon y los que no. Otra razón que dificulta estudiar la inmunomodulación en hembras apareadas naturalmente, es que el estado hormonal inducido por la administración de medroxiprogesterona, necesario para que ocurra la infección viral, impide que las hembras se apareen (Kaushic et al., 2003). Además, deberíamos considerar también la posibilidad de que la administración de medroxiprogesterona pudiera afectar la respuesta del tracto genital femenino a los componentes inmunomoduladores del VS o bien que en otras fases del ciclo menstrual el efecto sea otro.

Otra observación es el uso de ratones singénicos, donde la inmunogenicidad del semen es mucho menor a la de un apareamiento alogénico. En el caso de un contexto alogénico, los aloantígenos paternos serán, no solo los Ag asociados al sexo, sino también los asociados a los polimorfismos, especialmente en el caso de los Ag mayores de histocompatibilidad. Finalmente, debemos considerar que nuestros experimentos fueron realizados con VS y no con semen completo. Si bien el VS representa el 60% del plasma seminal de los roedores, el semen completo contiene los espermatozoides y los fluidos vertidos desde el epidídimo y desde otras glándulas accesorias masculinas. Aunque es improbable, no puede descartarse que factores adicionales en el semen pudieran atenuar la función inmunomoduladora ejercida por VS descrita en este trabajo de tesis.

Los mecanismos que subyacen al efecto adyuvante del VS deben estudiarse aún en más profundidad. El VS contiene una diversidad enorme de componentes, incluyendo lípidos, carbohidratos, péptidos, proteínas, citocinas y quimiocinas (Owen y Katz, 2005; Pilch y Mann, 2006; Politch et al., 2007; Sharkey et al., 2012a; Templeton et al., 1978), capaces de mediar una variedad de efectos sobre la infectividad de HSV-2 y la respuesta inmune contra este patógeno. Se ha demostrado que el TGF- β , presente en grandes concentraciones en el semen, es capaz de mediar un efecto proinflamatorio, tanto al entrar en contacto con líneas celulares derivadas de cérvix o vagina humanas, como en ratones (Robertson et al., 1996; Sharkey et al., 2012a). Se ha observado que, *in vivo*, es la vesícula seminal la que aporta el TGF- β al eyaculado y la ablación de esta o el bloqueo de TGF- β en el semen es suficiente para disminuir la respuesta inflamatoria en la mucosa receptora

(Sharkey et al., 2012a). Nuestros resultados muestran que VS induce una respuesta inflamatoria temprana en las hembras vacunadas con HSV-2 inactivado. Si bien no encontramos esta respuesta inflamatoria cuando inoculamos con VS o HSV-2 inactivado por separado, sí encontramos que estos dos estímulos funcionan de manera sinérgica para aportar un ambiente inflamatorio en la mucosa vaginal y los GDs.

Aunque hemos centrado este estudio en la respuesta inmune contra un patógeno de transmisión sexual, sería interesante entender, de manera recíproca, qué efecto puede tener sobre el establecimiento de la interface materno fetal la presencia de un patógeno en el semen. Estos interrogantes presentan un escenario único para el sistema inmune, ya que la fertilidad y la supervivencia parecen encontrarse en juego en esta situación. ¿Será la respuesta inflamatoria antiviral dañina para la implantación?, ¿Podría entenderse esto como un mecanismo para evitar el inicio de un embarazo en condiciones desventajosas? Sería interesante desarrollar un modelo *in vivo* que permita la fecundación y la infección en simultaneo para entender si la presencia de un patógeno como HSV-2 podría intervenir en la respuesta inmune que garantiza el correcto desarrollo del embarazo. Resultados en ratones infectados con ZIKV en los días embrionarios E4.5-6, coincidentes con la implantación, demuestran que la infección causa la reabsorción fetal. Llamativamente, se demostró que este efecto no era causado por la actividad del virus en sí, sino por la respuesta inmune contra este. Incluso más, se demostró que es la respuesta inmune fetal la que causa la reabsorción, ya que si los ratones son deficientes en la liberación de IFNs de tipo I, estos tienen mayor viremia, pero la tasa de reabsorción es menor (Yockey et al., 2018).

5.6 Comentarios finales

En este estudio demostramos por primera vez que VS aumenta la memoria celular T inducida por una vacunación intravaginal contra un patógeno de transmisión sexual. Nuestras observaciones sugieren que el efecto adyuvante mediado por VS puede estar relacionado con su capacidad de inducir una respuesta inflamatoria temprana en el tracto genital femenino y en los ganglios que lo drenan, proveyendo un ambiente adecuado para inducir una respuesta protectora mediada por células Th1 y T CD8⁺.

Nuestros resultados plantean algunas preguntas: ¿Podría un efecto protector similar ser inducido por otro patógeno de transmisión sexual? ¿Podrían mecanismos similares ser inducidos en mujeres que tienen relaciones sexuales sin protección? Experimentos que contesten estas preguntas podrían conducir a una mejor comprensión de la respuesta inmune contra patógenos de transmisión sexual que permitan aportar una base más racional para el desarrollo de vacunas efectivas en mucosas.

PERSPECTIVAS

En función de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, hemos planteado otras preguntas que continúen indagando el rol del semen en la transmisión sexual de un patógeno. Primeramente, avanzaremos en identificar el/los componente/s presente/s en el fluido de las vesículas seminales (VS) responsable/s de ejercer un efecto adyuvante sobre la respuesta T de memoria protectora anti-herpética, específicamente sobre las células T residentes de memoria. Con tal fin evaluaremos agentes inmunomoduladores presentes en altas concentraciones en el semen: prostaglandina E2 (PGE2) y TGF- β . Además intentaremos validar la acción ejercida por el VS sobre la respuesta inmune de memoria anti-herpética empleando semen completo.

Otro objetivo que nos planteamos es expandir este efecto a otros patógenos, Particularmente, evaluaremos la capacidad de VS de ejercer un efecto adyuvante sobre la respuesta inmune adaptativa anti-HIV. Para ello emplearemos un virus vaccinia recombinante (Vaccinia Reserve, VacV) que codifica para antígenos del gen de la envoltura del HIV-1 (VacV HIV-1 EnvIIIB).

En último lugar, nos proponemos evaluar la respuesta inmune dirigida contra Ag sexuales utilizando modelos murinos que nos permitan identificar las células específicas para aloantígenos paternos. Así evaluaremos como la inmunización con HSV-2 inactivado en presencia de VS, afecta la respuesta específica contra los aloantígenos paternos, y si este efecto puede resultar perjudicial para la fertilidad.

REFERENCIAS

- Aitken, R.J., West, K., y Buckingham, D. (1994). Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 15, 343-352.
- Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., y Betz, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5, 266-271.
- Allen, R.D., y Roberts, T.K. (1986). The relationship between the immunosuppressive and cytotoxic effects of human seminal plasma. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 11, 59-64.
- Anderson, D.J., y Tarter, T.H. (1982). Immunosuppressive effects of mouse seminal plasma components in vivo and in vitro. *J Immunol* 128, 535-539.
- Anderson, R.A., Jr., Oswald, C., Willis, B.R., y Zaneveld, L.J. (1983). Relationship between semen characteristics and fertility in electroejaculated mice. *J Reprod Fertil* 68, 1-7.
- Andersson, M.L., y Eggen, R.I. (2006). Transcription of the fish Latent TGFbeta-binding protein gene is controlled by estrogen receptor alpha. *Toxicol In Vitro* 20, 417-425.
- Arruvito, L., Sanz, M., Banham, A.H., y Fainboim, L. (2007). Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol* 178, 2572-2578.
- Ashkar, A.A., y Rosenthal, K.L. (2003). Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol* 77, 10168-10171.
- Ashley, R.L., Corey, L., Dalessio, J., Wilson, P., Remington, M., Barnum, G., y Trethewey, P. (1994). Protein-specific cervical antibody responses to primary genital herpes simplex virus type 2 infections. *J Infect Dis* 170, 20-26.
- Austin, C.R. (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B* 4, 581-596.
- Bardel, E., Doucet-Ladeveze, R., Mathieu, C., Harandi, A.M., Dubois, B., y Kaiserlian, D. (2016). Intradermal immunisation using the TLR3-ligand Poly (I:C) as adjuvant induces mucosal antibody responses and protects against genital HSV-2 infection. *NPJ vaccines* 1, 16010.
- Belshe, R.B., Leone, P.A., Bernstein, D.I., Wald, A., Levin, M.J., Stapleton, J.T., Gorfinkel, I., Morrow, R.L., Ewell, M.G., Stokes-Riner, A., *et al.* (2012). Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med* 366, 34-43.
- Berlier, W., Cremel, M., Hamzeh, H., Levy, R., Lucht, F., Bourlet, T., Pozzetto, B., y Delezay, O. (2006). Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. *Hum Reprod* 21, 1135-1142.
- Beura, L.K., Mitchell, J.S., Thompson, E.A., Schenkel, J.M., Mohammed, J., Wijeyesinghe, S., Fonseca, R., Burbach, B.J., Hickman, H.D., Vezys, V., *et al.* (2018). Intravital mucosal imaging of CD8(+) resident memory T cells shows tissue-autonomous recall responses that amplify secondary memory. *Nat Immunol* 19, 173-182.
- Bochud, P.Y., Magaret, A.S., Koelle, D.M., Aderem, A., y Wald, A. (2007). Polymorphisms in TLR2 are associated with increased viral shedding and lesion rate in patients with genital herpes simplex virus Type 2 infection. *J Infect Dis* 196, 505-509.

Bouhlal, H., y Kaveri, S. (2012). Multi-faceted role of naturally occurring autoantibodies in fighting pathogens. *Adv Exp Med Biol* 750, 100-113.

Boukhalova, M., McKay, J., Mbaye, A., Sanford-Crane, H., Blanco, J.C., Huber, A., y Herold, B.C. (2015). Efficacy of the Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) Glycoprotein D/AS04 Vaccine against Genital HSV-2 and HSV-1 Infection and Disease in the Cotton Rat *Sigmodon hispidus* Model. *J Virol* 89, 9825-9840.

Bouvet, J.P., Gresenguet, G., y Belec, L. (1997). Vaginal pH neutralization by semen as a cofactor of HIV transmission. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 3, 19-23.

Bursch, L.S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D.H., y Hogquist, K.A. (2007). Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 204, 3147-3156.

Cairns, T.M., Huang, Z.Y., Whitbeck, J.C., Ponce de Leon, M., Lou, H., Wald, A., Krummenacher, C., Eisenberg, R.J., y Cohen, G.H. (2014). Dissection of the antibody response against herpes simplex virus glycoproteins in naturally infected humans. *J Virol* 88, 12612-12622.

Carvalho-Gaspar, M., Jones, N.D., Luo, S., Martin, L., Brook, M.O., y Wood, K.J. (2008). Location and time-dependent control of rejection by regulatory T cells culminates in a failure to generate memory T cells. *J Immunol* 180, 6640-6648.

CDC (2018). Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2017. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services

Ceballos, A., Remes Lenicov, F., Sabatte, J., Rodriguez Rodrigues, C., Cabrini, M., Jancic, C., Raiden, S., Donaldson, M., Agustin Pasqualini, R., Jr., Marin-Briggiler, C., *et al.* (2009). Spermatozoa capture HIV-1 through heparan sulfate and efficiently transmit the virus to dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 206, 2717-2733.

Clark, D.A., Fernandes, J., y Banwatt, D. (2008). Prevention of spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model by intravaginal TGF-beta and local recruitment of CD4+8+ FOXP3+ cells. *Am J Reprod Immunol* 59, 525-534.

Corey, L., Wald, A., Celum, C.L., y Quinn, T.C. (2004). The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 35, 435-445.

Cornwall, G.A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 15, 213-227.

Crawford, G., Ray, A., Gudi, A., Shah, A., y Homburg, R. (2015). The role of seminal plasma for improved outcomes during in vitro fertilization treatment: review of the literature and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 21, 275-284.

Cuburu, N., Wang, K., Goodman, K.N., Pang, Y.Y., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Cohen, J.I., y Schiller, J.T. (2015). Topical herpes simplex virus 2 (HSV-2) vaccination with human papillomavirus vectors expressing gB/gD ectodomains induces genital-tissue-resident memory CD8+ T cells and reduces genital disease and viral shedding after HSV-2 challenge. *J Virol* 89, 83-96.

Chang, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168, 697-698.

Chentoufi, A.A., Kritzer, E., Yu, D.M., Nesburn, A.B., y Benmohamed, L. (2012). Towards a

rational design of an asymptomatic clinical herpes vaccine: the old, the new, and the unknown. *Clin Dev Immunol* 2012, 187585.

Chiu, Y.H., Macmillan, J.B., y Chen, Z.J. (2009). RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576-591.

Dahl, M., Perin, T.L., Djuricic, S., Rasmussen, M., Ohlsson, J., Buus, S., Lindhard, A., y Hviid, T.V. (2014). Soluble human leukocyte antigen-G in seminal plasma is associated with HLA-G genotype: possible implications for fertility success. *Am J Reprod Immunol* 72, 89-105.

Dasgupta, G., y BenMohamed, L. (2011). Of mice and not humans: how reliable are animal models for evaluation of herpes CD8(+)-T cell-epitopes-based immunotherapeutic vaccine candidates? *Vaccine* 29, 5824-5836.

De Jonge, C. (2005). Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 11, 205-214.

Dekel, N., Gnainsky, Y., Granot, I., Racicot, K., y Mor, G. (2014). The role of inflammation for a successful implantation. *Am J Reprod Immunol* 72, 141-147.

Dekker, G., Robillard, P.Y., y Roberts, C. (2011). The etiology of preeclampsia: the role of the father. *J Reprod Immunol* 89, 126-132.

Doncel, G.F., Joseph, T., y Thurman, A.R. (2011). Role of semen in HIV-1 transmission: inhibitor or facilitator? *Am J Reprod Immunol* 65, 292-301.

Eriksson, K., Bellner, L., Gorander, S., Lowhagen, G.B., Tunback, P., Rydberg, K., y Liljeqvist, J.A. (2004). CD4(+) T-cell responses to herpes simplex virus type 2 (HSV-2) glycoprotein G are type specific and differ in symptomatic and asymptomatic HSV-2-infected individuals. *J Gen Virol* 85, 2139-2147.

Ernerudh, J., Berg, G., y Mjosberg, J. (2011). Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance. *Am J Reprod Immunol* 66 *Suppl* 1, 31-43.

Fernandez-Ruiz, D., Ng, W.Y., Holz, L.E., Ma, J.Z., Zaid, A., Wong, Y.C., Lau, L.S., Mollard, V., Cozijnsen, A., Collins, N., *et al.* (2016). Liver-Resident Memory CD8(+) T Cells Form a Front-Line Defense against Malaria Liver-Stage Infection. *Immunity* 45, 889-902.

Fife, K.H., Warren, T.J., Justus, S.E., Heitman, C.K., y Hs2100275 Study, T. (2008). An international, randomized, double-blind, placebo-controlled, study of valacyclovir for the suppression of herpes simplex virus type 2 genital herpes in newly diagnosed patients. *Sex Transm Dis* 35, 668-673.

Fulton, R.B., Meyerholz, D.K., y Varga, S.M. (2010). Foxp3+ CD4 regulatory T cells limit pulmonary immunopathology by modulating the CD8 T cell response during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 185, 2382-2392.

Fung, K.Y., Glode, L.M., Green, S., y Duncan, M.W. (2004). A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. *Prostate* 61, 171-181.

Gadjeva, M., Paludan, S.R., Thiel, S., Slavov, V., Ruseva, M., Eriksson, K., Lowhagen, G.B., Shi, L., Takahashi, K., Ezekowitz, A., *et al.* (2004). Mannan-binding lectin modulates the response to HSV-2 infection. *Clin Exp Immunol* 138, 304-311.

Gershon, A.A. (2011). Neonatal herpes simplex infection and the Three Musketeers. *N Engl J Med* 365, 1338-1339.

Gilbert, M., Li, X., Petric, M., Krajden, M., Isaac-Renton, J.L., Ogilvie, G., y Rekart, M.L. (2011). Using centralized laboratory data to monitor trends in herpes simplex virus type 1 and 2 infection in British Columbia and the changing etiology of genital herpes. *Can J Public Health* 102, 225-229.

Gnainsky, Y., Granot, I., Aldo, P.B., Barash, A., Or, Y., Schechtman, E., Mor, G., y Dekel, N. (2010). Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertil Steril* 94, 2030-2036.

Gorelik, L., y Flavell, R.A. (2002). Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2, 46-53.

Gottlieb, S.L., y Johnston, C. (2017). Future prospects for new vaccines against sexually transmitted infections. *Current opinion in infectious diseases* 30, 77-86.

Graham, J.B., Da Costa, A., y Lund, J.M. (2014). Regulatory T cells shape the resident memory T cell response to virus infection in the tissues. *J Immunol* 192, 683-690.

Granot, I., Gnainsky, Y., y Dekel, N. (2012). Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. *Reproduction* 144, 661-668.

Grunewald, S., Paasch, U., Glander, H.J., y Anderegg, U. (2005). Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 37, 69-71.

Guerin, L.R., Moldenhauer, L.M., Prins, J.R., Bromfield, J.J., Hayball, J.D., y Robertson, S.A. (2011). Seminal fluid regulates accumulation of FOXP3+ regulatory T cells in the preimplantation mouse uterus through expanding the FOXP3+ cell pool and CCL19-mediated recruitment. *Biol Reprod* 85, 397-408.

Halford, W.P., Geltz, J., Messer, R.J., y Hasenkrug, K.J. (2015). Antibodies Are Required for Complete Vaccine-Induced Protection against Herpes Simplex Virus 2. *PloS one* 10, e0145228.

Higgs, G.A., Moncada, S., Salmon, J.A., y Seager, K. (1983). The source of thromboxane and prostaglandins in experimental inflammation. *Br J Pharmacol* 79, 863-868.

Horton, E.W., y Thompson, C.J. (1964). Thin-Layer Chromatography and Bioassay of Prostaglandins in Extracts of Semen and Tissues of the Male Reproductive Tract. *Br J Pharmacol Chemother* 22, 183-188.

Hyman, R.W., Fukushima, M., Jiang, H., Fung, E., Rand, L., Johnson, B., Vo, K.C., Caughey, A.B., Hilton, J.F., Davis, R.W., *et al.* (2014). Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reproductive sciences* 21, 32-40.

Iijima, N., y Iwasaki, A. (2014). T cell memory. A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. *Science* 346, 93-98.

Iijima, N., Mattei, L.M., y Iwasaki, A. (2011). Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 284-289.

Iijima, N., Thompson, J.M., y Iwasaki, A. (2008). Dendritic cells and macrophages in the genitourinary tract. *Mucosal Immunol* 1, 451-459.

Iwasaki, A. (2007). Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 25, 381-418.

Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., y Schoenberger, S.P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.

Johanisson, E., Campana, A., Luthi, R., y de Agostini, A. (2000). Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. *Hum Reprod Update* 6, 404-412.

Juyena, N.S., y Stelletta, C. (2012). Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J Androl* 33, 536-551.

Kahn, D.A., y Baltimore, D. (2010). Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T

- regulatory cell response that contributes to tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9299-9304.
- Kaufmann, J.K., y Flechtner, J.B. (2016). Evolution of rational vaccine designs for genital herpes immunotherapy. *Current opinion in virology* 17, 80-86.
- Kaushic, C., Ashkar, A.A., Reid, L.A., y Rosenthal, K.L. (2003). Progesterone increases susceptibility and decreases immune responses to genital herpes infection. *J Virol* 77, 4558-4565.
- Kelly, R.W. (1999). Immunomodulators in human seminal plasma: a vital protection for spermatozoa in the presence of infection? *Int J Androl* 22, 2-12.
- Kelly, R.W., Carr, G.G., y Critchley, H.O. (1997). A cytokine switch induced by human seminal plasma: an immune modulation with implications for sexually transmitted disease. *Hum Reprod* 12, 677-681.
- Kelly, R.W., Taylor, P.L., Hearn, J.P., Short, R.V., Martin, D.E., y Marston, J.H. (1976). 19-Hydroxyprostaglandin E1 as a major component of the semen of primates. *Nature* 260, 544-545.
- Kempf, C., Jentsch, P., Barre-Sinoussi, F.B., Poirier, B., Morgenthaler, J.J., Morell, A., y Germann, D. (1991). Inactivation of human immunodeficiency virus (HIV) by low pH and pepsin. *J Acquir Immune Defic Syndr* 4, 828-830.
- Kim, K.A., Yolamanova, M., Zirafi, O., Roan, N.R., Staendker, L., Forssmann, W.G., Burgener, A., Dejuq-Rainsford, N., Hahn, B.H., Shaw, G.M., *et al.* (2010). Semen-mediated enhancement of HIV infection is donor-dependent and correlates with the levels of SEVI. *Retrovirology* 7, 55.
- Kindinger, L.M., MacIntyre, D.A., Lee, Y.S., Marchesi, J.R., Smith, A., McDonald, J.A., Terzidou, V., Cook, J.R., Lees, C., Israfil-Bayli, F., *et al.* (2016). Relationship between vaginal microbial dysbiosis, inflammation, and pregnancy outcomes in cervical cerclage. *Science translational medicine* 8, 350ra102.
- Knickelbein, J.E., Khanna, K.M., Yee, M.B., Baty, C.J., Kinchington, P.R., y Hendricks, R.L. (2008). Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science* 322, 268-271.
- Koelle, D.M., y Corey, L. (2008). Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annual review of medicine* 59, 381-395.
- Koelle, D.M., Posavad, C.M., Barnum, G.R., Johnson, M.L., Frank, J.M., y Corey, L. (1998). Clearance of HSV-2 from recurrent genital lesions correlates with infiltration of HSV-specific cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* 101, 1500-1508.
- Kohl, S., Charlebois, E.D., Sigouroudinia, M., Goldbeck, C., Hartog, K., Sekulovich, R.E., Langenberg, A.G., y Burke, R.L. (2000). Limited antibody-dependent cellular cytotoxicity antibody response induced by a herpes simplex virus type 2 subunit vaccine. *J Infect Dis* 181, 335-339.
- Kuno, S., Ueno, R., Hayaishi, O., Nakashima, H., Harada, S., y Yamamoto, N. (1986). Prostaglandin E2, a seminal constituent, facilitates the replication of acquired immune deficiency syndrome virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3487-3490.
- Kwant-Mitchell, A., Ashkar, A.A., y Rosenthal, K.L. (2009). Mucosal innate and adaptive immune responses against herpes simplex virus type 2 in a humanized mouse model. *J Virol* 83, 10664-10676.
- Langenberg, A.G., Corey, L., Ashley, R.L., Leong, W.P., y Straus, S.E. (1999). A prospective study of new infections with herpes simplex virus type 1 and type 2. Chiron HSV Vaccine Study Group. *N Engl J Med* 341, 1432-1438.

Lee, A.J., Chen, B., Chew, M.V., Barra, N.G., Shenouda, M.M., Nham, T., van Rooijen, N., Jordana, M., Mossman, K.L., Schreiber, R.D., *et al.* (2017). Inflammatory monocytes require type I interferon receptor signaling to activate NK cells via IL-18 during a mucosal viral infection. *The Journal of experimental medicine* 214, 1153-1167.

Lee, H.K., Zamora, M., Linehan, M.M., Iijima, N., Gonzalez, D., Haberman, A., y Iwasaki, A. (2009). Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 206, 359-370.

Lekstrom-Himes, J.A., Hohman, P., Warren, T., Wald, A., Nam, J.M., Simonis, T., Corey, L., y Straus, S.E. (1999). Association of major histocompatibility complex determinants with the development of symptomatic and asymptomatic genital herpes simplex virus type 2 infections. *J Infect Dis* 179, 1077-1085.

Liu, T., Khanna, K.M., Chen, X., Fink, D.J., y Hendricks, R.L. (2000). CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *The Journal of experimental medicine* 191, 1459-1466.

Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Looker, K.J., Magaret, A.S., May, M.T., Turner, K.M.E., Vickerman, P., Newman, L.M., y Gottlieb, S.L. (2017). First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection. *The Lancet Global health* 5, e300-e309.

Loras, B., Vetele, F., El Malki, A., Rollet, J., Soufir, J.C., y Benahmed, M. (1999). Seminal transforming growth factor-beta in normal and infertile men. *Hum Reprod* 14, 1534-1539.

Luci, C., Bekri, S., Bihl, F., Pini, J., Bourdely, P., Nouhen, K., Malgogne, A., Walzer, T., Braud, V.M., y Anjuere, F. (2015). NKp46+ Innate Lymphoid Cells Dampen Vaginal CD8 T Cell Responses following Local Immunization with a Cholera Toxin-Based Vaccine. *PloS one* 10, e0143224.

Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., y Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 198, 513-520.

Lund, J.M., Hsing, L., Pham, T.T., y Rudensky, A.Y. (2008). Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 320, 1220-1224.

Lund, J.M., Linehan, M.M., Iijima, N., y Iwasaki, A. (2006). Cutting Edge: Plasmacytoid dendritic cells provide innate immune protection against mucosal viral infection in situ. *J Immunol* 177, 7510-7514.

Ma, B., Forney, L.J., y Ravel, J. (2012). Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annual review of microbiology* 66, 371-389.

Mackay, L.K., Rahimpour, A., Ma, J.Z., Collins, N., Stock, A.T., Hafon, M.L., Vega-Ramos, J., Lauzurica, P., Mueller, S.N., Stefanovic, T., *et al.* (2013). The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol* 14, 1294-1301.

Martellini, J.A., Cole, A.L., Venkataraman, N., Quinn, G.A., Svoboda, P., Gangrade, B.K., Pohl, J., Sorensen, O.E., y Cole, A.M. (2009). Cationic polypeptides contribute to the anti-HIV-1 activity of human seminal plasma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 3609-3618.

Masters, W.H., y Johnson, V.E. (1961). The physiology of the vaginal reproductive function. *Western journal of surgery, obstetrics, and gynecology* 69, 105-120.

McQuillan, G., Kruszon-Moran, D., Flagg, E.W., y Paulose-Ram, R. (2018). Prevalence of

Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in Persons Aged 14-49: United States, 2015-2016. NCHS data brief, 1-8.

Mettenleiter, T.C. (2003). Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res* 92, 197-206.

Miller, D., Brinkworth, M., y Iles, D. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139, 287-301.

Milligan, G.N. (1999). Neutrophils aid in protection of the vaginal mucosae of immune mice against challenge with herpes simplex virus type 2. *J Virol* 73, 6380-6386.

Monavari, S.H., Vaziri, M.S., Khalili, M., Shamsi-Shahrabadi, M., Keyvani, H., Mollaei, H., y Fazlalipour, M. (2013). Asymptomatic seminal infection of herpes simplex virus: impact on male infertility. *J Biomed Res* 27, 56-61.

Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J., y Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87, 427-436.

Morello, C.S., Kraynyak, K.A., Levinson, M.S., Chen, Z., Lee, K.F., y Spector, D.H. (2012). Inactivated HSV-2 in MPL/alum adjuvant provides nearly complete protection against genital infection and shedding following long term challenge and rechallenge. *Vaccine* 30, 6541-6550.

Morrison, L.A., Da Costa, X.J., y Knipe, D.M. (1998). Influence of mucosal and parenteral immunization with a replication-defective mutant of HSV-2 on immune responses and protection from genital challenge. *Virology* 243, 178-187.

Mselle, T.F., Meadows, S.K., Eriksson, M., Smith, J.M., Shen, L., Wira, C.R., y Sentman, C.L. (2007). Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract. *Clinical immunology* 124, 69-76.

Mueller, S.N., y Mackay, L.K. (2016). Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol* 16, 79-89.

Muller, J.A., Harms, M., Kruger, F., Gross, R., Joas, S., Hayn, M., Dietz, A.N., Lippold, S., von Einem, J., Schubert, A., *et al.* (2018). Semen inhibits Zika virus infection of cells and tissues from the anogenital region. *Nature communications* 9, 2207.

Munch, J., Rucker, E., Standker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., *et al.* (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 131, 1059-1071.

Munoz-Suano, A., Hamilton, A.B., y Betz, A.G. (2011). Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev* 241, 20-38.

Murphy, K.M., y Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-944.

Muruve, D.A., Petrilli, V., Zaiss, A.K., White, L.R., Clark, S.A., Ross, P.J., Parks, R.J., y Tschopp, J. (2008). The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452, 103-107.

Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C., y Iwasaki, A. (2009). CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* 462, 510-513.

Narvekar, S.A., Gupta, N., Shetty, N., Kottur, A., Srinivas, M., y Rao, K.A. (2010). Does local endometrial injury in the nontransfer cycle improve the IVF-ET outcome in the subsequent cycle in patients with previous unsuccessful IVF? A randomized controlled pilot study. *Journal of human reproductive sciences* 3, 15-19.

Nishimura, H., Yajima, T., Kagimoto, Y., Ohata, M., Watase, T., Kishihara, K., Goshima, F., Nishiyama, Y., y Yoshikai, Y. (2004). Intraepithelial gammadelta T cells may bridge a gap between innate immunity and acquired immunity to herpes simplex virus type 2. *J Virol* 78, 4927-4930.

Orange, J.S. (2006). Human natural killer cell deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6, 399-409.

Owen, D.H., y Katz, D.F. (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J Androl* 26, 459-469.

Pallier, C., Tebourbi, L., Chopineau-Proust, S., Schoevaert, D., Nordmann, P., Testart, J., y Courtot, A.M. (2002). Herpesvirus, cytomegalovirus, human sperm and assisted fertilization. *Hum Reprod* 17, 1281-1287.

Pandiyani, P., Conti, H.R., Zheng, L., Peterson, A.C., Mathern, D.R., Hernandez-Santos, N., Edgerton, M., Gaffen, S.L., y Lenardo, M.J. (2011). CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity* 34, 422-434.

Pandya, I.J., y Cohen, J. (1985). The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. *Fertil Steril* 43, 417-421.

Patel, S., Hazrati, E., Cheshenko, N., Galen, B., Yang, H., Guzman, E., Wang, R., Herold, B.C., y Keller, M.J. (2007). Seminal plasma reduces the effectiveness of topical polyanionic microbicides. *J Infect Dis* 196, 1394-1402.

Petro, C., Gonzalez, P.A., Cheshenko, N., Jandl, T., Khajouejinejad, N., Benard, A., Sengupta, M., Herold, B.C., y Jacobs, W.R. (2015). Herpes simplex type 2 virus deleted in glycoprotein D protects against vaginal, skin and neural disease. *eLife* 4.

Phipps, W., Saracino, M., Magaret, A., Selke, S., Remington, M., Huang, M.L., Warren, T., Casper, C., Corey, L., y Wald, A. (2011). Persistent genital herpes simplex virus-2 shedding years following the first clinical episode. *J Infect Dis* 203, 180-187.

Pilch, B., y Mann, M. (2006). Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol* 7, R40.

Pizzolla, A., Nguyen, T.H., Sant, S., Jaffar, J., Loudovaris, T., Mannering, S.I., Thomas, P.G., Westall, G.P., Kedzierska, K., y Wakim, L.M. (2018). Influenza-specific lung-resident memory T cells are proliferative and polyfunctional and maintain diverse TCR profiles. *The Journal of clinical investigation* 128, 721-733.

Pizzolla, A., y Wakim, L.M. (2019). Memory T Cell Dynamics in the Lung during Influenza Virus Infection. *J Immunol* 202, 374-381.

Platt, R.J., Khodai, T., Townend, T.J., Bright, H.H., Cockle, P., Perez-Tosar, L., Webster, R., Champion, B., Hickling, T.P., y Mirza, F. (2013). CD8+ T Lymphocyte Epitopes From The Herpes Simplex Virus Type 2 ICP27, VP22 and VP13/14 Proteins To Facilitate Vaccine Design And Characterization. *Cells* 2, 19-42.

Politch, J.A., Mayer, K.H., y Anderson, D.J. (2009). Depletion of CD4+ T cells in semen during HIV infection and their restoration following antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 50, 283-289.

Politch, J.A., Tucker, L., Bowman, F.P., y Anderson, D.J. (2007). Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod* 22, 2928-2935.

Potdar, N., Gelbaya, T., y Nardo, L.G. (2012). Endometrial injury to overcome recurrent embryo

implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online* 25, 561-571.

Quayle, A.J., Kelly, R.W., Hargreave, T.B., y James, K. (1989). Immunosuppression by seminal prostaglandins. *Clin Exp Immunol* 75, 387-391.

Raziel, A., Schachter, M., Strassburger, D., Bern, O., Ron-El, R., y Friedler, S. (2007). Favorable influence of local injury to the endometrium in intracytoplasmic sperm injection patients with high-order implantation failure. *Fertil Steril* 87, 198-201.

Remes Lenicov, F., Paletta, A.L., Gonzalez Prinz, M., Varese, A., Pavillet, C.E., Lopez Malizia, A., Sabatte, J., Geffner, J.R., y Ceballos, A. (2018). Prostaglandin E2 Antagonizes TGF-beta Actions During the Differentiation of Monocytes Into Dendritic Cells. *Frontiers in immunology* 9, 1441.

Remes Lenicov, F., Rodriguez Rodrigues, C., Sabatte, J., Cabrini, M., Jancic, C., Ostrowski, M., Merlotti, A., Gonzalez, H., Alonso, A., Pasqualini, R.A., *et al.* (2012). Semen promotes the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 189, 4777-4786.

Robertson, S.A., Care, A.S., y Moldenhauer, L.M. (2018). Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *The Journal of clinical investigation* 128, 4224-4235.

Robertson, S.A., Guerin, L.R., Bromfield, J.J., Branson, K.M., Ahlstrom, A.C., y Care, A.S. (2009a). Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biol Reprod* 80, 1036-1045.

Robertson, S.A., Guerin, L.R., Moldenhauer, L.M., y Hayball, J.D. (2009b). Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy - the contribution of seminal fluid. *J Reprod Immunol* 83, 109-116.

Robertson, S.A., Ingman, W.V., O'Leary, S., Sharkey, D.J., y Tremellen, K.P. (2002). Transforming growth factor beta--a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol* 57, 109-128.

Robertson, S.A., Mau, V.J., Tremellen, K.P., y Seamark, R.F. (1996). Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice. *J Reprod Fertil* 107, 265-277.

Robertson, S.A., O'Leary, S., y Armstrong, D.T. (2006). Influence of semen on inflammatory modulators of embryo implantation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 62, 231-245.

Robertson, S.A., Prins, J.R., Sharkey, D.J., y Moldenhauer, L.M. (2013). Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am J Reprod Immunol* 69, 315-330.

Rodriguez-Martinez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., y Calvete, J.J. (2011). Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol* 66 *Suppl* 1, 11-22.

Roizman, B., y Taddeo, B. (2007). The strategy of herpes simplex virus replication and takeover of the host cell. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge).

Ronquist, G., y Nilsson, B.O. (2004). The Janus-faced nature of prostasomes: their pluripotency favours the normal reproductive process and malignant prostate growth. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 7, 21-31.

Ruckwardt, T.J., Bonaparte, K.L., Nason, M.C., y Graham, B.S. (2009). Regulatory T cells promote early influx of CD8+ T cells in the lungs of respiratory syncytial virus-infected mice and diminish immunodominance disparities. *J Virol* 83, 3019-3028.

Sabatte, J., Ceballos, A., Raiden, S., Vermeulen, M., Nahmod, K., Maggini, J., Salamone, G., Salomon, H., Amigorena, S., y Geffner, J. (2007). Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4+ T cells mediated by DC-SIGN. *J Virol* 81, 13723-13734.

Sabatte, J., Remes Lenicov, F., Cabrini, M., Rodriguez Rodrigues, C., Ostrowski, M., Ceballos, A., Amigorena, S., y Geffner, J. (2011). The role of semen in sexual transmission of HIV: beyond a carrier for virus particles. *Microbes and infection* 13, 977-982.

Saftlas, A.F., Rubenstein, L., Prater, K., Harland, K.K., Field, E., y Triche, E.W. (2014). Cumulative exposure to paternal seminal fluid prior to conception and subsequent risk of preeclampsia. *J Reprod Immunol* 101-102, 104-110.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., y Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787.

Schenkel, J.M., Fraser, K.A., Beura, L.K., Pauken, K.E., Vezys, V., y Masopust, D. (2014). T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science* 346, 98-101.

Schiffer, J.T., y Corey, L. (2013). Rapid host immune response and viral dynamics in herpes simplex virus-2 infection. *Nat Med* 19, 280-290.

Schiffer, J.T., Swan, D.A., Roychoudhury, P., Lund, J.M., Prlic, M., Zhu, J., Wald, A., y Corey, L. (2018). A Fixed Spatial Structure of CD8(+) T Cells in Tissue during Chronic HSV-2 Infection. *J Immunol* 201, 1522-1535.

Schjenken, J.E., Glynn, D.J., Sharkey, D.J., y Robertson, S.A. (2015). TLR4 Signaling Is a Major Mediator of the Female Tract Response to Seminal Fluid in Mice. *Biol Reprod* 93, 68.

Seppanen, M., Lokki, M.L., Lappalainen, M., Hiltunen-Back, E., Rovio, A.T., Kares, S., Hurme, M., y Aittoniemi, J. (2009). Mannose-binding lectin 2 gene polymorphism in recurrent herpes simplex virus 2 infection. *Hum Immunol* 70, 218-221.

Sharkey, D.J., Macpherson, A.M., Tremellen, K.P., Mottershead, D.G., Gilchrist, R.B., y Robertson, S.A. (2012a). TGF-beta mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells. *J Immunol* 189, 1024-1035.

Sharkey, D.J., Macpherson, A.M., Tremellen, K.P., y Robertson, S.A. (2007). Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Molecular human reproduction* 13, 491-501.

Sharkey, D.J., Tremellen, K.P., Jasper, M.J., Gemzell-Danielsson, K., y Robertson, S.A. (2012b). Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. *J Immunol* 188, 2445-2454.

Sherman, J.K., y Morgan, P.N. (1989). Effect of human semen on herpes-simplex virus-2. *Fertil Steril* 51, 186-189.

Shima, T., Sasaki, Y., Itoh, M., Nakashima, A., Ishii, N., Sugamura, K., y Saito, S. (2010). Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *J Reprod Immunol* 85, 121-129.

Shin, H., y Iwasaki, A. (2012). A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* 491, 463-467.

Singh, R., Kumar, A., Creery, W.D., Ruben, M., Giulivi, A., y Diaz-Mitoma, F. (2003). Dysregulated expression of IFN-gamma and IL-10 and impaired IFN-gamma-mediated responses at different disease stages in patients with genital herpes simplex virus-2 infection. *Clin Exp Immunol* 133, 97-107.

Skibinski, G., Kelly, R.W., Harrison, C.M., McMillan, L.A., y James, K. (1992). Relative immunosuppressive activity of human seminal prostaglandins. *J Reprod Immunol* 22, 185-195.

Soerens, A.G., Da Costa, A., y Lund, J.M. (2016). Regulatory T cells are essential to promote proper CD4 T-cell priming upon mucosal infection. *Mucosal Immunol* 9, 1395-1406.

Sperling, R.S., Fife, K.H., Warren, T.J., Dix, L.P., y Brennan, C.A. (2008). The effect of daily valacyclovir suppression on herpes simplex virus type 2 viral shedding in HSV-2 seropositive subjects without a history of genital herpes. *Sex Transm Dis* 35, 286-290.

Steinert, E.M., Schenkel, J.M., Fraser, K.A., Beura, L.K., Manlove, L.S., Igyarto, B.Z., Southern, P.J., y Masopust, D. (2015). Quantifying Memory CD8 T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance. *Cell* 161, 737-749.

Stites, D.P., y Erickson, R.P. (1975). Suppressive effect of seminal plasma on lymphocyte activation. *Nature* 253, 727-729.

Straus, S.E., Corey, L., Burke, R.L., Savarese, B., Barnum, G., Krause, P.R., Kost, R.G., Meier, J.L., Sekulovich, R., Adair, S.F., *et al.* (1994). Placebo-controlled trial of vaccination with recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 for immunotherapy of genital herpes. *Lancet* 343, 1460-1463.

Sung, J.H., Zhang, H., Moseman, E.A., Alvarez, D., Iannacone, M., Henrickson, S.E., de la Torre, J.C., Groom, J.R., Luster, A.D., y von Andrian, U.H. (2012). Chemokine guidance of central memory T cells is critical for antiviral recall responses in lymph nodes. *Cell* 150, 1249-1263.

Svensson, A., Nordstrom, I., Sun, J.B., y Eriksson, K. (2005). Protective immunity to genital herpes simplex [correction of simpex] virus type 2 infection is mediated by T-bet. *J Immunol* 174, 6266-6273.

Svensson, A., Tunback, P., Nordstrom, I., Shestakov, A., Padyukov, L., y Eriksson, K. (2012). STAT4 regulates antiviral gamma interferon responses and recurrent disease during herpes simplex virus 2 infection. *J Virol* 86, 9409-9415.

Tarter, T.H., Cunningham-Rundles, S., y Koide, S.S. (1986). Suppression of natural killer cell activity by human seminal plasma in vitro: identification of 19-OH-PGE as the suppressor factor. *J Immunol* 136, 2862-2867.

Taylor, P.L., y Kelly, R.W. (1974). 19-Hydroxylated E prostaglandins as the major prostaglandins of human semen. *Nature* 250, 665-667.

Taylor, P.L., y Kelly, R.W. (1975). The occurrence of 19-hydroxy F prostaglandins in human semen. *FEBS Lett* 57, 22-25.

Templeton, A.A., Cooper, I., y Kelly, R.W. (1978). Prostaglandin concentrations in the semen of fertile men. *J Reprod Fertil* 52, 147-150.

Thapa, M., Kuziel, W.A., y Carr, D.J. (2007). Susceptibility of CCR5-deficient mice to genital herpes simplex virus type 2 is linked to NK cell mobilization. *J Virol* 81, 3704-3713.

Thompson, L.A., Barratt, C.L., Bolton, A.E., y Cooke, I.D. (1992). The leukocytic reaction of the human uterine cervix. *Am J Reprod Immunol* 28, 85-89.

Tiboni, G.M., Giampietro, F., Gabriele, E., Di Donato, V., y Impicciatore, G.G. (2011). Impact of a single endometrial injury on assisted reproductive technology outcome: a preliminary observational study. *The Journal of reproductive medicine* 56, 504-506.

Tilburgs, T., Roelen, D.L., van der Mast, B.J., de Groot-Swings, G.M., Kleijburg, C., Scherjon, S.A., y Claas, F.H. (2008). Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4+CD25bright

regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J Immunol* **180**, 5737-5745.

Torres, L., Ortiz, T., y Tang, Q. (2015). Enhancement of herpes simplex virus (HSV) infection by seminal plasma and semen amyloids implicates a new target for the prevention of HSV infection. *Viruses* **7**, 2057-2073.

Triche, E.W., Harland, K.K., Field, E.H., Rubenstein, L.M., y Saftlas, A.F. (2014). Maternal-fetal HLA sharing and preeclampsia: variation in effects by seminal fluid exposure in a case-control study of nulliparous women in Iowa. *J Reprod Immunol* **101-102**, 111-119.

Van Sinderen, M., Menkhorst, E., Winship, A., Cuman, C., y Dimitriadis, E. (2013). Preimplantation human blastocyst-endometrial interactions: the role of inflammatory mediators. *Am J Reprod Immunol* **69**, 427-440.

Wald, A., Matson, P., Ryncarz, A., y Corey, L. (1999). Detection of herpes simplex virus DNA in semen of men with genital HSV-2 infection. *Sex Transm Dis* **26**, 1-3.

Welch, J.L., Kaddour, H., Schlievert, P.M., Stapleton, J.T., y Okeoma, C.M. (2018). Semen exosomes promote transcriptional silencing of HIV-1 by disrupting NF- κ B/Sp1/Tat circuitry. *J Virol*.

Wijesundara, D.K., Ranasinghe, C., Grubor-Bauk, B., y Gowans, E.J. (2017). Emerging Targets for Developing T Cell-Mediated Vaccines for Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1. *Frontiers in microbiology* **8**, 2091.

Williams, M.A., y Bevan, M.J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* **25**, 171-192.

Wira, C.R., Rodriguez-Garcia, M., y Patel, M.V. (2015). The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol* **15**, 217-230.

Wolff, H. (1995). The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* **63**, 1143-1157.

Wolters-Everhardt, E., Dony, J.M., Lemmens, W.A., Doesburg, W.H., y De Pont, J.J. (1986). Buffering capacity of human semen. *Fertil Steril* **46**, 114-119.

Xu, F., Sternberg, M.R., Kottiri, B.J., McQuillan, G.M., Lee, F.K., Nahmias, A.J., Berman, S.M., y Markowitz, L.E. (2006). Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *Jama* **296**, 964-973.

Yang, C., Guo, W.B., Zhang, W.S., Bian, J., Yang, J.K., Zhou, Q.Z., Chen, M.K., Peng, W., Qi, T., Wang, C.Y., *et al.* (2017). Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma. *Andrology* **5**, 1007-1015.

Yeaman, G.R., Guyre, P.M., Fanger, M.W., Collins, J.E., White, H.D., Rathbun, W., Orndorff, K.A., Gonzalez, J., Stern, J.E., y Wira, C.R. (1997). Unique CD8+ T cell-rich lymphoid aggregates in human uterine endometrium. *Journal of leukocyte biology* **61**, 427-435.

Yockey, L.J., Jurado, K.A., Arora, N., Millet, A., Rakib, T., Milano, K.M., Hastings, A.K., Fikrig, E., Kong, Y., Horvath, T.L., *et al.* (2018). Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Science immunology* **3**.

Zenclussen, A.C., Gerlof, K., Zenclussen, M.L., Sollwedel, A., Bertoja, A.Z., Ritter, T., Kotsch, K., Leber, J., y Volk, H.D. (2005). Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *The American journal of pathology* **166**, 811-822.

Zhao, X., Deak, E., Soderberg, K., Linehan, M., Spezzano, D., Zhu, J., Knipe, D.M., y Iwasaki, A. (2003). Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *The Journal of experimental medicine* 197, 153-162.

Zhou, J.Z., Way, S.S., y Chen, K. (2018). Immunology of the Uterine and Vaginal Mucosae. *Trends in immunology* 39, 302-314.

Zhu, J., Koelle, D.M., Cao, J., Vazquez, J., Huang, M.L., Hladik, F., Wald, A., y Corey, L. (2007). Virus-specific CD8+ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation. *The Journal of experimental medicine* 204, 595-603.