



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

**Proyecto de grado de Licenciatura En Ciencias
Biológicas:**

**Evaluación de la ruta sublingual como
alternativa para vacunación contra
*Streptococcus pneumoniae***

José María Saavedra Ferrari

Orientadora: Dra. Natalia Muñoz Wolf

Co-orientador: Prof. Dr. Alejandro Chabalgoity

Agradecimientos:

A Mamá, Papá, Paco y Abuelos.

A Natalia, Alejandro, Analía y todos los compañeros del departamento.

A los amigos que siempre están.

Índice

Resumen	6
I. Introducción	9
I.1. Superficies mucosas e inmunidad	9
I.1.1. Características generales y organización del SIM	9
I.2. Enfermedades infecciosas del tracto respiratorio: Neumonía Adquirida en la Comunidad	11
I.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
I.3.1	11
Principales características microbiológicas	11
I.3.2 Patogénesis y Epidemiología.	12
I.3.3 Factores de virulencia	13
I.4 Respuesta inmune durante la neumonía neumocócica	21
I.5 Vacunas antineumocócicas	23
I.5.1 Vacunas actuales	23
I.5.2 Desarrollo de vacunas basadas en antígenos proteicos de neumococo	25
I.6 Vacunación mucosa	28
II. Objetivos	33
III. Materiales y métodos	34
III.1. Producción de neumolisina recombinante	34
III. 2. Preparación de los stocks bacterianos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	35
III.3. Inmunización de animales	37
III.4. Evaluación de respuesta de anticuerpos IgG anti neumolisina	39
III. 5. Desafío con <i>Streptococcus pneumoniae</i>	40
III. 6. Análisis por citometría de flujo de poblaciones celulares en ganglios sub mandibulares.	40
III. 7. Evaluación de carga bacteriana en Bazo y Pulmón	41
III.8. Análisis estadístico	41
IV. Resultados	42
IV.1. Vacunación sublingual con PnPs	43
IV.2. Vacunación sublingual con PLYA Δ 146	48
IV.3. Producción de PLYt	49
IV.4. Vacunación sublingual con PLYt	51
V. Discusión	54
VI. Referencias	59
VII. Anexo	69

Resumen

Streptococcus pneumoniae (neumococo) es el principal agente causante de neumonía adquirida en la comunidad, una enfermedad infecciosa del tracto respiratorio responsable de altas tasas de mortalidad y morbilidad principalmente en niños menores de cinco años. Esta bacteria gram positiva presenta una cápsula polisacáridica que constituye el principal determinante antigénico y es además un importante factor de virulencia. Según la composición del polisacárido capsular se distinguen 92 serotipos que varían en su prevalencia según la zona geográfica y edad de la población.

Al presente existen dos tipos de vacunas antineumocócicas ambas formuladas en base a una mezcla de polisacáridos capsulares (PnPs) de los serotipos más prevalentes. Si bien su implementación ha disminuido notoriamente la incidencia de la enfermedad, la situación epidemiológica se encuentra lejos de estar controlada principalmente porque las vacunas formuladas en base a polisacáridos solo confieren protección contra un número limitado de serotipos. Por esta razón, varias proteínas neumocócicas conservadas con potencial inmunoprotector están siendo evaluadas como candidatos para la formulación de vacunas ya que tiene el potencial de conferir protección universal independiente de serotipo.

Por su importancia como factor de virulencia y por su alto grado de conservación en la mayoría de los aislados clínicamente relevantes, la citotoxina hemolítica neumocócica neumolisina (PLY) tiene gran potencial como antígeno para la formulación de vacunas.

Dentro de las estrategias consideradas para el desarrollo de vacunas antineumocócicas, un punto muy importante es la generación de protección a nivel de la mucosa nasofaríngea que representa la puerta de entrada del patógeno. Las respuestas en mucosas son inducidas más eficientemente si la vacuna es administrada por esta misma vía, pero dentro de las diferentes opciones de inoculación mucosa existen importantes variaciones en cuanto al tipo y localización de la respuesta inmune generada. En cuanto al tracto respiratorio, la administración intranasal (i.n.) ha mostrado un amplio potencial, pero también se ha asociado con efectos secundarios neurológicos y ha generado dudas en cuanto a su seguridad por lo que otras alternativas son necesarias.

La ruta de administración sublingual (s.l.), que consiste precisamente en colocar la formulación abajo de la lengua, es una alternativa para la vacunación mucosa contra enfermedades respiratorias y ya existen varios antecedentes preclínicos que

demuestran protección en distintos modelos. Sin embargo, hasta ahora no existen trabajos que hayan evaluado la eficacia de vacunas sublinguales contra neumonía neumocócica invasiva.

Empleando un modelo murino de neumonía neumocócica invasiva, este trabajo muestra que la administración s.l. de PnPs serotipo 1 confiere una protección del 60% frente a un desafío letal con un aislado clínico de neumococo del mismo serotipo. El perfil de la respuesta inmune en animales protegidos mostró un incremento en el porcentaje de linfocitos T productores de interleuquina diecisiete (IL-17) e interferón gama (INF γ) a nivel de ganglios submandibulares, lo que se encuentra en línea con lo establecido anteriormente por nuestro y otros grupos.

Dado que la actividad hemolítica de neumolisina representa un problema para la formulación de vacunas, para evaluar su potencial antigénico se emplearon variantes recombinantes carentes de citotoxicidad. El toxoide recombinante PLYA Δ 146 cuenta con una delección aminoácidica puntual y el toxoide recombinante PLYt se generó mediante inserción de un codón de terminación que hace que la proteína carezca del extremo carboxilo terminal responsable de la toxicidad.

La vacunación s.l. con PLYA Δ 146 no produjo un aumento significativo de los niveles IgG en suero. Sin embargo, la toxina con actividad hemolítica completa si mostró ser inmunogénica y no mostró signos de toxicidad por ruta SL. En cambio, la vacunación con el toxoide PLYt, en mayores dosis, sólo o coadministrado en conjunto con toxina colérica (CT) o flagelina (FliC) como adyuvantes, indujo un aumento significativo del título sérico de IgG específica y protección parcial frente a un desafío letal con *S. pneumoniae*.

En conjunto los resultados obtenidos demuestran que la administración sublingual de dos antígenos de distinta naturaleza, induce una respuesta inmune adaptativa, humoral a nivel sistémico y de linfocitos T en los ganglios drenantes. Además, los estudios preliminares mostraron que la vacunación sublingual es capaz de conferir protección parcial frente a neumonía neumocócica invasiva causada por un aislado clínico de serotipo 1.

Estos resultados constituyen un antecedente único y demuestran el potencial de la ruta de vacunación sublingual para la prevención de infecciones respiratorias en general y de la neumonía neumocócica invasiva en particular.

I. Introducción

I.1. Superficies mucosas e inmunidad

Los epitelios mucosos representan la mayor superficie en contacto directo con el ambiente externo. Se estima que comprenden aproximadamente 400 m² en el ser humano adulto [1]. Cubren las cavidades y canales del cuerpo como los tractos urogenital, digestivo y respiratorio, también el oído interno y la superficie ocular entre otros. Se caracterizan por la presencia de células secretoras de mucus, y aunque su organización varía, todos se presentan como finas capas permeables al interior (o exterior) del cuerpo, compuestos por una superficie delgada de células epiteliales por encima de una capa más profunda de tejido conjuntivo denominado lámina propia. Estas características van de acuerdo con su función fisiológica de intercambio con el medio externo que implican la absorción y secreción de sustancias así como intercambio gaseoso.

Las superficies mucosas también actúan como barrera limitando el acceso de microorganismos y toxinas al medio interno. Además de la barrera física impuesta por los epitelios, las mucosas cuentan con mecanismos inmunes que participan activamente de la defensa frente a la infección. El sistema inmune de mucosas (SIM) representa el 80% de los leucocitos del individuo [2]. Su función es reconocer y captar antígenos microbianos para generar respuestas innatas y adaptativas que impidan la colonización del epitelio e invasión hacia el medio interno. Paralelamente, debe evitar responder frente a sustancias inocuas a las que se encuentra expuesto como las provenientes del alimento, partículas aéreas y organismos comensales. Por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis en las mucosas es un proceso activo que depende de mecanismos capaces de promover tolerancia frente a los antígenos inocuos o microorganismos comensales [3].

I.1.1. Características generales y organización del SIM

El SIM se encuentra funcional y anatómicamente dividido en dos componentes: los tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés *mucosal-*

associated lymphoid tissue) y la lámina propia junto con sus glándulas asociadas [4]. Los MALT son estructuras organizadas que comprenden los sitios inductores del SIM, donde se inician las respuestas específicas de antígeno. El conocimiento del sistema inmune de mucosas deriva principalmente del estudio del sistema inmune del tracto digestivo y en segundo lugar del tracto respiratorio. En base al estudio del sistema inmune de mucosas de estas regiones la capa epitelial de los MALT se ha descrito como un epitelio simple en el que además está presente un conjunto de células especializadas (células M) que captan contenido en la superficie mucosa y lo transportan por transcitosis hacia el interior del tejido linfóide. En el MALT se encuentran todos los tipos de células requeridas para la generación de una respuesta inmune por lo que, en el contexto adecuado, el material transportado por las células M puede ser procesado e iniciar una respuesta adaptativa específica. La lamina propia y los tejidos glandulares asociados comprenden los sitios efectores del SIM, donde se encuentran dispersas las células T y B activadas que median la producción de anticuerpos y la inmunidad celular [4]. La producción de anticuerpos subclase IgA secretoria (sIgA) es uno de los mecanismos más importantes para la defensa de los epitelios mucosos. Debido a la ausencia de células fagocíticas y complemento en el lumen de los tractos mucosos la principal función es la neutralización de toxinas y moléculas de adhesión de patógenos [5]. Además, las células T efectoras distribuidas en los tejidos mucosos refuerzan la función de barrera [6].

Existe una migración constante de linfocitos activados desde los sitios inductores a los sitios efectores. Los linfocitos que son activados en los MALT expresan un conjunto característico de moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas que se unen a ligandos complementarios presentes en superficies y tejidos linfoides mucosos, lo que genera un patrón de recirculación preferencial hacia estos tejidos [7].

Esta migración se da principalmente hacia el propio sitio de inducción y tejidos mucosos adyacentes, pero en algunos casos también a tejidos mucosos distantes. Las respuestas iniciadas en los tejidos linfoides asociados a la mucosa gastrointestinal (GALT, del inglés gastrointestinal-associated lymphoid tissue) confiere inmunidad mayoritariamente en el tracto gastrointestinal. Sin embargo la inducción a nivel del tejido linfóide asociado a la mucosa respiratoria (NALT, del inglés nasal-associated lymphoid tissue) genera inmunidad a nivel de la mucosa respiratoria y glándulas salivales pero también en tracto genital [1].

I.2. Enfermedades infecciosas del tracto respiratorio: Neumonía Adquirida en la Comunidad

Las infecciones del tracto respiratorio bajo constituyen la tercera causa de muerte en el mundo y son las que producen mayor mortalidad dentro de las enfermedades infecciosas [8]. Dentro de las infecciones del tracto respiratorio bajo, la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es una de las más comunes representando cerca del 1% del total de las admisiones en centros de salud [9].

La NAC se define como una infección aguda del tracto respiratorio bajo en pacientes no hospitalizados que afecta específicamente los alvéolos pulmonares causando dificultades respiratorias. [8] [10].

Se conocen muchos agentes etiológicos responsables de neumonía no hospitalaria, tanto virales como bacterianos. Sin embargo la mayoría de los casos son causados por unos pocos patógenos [11] Entre los agentes virales el virus respiratorio sincicial es el más frecuente, pero otros virus como rinovirus, parainfluenza, influenza y adenovirus también son prevalentes [12]. Dentro de los agentes etiológicos bacterianos, *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) es el patógeno detectado más frecuentemente. Otros agentes bacterianos comunes son *Haemophilus influenzae* tipo b, *Staphylococcus aureus* y *Moraxella catarrhalis* [8, 13]

La prevalencia de cada agente varía según la edad, región, esquemas de inmunización, uso de antibióticos, método de diagnóstico, entre otros factores [14].

En general *S. pneumoniae* ha sido identificado como el principal patógeno causante de neumonía, siendo responsable del 1% de los fallecimientos anuales en niños menores de 5 años a nivel mundial [15]. Además es responsable de altas tasas de morbilidad en adultos siendo hallado en entre el 30% [11] [16] y hasta 48 % de los casos de NAC en adultos [17].

I.3. *Streptococcus pneumoniae*

I.3.1 Principales características microbiológicas

S. pneumoniae es un coco Gram positivo capsulado de entre 0,5 y 1,25 μm de diámetro. Posee una forma lanceolada característica y generalmente se encuentra formando

pares o cadenas cortas [18]. Es anaerobio facultativo y exigente desde el punto de vista nutricional. Para producir energía fermenta una variedad de carbohidratos y como no posee catalasa ni peroxidasa es muy sensible a los productos de su metabolismo fermentativo. En cultivo se le proporciona catalasa mediante agregado de eritrocitos para evitar la acumulación de peróxido de hidrógeno que destruye al microorganismo [19]. En agar-sangre crece formando colonias circulares, brillantes y umbilicadas de aproximadamente 1 mm de diámetro. Alrededor de las colonias se produce una zona de coloración verdosa como consecuencia de que poseen una alfa-hemolisina que degrada parcialmente la hemoglobina [19].

I.3.2 Patogénesis y Epidemiología.

Neumococo forma parte de la flora normal de la nasofaringe humana. Los individuos colonizados se denominan portadores y constituyen el reservorio natural de la bacteria. Esta población está constituida principalmente por menores de 5 años entre los cuales se estima que 20-40% del total son portadores. La prevalencia asciende a 40-60% en los niños que concurren a centros de educación inicial. En los adultos sanos se estima que el 10% de los individuos son portadores [20].

La colonización de la nasofaringe es asintomática, en cambio el pasaje del microorganismo y la consecuente generación de inflamación en diferentes partes estériles del organismo resulta en diferentes manifestaciones patológicas y enfermedad. La enfermedad neumocócica se divide en dos grandes categorías: no invasiva e invasiva [21].

La enfermedad no invasiva comprende infecciones confinadas a superficies mucosas, siendo las más comunes la neumonía no bacteriémica, otitis media y sinusitis. La enfermedad invasiva es de mayor gravedad e implica propagación de la infección a tejidos circundantes, particularmente hacia la sangre produciendo bacteriemia. Dentro de las principales manifestaciones invasivas se encuentran la neumonía bacteriémica, la meningitis, septicemia y endocarditis, entre otras [22, 23]

Se considera que en general la enfermedad progresa desde colonización a bacteriemia, con o sin neumonía, y desde la sangre consecuentemente puede acceder a las meninges [24]. Las manifestaciones más comunes son las menos severas, otitis media y neumonía no bacteriémica, mientras que la bacteriemia ocurre en general como una

complicación de la neumonía y solo en la minoría de los casos se produce meningitis [25]. La endocarditis es una complicación grave que usualmente ocurre en adultos mayores con condiciones cardíacas subyacentes y es una importante causa de muerte en esta población [23]

Entre el 15 y 30% de los pacientes con neumonía desarrollan enfermedad invasiva y es más prevalente en poblaciones menores de cinco años, adultos mayores y sujetos HIV positivos [26]. Dentro de las manifestaciones invasivas la neumonía comprende la primera causa de mortalidad infantil y la meningitis la segunda [27, 28].

La variación de la composición estructural de la cápsula polisacáridica (ver siguiente sección) permite clasificar a *S. pneumoniae* en 93 serotipos diferentes. La distribución de los mismos varía según la edad de la población estudiada y las regiones geográficas. Los diferentes serotipos presentan importantes variaciones en su capacidad invasiva y para colonizar la nasofaringe. Estimaciones de diferencias en permanencia nasofaríngea varían entre 5.9 y 19.9 semanas [29, 30]. Aunque un mayor tiempo de colonización aumenta la ventana temporal para causar enfermedad, algunos serotipos son más propensos a causarla en cada episodio de colonización. Por ejemplo, los serotipos 4, 5, 7F y especialmente el 1 son rara vez encontrados en nasofaringe pero son hallados en alta proporción en aislados de enfermedad invasiva [31, 32]. El 80% de los casos de enfermedad invasiva son causados por un grupo limitado de serotipos, y si bien algunos son causantes de todas las manifestaciones de la enfermedad, otros son asociados a presentaciones clínicas particulares [31].

Aunque algunos pocos serotipos son comúnmente encontrados en todo el mundo, en general la prevalencia de cada uno varía con la región geográfica, edad de la población y esquema de inmunización [33].

En Uruguay hasta el año 2009 en niños de entre 0 y 14 años, los serotipos más prevalentes causantes de neumonía neumocócica eran en orden los serotipos 14, 1, 5, 3, 9V, 6B, y 7F. Éstos representaban el 91% de los aislados clínicos [34, 35]. Datos más recientes indican que el serotipo 14 prácticamente había desaparecido del país para el año 2009 luego de la introducción de la vacuna conjugada heptavalente (ver más adelante) y a partir de esto el serotipo 1 se ubica como el más prevalente en niños menores de cinco años [36].

I.3.3 Factores de virulencia

Como todos los patógenos, neumococo presenta una variedad de moléculas de distinta naturaleza, dispuestas sobre la superficie o en el interior de la bacteria que contribuyen a su patogénesis (Fig. 1). A menudo funcionan interaccionando directamente con componentes del huésped pero también funcionan evitando el reconocimiento por parte de los mecanismos inmunes del huésped. En las siguientes secciones se tratarán detalladamente las mas importantes desde el punto de vista

Polisacárido capsular

Como se mencionó anteriormente *S. pneumoniae* está exteriormente recubierto por una cápsula compuesta principalmente por polisacáridos, la cual según su variación antigénica y estructural define más de 93 serotipos de neumococo. Esta cápsula polisacáridica de entre 200 y 400 nm de espesor está unida covalentemente al peptidoglicano de la pared celular y generalmente presenta carga negativa [25].

El polisacárido capsular (PnPs) es considerado el principal determinante de virulencia de la bacteria, variantes no capsuladas presentan virulencia reducida comparadas las capsuladas de la misma cepa [37, 38] y salvo en raras excepciones todos los aislados clínicos presentan cápsula [25].

Se ha demostrado que la cápsula cumple una amplia variedad de funciones críticas para la supervivencia del patógeno. Por un lado forma un escudo que evita que proteínas y otros grupos químicos sean reconocidos por sistema del complemento y anticuerpos inhibiendo la opsonización e interacción con las células fagocíticas (Winkelstein 1981). Además disminuye la expulsión mecánica por las secreciones mucosas y restringe la acción de antibióticos [39].

Junto con muchos otros carbohidratos presentes en la superficie de otros patógenos los polisacáridos de neumococo son considerados antígenos T independiente tipo II. El mecanismo clásico de inducción de inmunidad adaptativa es desencadenado por antígenos que pueden ser nivel del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, del inglés: *Major Histocompatibility Complex*) de clase II, que se refieren casi exclusivamente a los de naturaleza proteica [40, 41]. La respuesta inmune a la mayoría de los PnPs es desencadenada por activación de células B maduras sin participación de linfocitos T, muy probablemente por reconocimiento de su estructura repetitiva por parte de las inmunoglobulinas de superficie de linfocitos B-1 [42]. El resultado es la producción de anticuerpos IgM de baja afinidad, este tipo de activación sin participación de linfocitos T es rápida, pero no resulta en cambio de clase ni maduración de la

afinidad [43]. Estos anticuerpos cumplen un rol fundamental en la respuesta inmune contra *S. pneumoniae* y son capaces de proteger por sí solos frente enfermedad invasiva en un modelo de ratón [44].

Desde hace algunos años está demostrado que algunos antígenos polisacáridicos son capaces de ser presentados a nivel del MHC-II de células presentadoras y activar células T [45]. El factor común entre éstos es la presencia de centros con cargas positivas y negativas dentro de la unidad de repetición, por lo que son denominados zwitterionicos [46]. El PnPs de tipo 1 de neumococo (PnPs-1) pertenece a este grupo y su capacidad de ser presentado en MHC II y activar células T a través de un mecanismo dependiente de óxido nítrico ha sido demostrada [47]. En nuestro laboratorio se han obtenido resultados que apoyan este descubrimiento. La protección frente a un desafío letal por serotipo 1 ofrecida por una infección subletal homóloga siete días antes es mediada no solo por anticuerpos IgM, si no también IgG contra PnPs-1. Además los animales protegidos mostraron diferencias significativas en los porcentajes de células T CD4⁺ productoras de interleuquina 17 (IL-17) con respecto al serotipo 3 que no es zwitterionico y por lo tanto no es presentado en MHC-II [48]. Esta particularidad hace a PnPs-1 un antígeno, muy atractivo dentro del grupo de los antígenos polisacáridicos para investigar mecanismos potenciadores de la inmunidad humoral y celular frente a especialmente en vacunas anti neumocócicas.

Proteínas de superficie

A pesar de que PnPs es considerado el principal factor de virulencia de *S. pneumoniae*, existen proteínas que contribuyen significativamente a la patogénesis durante la enfermedad neumocócica y están involucradas directamente en el proceso de infección.

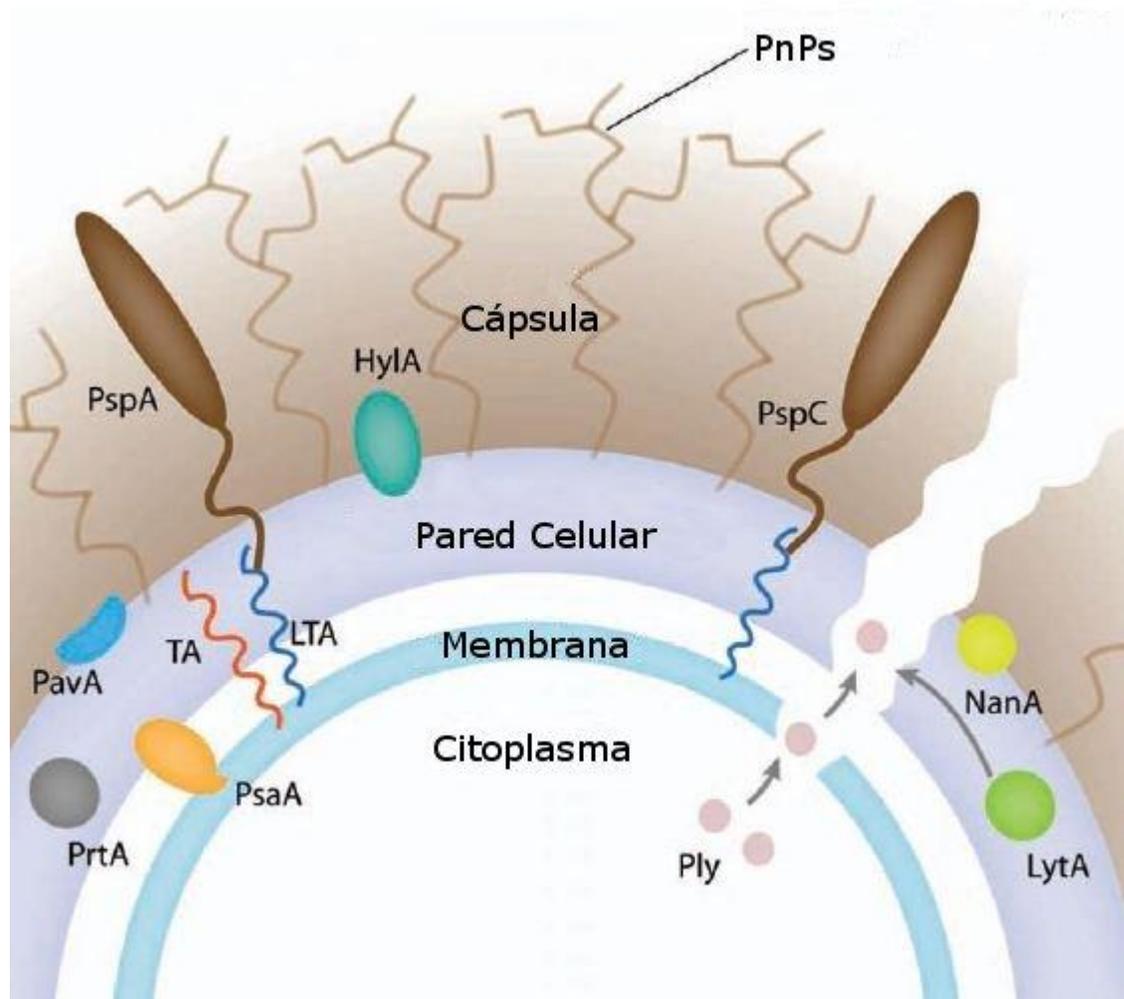


Figura 1. Esquema de *S. pneumoniae* y sus principales factores de virulencia. Se encuentran representados los principales factores de virulencia y su localización. De izquierda a derecha: Serín Proteasa (PrtA), Factor de Virulencia y Adhesión A de neumococco (PavA), Adhesina de Superficie Neumocócica A (PsaA), Proteína de Superficie Neumocócica A (PspA), Hialuronato Liasa (HylA), Polisacárido Capsular (PnPs) Proteína de Superficie Neumocócica C (PspC), Neuroaminidasa A (NanA), Neumolisina (PLY) y Autolisina A (LytA). También se muestran los componentes de la pared celular: Ácido lipoteicoico (LTA) y Ácido teicoico (TA). Tomado y adaptado de Nieto et al. 2013 [49].

Un grupo importante de proteínas de superficie de *S. pneumoniae* son las proteínas de unión a colina (CBP, del inglés: Choline Binding Protein). Éstas son factores virulencia que se unen a residuos de fosforilcolina de la pared celular a través de un motivo conservado de unión a colina [37]. Las mejores caracterizadas hasta el momento son la proteína de superficie neumocócica A (PspA, del inglés: Pneumococcal Surface Protein A), C (PspC, del inglés: Pneumococcal Surface Protein C), también conocida como CbpA (Choline-binding protein A) y SpsA (*Streptococcus pneumoniae* secretory IgA binding protein) y la autolisina A Lyt A (Lytic Amidase).

PspA interfiere con la fijación del componente C3 del complemento sobre la superficie de la bacteria [37] y también la protege de la actividad de la apolactoferrina, una proteína con propiedades bactericidas que forma parte del sistema inmune innato [50].

PspC interacciona con varios componentes del hospedero. Por una parte PspC interacciona con los residuos de ácido siálico de células epiteliales del tracto respiratorio alto lo que favorece la colonización. Adicionalmente, la interacción con receptores de IgA facilita la translocación de la bacteria al medio interno [51, 52]. Por último, la afinidad de PspC por el factor H del hospedero actúa como un mecanismo de evasión evitando la deposición de complemento sobre la superficie de la bacteria [53].

La enzima LytA media la autólisis de la pared celular de neumococo que lleva a la liberación de un importante factor de virulencia proteico denominado neumolisina (ver siguiente sección), así como otros componentes de la bacteria que promueven la respuesta proinflamatoria [54-56].

Neumolisina

Debido a su participación clave en la patogénesis de la enfermedad neumocócica, la endotoxina neumolisina (PLY) es uno de los antígenos proteicos mejor estudiados. Neumolisina es producida por todos los aislados clínicamente relevantes de neumococo [23, 57]. Pertenece a la familia de las citolisinas dependientes de colesterol (CDC), junto con otros numerosos miembros producidos por más de 20 especies bacterianas gram positivas de los géneros *Clostridium*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, y *Arcanobacterium* [58]. En todos los casos funcionan como factores de virulencia.

PLY tiene una longitud de 471 aminoácidos y un peso molecular de 57,2 KDa. Estructuralmente se organiza en cuatro dominios globulares, característica conservada dentro de la familia CDC [37]. Interacciona con el colesterol de manera muy específica a través de varios motivos presentes en sus cuatro dominios [59]. Esta interacción desencadena una compleja secuencia de eventos en donde la proteína sufre importantes cambios conformacionales. En solución acuosa se encuentra principalmente en forma monomérica, mientras que en presencia de colesterol forma dímeros u oligómeros denominados pre-poros [60]. Cuando se encuentra embebida en bicapas lipídicas se ensambla formando estructuras poliméricas en forma de grandes

poros de entre 40 a 50 monómeros y de 35 a 45 nm de diámetro [61]. Esta capacidad de oligomerizar y formar poros sobre membranas eucariotas es responsable de la actividad citolítica de la toxina. Como consecuencia del influjo de moléculas de alto peso molecular hacia el interior de la célula y del desprendimiento de fosfolípidos en estructuras que contienen oligómeros de PLY, se compromete la integridad de la membrana lo que conduce a la lisis celular [62-64].

Los efectos citotóxicos se consideran el principal mecanismo por el que PLY promueve la virulencia de neumococo [63, 65]. Neumolisina disminuye el batido ciliar en el epitelio respiratorio ciliado lo que favorece colonización y diseminación al tracto respiratorio bajo. Los efectos de PLY sobre células epiteliales alveolares y células endoteliales pulmonares provocan disrupción capilar en los alvéolos que favorecen la generación de edema el cual provee de nutrientes a la bacteria y facilita su pasaje al compartimiento sistémico [66, 67].

Estos efectos líticos sobre las células del hospedero son significativos cuando PLY es administrada o generada en cantidades suficientes. Por debajo de este umbral, a concentraciones sublíticas, se han descrito una amplia variedad de actividades biológicas adicionales en general con efectos proinflamatorios patológicos. Las más importantes tienen que ver con los efectos, directos o indirectos, de la proteína sobre receptores y células del sistema inmune. El hospedero reconoce y responde a PLY a través de varios mecanismos siendo uno de los principales blancos de la respuesta inmune contra *S. pneumoniae*. Paradójicamente, casi la totalidad de estos prolongan el estado inflamatorio del tejido pulmonar que obstaculiza el intercambio gaseoso y no contribuyen a la eliminación de la bacteria, si no que favorecen su persistencia y diseminación.

Uno de los efectos más relevantes de PLY sobre el sistema inmune es su capacidad de activar el sistema del complemento por la vía clásica. Incluso a baja concentración, la toxina es capaz de activar complemento en suero humano que carece de anticuerpos anti-PLY [68]. Se plantea que interaccionando con la porción Fc de inmunoglobulinas G y la proteína C1q simultáneamente o solo con la última, PLY activa complemento a través de sitios diferentes a los involucrados tanto en la oligomerización como en la interacción con colesterol [69, 70]. La respuesta inflamatoria generada debido a la activación del complemento se considera una contribución adicional (e independiente de la actividad citolítica) de PLY a la supervivencia pulmonar de neumococo.

Por otro lado PLY es responsable de una variedad de efectos inmunomoduladores sobre neutrófilos y monocitos, los principales componentes celulares responsables de la resolución de la infección neumocócica pulmonar, pero también se describen efectos de este tipo sobre células epiteliales y linfocitos T. Aunque la mayoría de éstos son concordantes con los efectos patológicos observados al administrar PLY purificada o durante la infección neumocócica, en la mayoría de los casos siguen en discusión los mecanismos concretos que llevan a estos efectos.

Utilizando un modelo de infección *in vivo* con mutantes de neumococo deficientes en PLY, Kadioglu *et al.* demostraron que el reclutamiento celular en pulmón, particularmente de neutrófilos, se ve demorado y es de menor magnitud durante la infección con la cepa deficiente en PLY en comparación con la cepa salvaje [71]. Los autores concluyen además que a pesar de que PLY provoca un rápido y mayor infiltrado de neutrófilos a los espacios alveolares, éstos no son capaces de promover la eliminación de la bacteria, observación consistente con la capacidad de PLY de inhibir variadas funciones de los fagocitos como estallido respiratorio y liberación de enzimas lisosomales. Una investigación posterior en modelo *in vitro* confirma este resultado y agrega que estas diferencias no dependen solamente de la presencia de la proteína si no además de complejas interacciones entre el hospedero y el patógeno ya que no se reproducen exactamente al administrar la proteína purificada [72]. El mecanismo preciso del efecto quimiotáctico de PLY sobre neutrófilos podría tratarse de un efecto indirecto de la producción de mediadores inflamatorios debido a activación de complemento [69] o de un efecto directo sobre los propios neutrófilos como la estimulación de producción de IL-8 [73] y/o de otros mediadores pro inflamatorios [74]

Las actividades de monocitos/macrófagos alveolares también son alteradas por PLY. Por un lado se ha observado que en monocitos humanos estimula la producción de citoquinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 [75] pero además de quimioquinas tipo CXC como MIP-2 (homóloga a CXCL-8 humana) y KC en macrófagos residentes de pulmón de ratón [76],[77]. Estas actividades se correlacionan con su capacidad de inducir inflamación y promover el influjo de neutrófilos característico de la infección neumocócica descritos anteriormente. Los macrófagos alveolares son en gran medida los responsables de controlar el estado inflamatorio en pulmón [78] por lo que los mecanismos desencadenados por PLY estarían favoreciendo la permanencia del patógeno más que la resolución de la infección.

Varios trabajos han sugerido que parte de los mecanismos proinflamatorios promovidos por PLY se deben al menos en parte a su capacidad de activar la señalización vía TLR4 (del inglés, Toll-like receptor 4). Un trabajo publicado por Malley *et al.* sugirió que la respuesta inflamatoria de macrófagos depende del reconocimiento de PLY por parte de TLR4 [79]. Adicionalmente el estudio mostró que ratones portadores de una mutación en TLR4 que afecta la señalización a través de dicho receptor, son significativamente más susceptibles a desarrollar enfermedad invasiva cuando son infectados con una cepa serotipo 3 productora de PLY pero no cuando son infectados con una cepa deficiente en PLY. La mayor susceptibilidad a la infección, producción de IL-6, TNF- α y translocación del factor de transcripción NF- κ B (del inglés, Nuclear Factor Kappa B) en respuesta a PLY en macrófagos peritoneales también se vio comprometida en ratones deficientes en la proteína MyD88, adaptador en la cascada de señalización interna para todos los receptores de tipo Toll excepto TLR3 [80]. Por su parte Gray *et al.* demostraron que el dominio 4 de PLY es capaz de activar monocitos humanos y macrófagos murinos de forma parcialmente dependiente de TLR4 [81]. En acuerdo con estos resultados, otros estudios demostraron que la producción de CXCL-8 inducida por PLY en células nasofaríngeas es parcialmente dependiente de la actividad hemolítica de la proteína pero requiere influjo de iones calcio y activación de MAPK (del inglés: Mitogen-activated protein kinase) vía TLR4 [82]. Sin embargo, otros resultados indican que PLY no es un agonista de TLR4. El trabajo de McNeela *et al.* [83] plantea que PLY por sí sola no es capaz de inducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias ni en macrófagos ni en células dendríticas, pero sí es capaz de promover la activación de células innatas y amplificar la producción de citoquinas en respuesta a agonistas de TLRs. Además, los autores demostraron que PLY promueve la activación del inflammasoma de NLRP3 y secreción de IL-1 β y también IL-1 α . Por otro lado, PLY indujo la secreción de dos citoquinas fundamentales en la respuesta protectora contra neumococo, IL-17 e INF- γ en esplenocitos *in vitro* en un mecanismo dependiente de NLRP3 (del inglés, Nod-like receptor PYRIN domain-containing protein 3) pero no de TLR4,. PLY también indujo la secreción de IL-17 en células T- γ δ e INF- γ en células NK *in vivo* en pulmones de ratones infectados con una cepa de neumococo capaz de expresar PLY pero no en una cepa mutante deficiente en la expresión de la citolisina [83]

Aunque aún existen discrepancias acerca de la capacidad de PLY de activar TLR4, todos los trabajos sugieren que PLY es capaz de activar células del sistema inmune innato al menos a través de un receptor innato ya sea de la familia de los NLR o TLR lo

que representa una actividad biológica directa adicional además de la actividad hemolítica y activación de complemento que ciertamente contribuye a los efectos biológicos de la proteína y la inflamación durante la infección. Por lo tanto, bloquear dichas actividades podría ser beneficioso a la hora de limitar la patología. Al mismo tiempo, las actividades inmunomoduladoras de PLY hacen de esta proteína un candidato interesante para la formulación de vacunas antineumocócica.

I.4 Respuesta inmune durante la neumonía neumocócica

Como se mencionó anteriormente, la colonización asintomática de la nasofaringe en muchos casos precede a la infección y es además el reservorio de *S. pneumoniae* en la comunidad. Durante colonización, la respuesta inmune local de las vías superiores cumple un rol fundamental en la contención del patógeno [20].

Las células epiteliales de la nasofaringe reconocen diferentes componentes de *S. pneumoniae* por medio de receptores de reconocimiento de patrón o PRRs (del inglés: Pattern Recognition Receptors). Los motivos moleculares reconocidos por estos receptores son comúnmente denominados patrones moleculares asociados a patógenos o a microorganismos y son comúnmente referidos como PAMPs o DAMPs, acrónimos de sus nombres en inglés (Pathogen/Microbe Associated Molecular Patterns) [84]

El reconocimiento de los PAMPs contribuye a la defensa del hospedador a través de la liberación de mediadores inflamatorios como citoquinas y quimioquinas y moléculas efectoras como péptidos antimicrobianos [85, 86]. La secreción de TNF- α e IL-8 por parte de macrófagos así como el influjo de neutrófilos hacia los senos paranasales son parte de la respuesta innata observada durante la colonización [87]. La respuesta adaptativa desencadenada durante la colonización se caracteriza por la producción de inmunoglobulinas IgA en secreciones e IgG en suero, predominantemente contra el polisacárido capsular [88][89]. Si bien estos anticuerpos colaboran en la resolución de la colonización [90, 91] está reportado que no son imprescindibles y que la protección frente a colonización puede ser mediada por linfocitos T CD4⁺ [92, 93] del subtipo Th17 [94, 95]. La secreción de IL-17A por estas células lleva al reclutamiento y activación de

neutrófilos que eventualmente son capaces de eliminar las bacterias mediante fagocitosis [96].

Si la infección progresa a enfermedad, llegando a las vías respiratorias inferiores y espacios alveolares se desencadenan los mecanismos de defensa pulmonares. Este proceso debe ser altamente regulado ya que, mientras que una respuesta débil resulta en la replicación del patógeno y puede llevar a la diseminación sistémica, una respuesta exacerbada lleva a dificultades en el intercambio gaseoso y daño tisular [24].

Los macrófagos alveolares residentes comprenden la primera línea de defensa celular en el pulmón [78, 97]. Debido a que pueden realizar varias rondas de fagocitosis son capaces de controlar cierta carga bacteriana manteniendo un bajo estado inflamatorio [98, 99]. Cuando la capacidad de fagocitosis de los macrófagos alveolares se ve superada, éstos liberan mediadores proinflamatorios como TNF- α , IL-1 β e IL-8 que activan al endotelio y atraen un importante influjo celular mayoritariamente compuesto por neutrófilos [21, 100]. La actividad fagocítica de los neutrófilos se convierte en el principal mecanismo de eliminación de *S. pneumoniae* [71]. Este infiltrado celular en los espacios alveolares (edema pulmonar) es la causa de las dificultades respiratorias características y debe ser controlado ya que de extenderse puede causar daño permanente en el pulmón [101].

Más tardíamente aunque de manera solapada con el influjo de neutrófilos, son reclutadas a los espacios alveolares un número importante de células T [102]. Estas células son predominantemente del tipo de memoria efector, secretoras de INF- γ capaz de activar macrófagos y así contribuir en la eliminación del patógeno [24]. En investigaciones de nuestro grupo se ha demostrado además que linfocitos colaboradores Th17 son también importantes mediadores en la respuesta frente la infección durante la neumonía neumocócica [48]. La producción de IL-17A por parte de estas células presumiblemente colabora en la resolución de la infección mediando el reclutamiento, activación y supervivencia diferencial de neutrófilos y macrófagos [96, 103, 104].

Además de la activación de macrófagos alveolares, células epiteliales, reclutamiento de neutrófilos y de células T, la infección neumocócica en el pulmón induce la respuesta humoral, otro importante mecanismo de defensa del hospedero [105]. Durante la infección natural en el huésped se induce la generación de anticuerpos contra PnPs y contra varias proteínas de neumococo [106, 107]. Los anticuerpos isotipo IgM naturales e inducidos contra el polisacárido capsular contribuyen a la defensa temprana [44] principalmente promoviendo la activación de la cascada del complemento por la vía

clásica [108]. Los anticuerpos isotipo IgG también son capaces de activar la vía clásica del complemento pero además potencian los mecanismos de células fagocíticas por opsonofagocitosis [105].

Está descrito que el correlato de protección de las vacunas anti neumocócicas actuales consiste en la generación de anticuerpos anti-capsulares con capacidad opsonizante [109]. La buena eficacia de las mismas indica que sin dudas ésta es una excelente estrategia para conferir protección frente a la enfermedad neumocócica [110]. Sin embargo, más recientemente se ha propuesto que no sería el principal mecanismo inmune responsable de la protección contra neumococo [110]. La diferenciación de células Th1 de memoria, especialmente del subtipo Th17 que actúan a nivel de la mucosa respiratoria cumple un rol determinante [111] y se ha visto que es capaz de proteger frente a enfermedad neumocócica [48, 112, 113].

I.5 Vacunas antineumocócicas

I.5.1 Vacunas actuales

Al presente existen dos tipos de vacunas anti-neumocócicas aprobadas para uso humano. Ambos tipos están formulados en base a una mezcla de polisacáridos capsulares de los serotipos más prevalentes. La principal diferencia entre las formulaciones radica en que una de ellas se basa en polisacáridos purificados y la otra en el empleo de polisacáridos conjugados a una proteína [114].

La vacuna polisacáridica (PPS) fue la primera vacuna antineumocócica desarrollada, aprobada en el año 1983. Actualmente se comercializa bajo el nombre de Neumovax 23, que consiste de polisacáridos capsulares purificados de los 23 serotipos hallados en el 90% de los aislados clínicos de sangre y hasta el 85% en sitios no estériles en pacientes de Estados Unidos y Europa [115]. Por lo comentado anteriormente, esta vacuna induce una respuesta inmune humoral T independiente tipo II, caracterizada por la producción de anticuerpos IgM y en menor medida IgG séricos [116]. Si bien confiere protección contra enfermedad invasiva, esta formulación presenta limitaciones ampliamente reconocidas como ser protección únicamente contra infecciones causadas por los serotipos incluidos en la formulación y, por su naturaleza T independiente, baja eficacia en menores de dos años [117]. Esto último se debe a que la maduración de células B de la zona marginal del bazo se completa en el segundo año de vida. Por esta

misma razón tampoco genera memoria inmunológica de larga duración ni respuesta secundaria al recuerdo [43].

Desde el año 2000 se encuentran registradas y aprobadas vacunas formuladas en base a polisacáridos capsulares de neumococo conjugados a un epítoto proteico (PCV). La primera formulación disponible incluía siete polisacáridos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19C y 23F) unidos covalentemente al toxoide diftérico CRM197. Los serotipos incluidos en esta vacuna son causantes del 80% de las infecciones pediátricas en Estados Unidos [105]. Desde el 2009 se encuentran disponibles variantes comerciales 10 y 13-valentes, la última incluye los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A además de los incluidos en la PCV 7.

PCV presenta importantes mejoras frente a PPS: es más inmunogénica, induce una respuesta T dependiente funcional en niños menores a 2 años, que genera memoria inmunológica de larga duración, cambio de clase y maduración de la afinidad de los anticuerpos antipolisacarídicos [118]. Como resultado confiere protección a largo plazo contra enfermedad invasiva y otitis media mediada por anticuerpos séricos IgG de alta afinidad y en cierta medida IgA secretoria [119]. PCV 7 disminuye el porcentaje de enfermedad invasiva por los serotipos incluidos en un 97% y en cierta medida reduce colonización confiriendo inmunidad de rebaño que disminuye la incidencia en individuos no vacunados [120].

PPS no es recomendada para utilizar en programas masivos de vacunación y se administra bajo indicación a individuos mayores de 2 años que pertenecen a grupos de riesgo [121].

En el año 2007 Uruguay incorporó la PCV 7 al calendario de vacunación, hasta el año 2010 que fue suplantada por la PCV 13 [122]. Estudios recientes confirman que incidencia en nuestro país de la neumonía en niños menores de cinco años ha disminuido sensiblemente con la incorporación de PCV 7 y más aún con PCV 13, aunque en el año 2012 existe un aumento significativo de casos [123-125].

A pesar de que las vacunas actuales son efectivas contra los serotipos incluidos, enfrentan el problema de la variación antigénica del polisacárido capsular. La eficacia de la vacunación depende de la prevalencia de serotipos que cambia en el espacio y el tiempo. PCV 7 ofrece protección contra los serotipos más comunes en América del Norte mientras que en África, Asia, América latina y el Caribe los mismos representan el

65% o menos de los casos de enfermedad invasiva [118]. A pesar que PCV 13 incorpora seis serotipos predominantes en otras regiones, por otro lado los casos de enfermedad neumocócica causados por serotipos no incluidos en vacunas han aumentado [126] debido a que la protección serotipo específica deja disponible el nicho biológico [127]. Este fenómeno se conoce como reemplazo de serotipos y ha sido ampliamente documentado [128] e incluso ha sido descrito como una amenaza al éxito logrado por la vacunación [105].

I.5.2 Desarrollo de vacunas basadas en antígenos proteicos de neumococo

Las limitaciones de las vacunas antineumocócicas actualmente disponibles hacen que sea necesario el desarrollo de nuevas formulaciones. Sería deseable que las nuevas vacunas fuesen capaces de proveer protección universal independientemente del tipo capsular y que además de prevenir la enfermedad invasiva, tuviesen un mayor efecto protector frente a la neumonía limitando a su vez la colonización nasofaríngea sin promover el reemplazo por otros serotipos de neumococo. Una alternativa prometedora es el desarrollo de una vacuna basada en proteínas conservadas expresadas por todos los tipos capsulares de neumococo. Esta estrategia resultaría en una única formulación más sencilla y probablemente más económica en comparación a las vacunas conjugadas, que podría ser administrada en todas las regiones geográficas sin tener en cuenta la prevalencia de serotipos.

Sin embargo existen ciertas dificultades asociadas a este objetivo: además de que polisacárido capsular es el factor de virulencia más importante, enmascara otros antígenos de superficie dificultando así su reconocimiento por parte de los componentes del sistema inmune. Por otro lado las proteínas elegidas deben ser de crucial importancia para la virulencia y supervivencia de la bacteria y altamente conservadas. A la fecha varias proteínas neumocócicas con potencial inmunoprotector han sido evaluadas como candidatos para la formulación de vacunas.

Dentro de los antígenos proteicos considerados como candidatos para la formulación de vacunas antineumocócicas universales se encuentra PspA. En este respecto Glover y colaboradores demostraron protección frente neumonía y septicemia en modelo murino al vacunar con PspA recombinante por vía parenteral [129]. El mismo grupo identificó anteriormente a PspA como un antígeno inmunodominante en la respuesta

antineumocócica y lo propuso como candidato como antígeno proteico de vacunación [130-133].

En uno de los antecedentes de inmunización únicamente con PspC descrito en el trabajo de Brooks-Walter y colaboradores, ratones inmunizados por vía subcutánea con PspC recombinante fueron protegidos frente al desafío letal vía intravenosa con neumococo [134]. De acuerdo con este trabajo la protección inducida por vacunación con PspC no es mediada directamente por reconocimiento de PspC por parte de los anticuerpos generados, sino por un reconocimiento cruzado con PspA. Según los autores, ambas proteínas tienen similitud de secuencia producto de un evento de recombinación genética, aunque no evalúan otro tipo de protección.

Por varias razones, PLY, se considera también un candidato muy atractivo para ser incluido en las nuevas formulaciones: 1) es una proteína conservada hallada en todos de los aislados clínicos relevantes; 2) cumple un rol esencial en la virulencia de la bacteria [25, 62, 135]; 3) es capaz de producir respuesta de anticuerpos IgG sistémicos e IgA secretorios de manera T dependiente [89, 106, 136]; 4) como sucede con otras toxinas, el bloqueo y/o neutralización de sus actividades biológicas (discutidas anteriormente) potencialmente puede reducir las manifestaciones clínicas durante la infección [62].

El primer antecedente de inmunización con una solución de PLY purificada es del año 1983; en él, Paton *et al.* demostraron diferencias significativas en tiempo de sobrevida de ratones vacunados por ruta intraperitoneal frente a un desafío letal intranasal con respecto al grupo control sin inmunizar [137]. El mismo grupo fue además, el primero en clonar y expresar PLY recombinante [138] a partir de la cual se generaron variantes no tóxicas (toxoides) con capacidad hemolítica reducida [139]. Al vacunar con estas variantes por ruta intraperitoneal observó el aumento de sobrevida frente al desafío letal intranasal con *S. pneumoniae* serotipo 2. Además, demostraron que conjugar al PnPs19F con una de estas variantes convierte la respuesta de anticuerpos contra el polisacárido en una respuesta T dependiente mientras paralelamente aumentan los niveles de anticuerpos anti-neumolisina. En otro trabajo fundamental de estos autores, grupos de ratones inmunizados por vía subcutánea con un toxoide de PLY y óxido de aluminio como adyuvante fueron desafiados por vía intranasal o intraperitoneal con diez serotipos diferentes de neumococo. En por lo menos nueve grupos se observaron

distintos niveles de protección significativa con respecto al grupo control, aunque variaron de acuerdo al serotipo y la ruta de administración del desafío [140].

Esta serie de trabajos demuestran la importancia de PLY como factor de virulencia de la bacteria y el potencial como antígeno de vacunación, pero adicionalmente establecen lineamientos claves de investigaciones posteriores: generación de variantes no hemolíticas de la toxina aptas para ser utilizadas como antígenos de vacunación, co-administración con otros antígenos para obtener mayor grado de protección, potencial como “carrier” proteico o incluso como adyuvante, distintos grados de protección según ruta de administración, evaluación de efectos en carga nasofaríngea, infección aguda e invasión.

Los efectos citotóxicos de PLY sobre células eucariotas comprenden un problema a los efectos de incorporarla en nuevas vacunas, con este fin, han sido generadas diferentes variantes con capacidad hemolítica reducida.

Una de las más utilizadas es la denominada PdB, descrita en uno de los trabajos de Paton *et al.* previamente mencionados [139]. PdB contiene una sustitución de triptófano a fenilalanina en la posición 433 y retiene entre 0,1 y 1% de la capacidad hemolítica de la variante salvaje. Sin embargo se ha demostrado que junto con otras variantes generadas mantienen la capacidad de formar poros (aunque distintos a los de la variante salvaje) en membranas ricas en colesterol lo que puede significar efectos no recomendables para un antígeno de vacunación [141].

Más recientemente se ha descrito una variante que presenta una delección puntual en la posición 146 que comprende la región involucrada en la oligomerización [142]. PLY Δ 146 carece completamente de actividad hemolítica pero mantiene el reconocimiento por un anticuerpo monoclonal anti PLY y es capaz de inducir títulos de anticuerpos IgG de igual magnitud que la variante salvaje al ser administrada en ratones con alúmina como adyuvante. La sobrevivencia de los mismos al ser desafiados intraperitonealmente con *S. pneumoniae* serotipo 4 fue significativamente mayor que el grupo vacunado solo con alúmina [142]. Éste es sin dudas uno de los toxoides generados más interesantes para continuar con las investigaciones de vacunas anti neumocócicas basadas en PLY.

En nuestro laboratorio se ha generado una variante no tóxica de PLY, denominada PLYt, que consiste en una versión recombinante que carece de los aminoácidos del extremo carboxilo terminal asociado a la toxicidad. PLYt se produjo por clonado de

fragmentos amplificados de DNA cromosómico extraído de *S. pneumoniae* serotipo 14 en el plásmido pPACIB9 portador de un promotor triptófano inducible [143]. Dicho vector de expresión portando un fragmento de 1275 pb fue empleado para transformar cepas de *E. coli* W3110. Además se cuenta con la cepa que produce la proteína entera (PLYwt) portando el mismo plásmido pero con la secuencia completa del gen de 1413 pb. PLYt no presenta actividad hemolítica, mientras que PLYwt sí. La capacidad de ambas proteínas recombinantes de inducir protección fue evaluada en ratones inmunizados por ruta subcutánea con PLY o PLYt preparadas en adyuvante completo de Freund más dos recuerdos por ruta intramuscular con las proteínas preparadas en adyuvante incompleto. Estos ensayos demostraron que PLYt es más eficiente en la inducción de anticuerpos antihemolíticos en comparación a PLYwt. Concretamente, los sueros de ratones vacunados con PLYt mostraron títulos antihemolíticos 4 veces mayores que los de los animales vacunados con PLYwt [144]. La capacidad de las formulaciones de inducir protección se evaluó sometiendo a los animales a un desafío intraperitoneal con una dosis equivalente a 50DL (dosis letales) de una cepa de neumococo diferente a la empleada para clonar las proteínas recombinantes mediante desafío intraperitoneal. Mientras que los ratones inmunizados con PLYt mostraron una tasa de supervivencia del 75%, el 100% de los animales inmunizados con la versión completa murieron a causa de la infección. Estos resultados señalan a PLYt como un muy buen candidato para la generación de nuevas vacunas antineumocócica y justifican ampliar la investigación para evaluar su potencial justo con diferentes adyuvantes y otras rutas de inmunización.

I.6 Vacunación mucosa

De todas las vacunas aprobadas para uso humano, al presente, solamente unas pocas son administradas por vía mucosa. Entre ellas se encuentran las vacunas orales contra la poliomeilitis, fiebre tifoidea, rotavirus y cólera, y la vacuna de administración nasal contra influenza. El resto son inyectables, administradas ya sea por ruta intramuscular, subcutánea o intradérmica.[145]

Si bien las vacunas inyectables han demostrado ser efectivas en la prevención de enfermedades infecciosas presentan algunas limitaciones. Por un lado la cantidad de inyecciones simultáneas que puede recibir un individuo, especialmente niños pequeños, es limitada. Para reducir la cantidad de punciones a neonatos se han combinado

antígenos en formulaciones multivalentes, pero se ha demostrado que pueden existir interferencias lo que demuestra limitaciones en esta estrategia [146]. Por otra parte, la necesidad material estéril y personal calificado para su administración demandan altos costos y desafíos logísticos. La práctica de inyecciones en condiciones no seguras representa un problema vigente sobre todo en regiones en vías de desarrollo [147, 148]. Uno de las principales limitaciones es que si bien inducen buena inmunidad sistémica la mayoría desarrollan escasa inmunidad a nivel de superficies mucosas [149, 150]. Como se discutió anteriormente, desde hace un tiempo se ha vuelto claro que la inducción de respuestas locales a nivel de la puerta de entrada del patógeno es fundamental para la protección frente a enfermedades infecciosas y las respuestas inmunes de este tipo son inducidas más eficientemente mediante vacunación por vía mucosa [6]

Dentro de las diferentes opciones de inoculación mucosa existen importantes variaciones en cuanto al tipo y localización de la respuesta inmune generada (Tabla 1) [7]. Se distinguen ciertas relaciones entre el sitio inductor y los sitios efectores debido a diferencias en la expresión de receptores y ligandos entre los diferentes tejidos mucosos y linfocitos [151]. Las rutas mejor caracterizadas son la oral y nasal, pero también se han estudiado otras como rectal, vaginal y más recientemente sublingual. Mientras que la inmunización oral induce una sustancial respuesta de anticuerpos en suero, intestino delgado, estómago y glándulas salivales [152]; la vía rectal induce más que nada en el recto y colon [153, 154]. Por otro lado, la inmunización intranasal resulta en una respuesta de anticuerpos en suero, vías respiratorias y tracto genital, pero no en el intestino [155, 156]. La inmunización vaginal induce producción de anticuerpos en secreciones genitales y suero [157].

Tabla 1. Comparativa de la diseminación de la respuesta IgA secretoria de acuerdo a la ruta de administración. Tomado y traducido desde Cerzinsky et al. 2010 [151]

	Nasal	Subling	Oral	Rectal	Vaginal	Trans-dermal
Respiratorio Superior	+++	+++	-	-	-	+++
Respiratorio Inferior	+/+++	+++	-	-	-	+++
Estómago	-	+/+++	+/+++	-	-	?
Intestino delgado	-	+++	+++	-	-	+
Colon	-	?	+	++	-	+
Recto	-	?	(+)	+++	-	?
Tracto genital	+++	+++	-	-	++/+++	?
Sangre	+++	+++	+(+)	+(+)	+(+)	+++

Lo ideal sería una vacuna que administrada en un único sitio genere una respuesta protectora humoral y celular, tanto a nivel sistémico como en la superficie mucosa relevante de acuerdo al patógeno. En este sentido la vacunación intranasal tiene un amplio potencial. Es capaz de inducir inmunidad humoral y celular en vías respiratorias superiores e inferiores y en el tracto genital [158] junto con una fuerte inducción sistémica de anticuerpos, utilizando menor cantidad de antígeno que por vía oral [159]. Incluso se han reportado respuestas comparables a la inoculación intramuscular [160]. En lo que refiere a infecciones del tracto respiratorio existen numerosos antecedentes de protección por vacunación intranasal [120] e incluso han sido licenciadas para uso humano dos vacunas contra influenza [161]. Sin embargo, a pesar de la eficacia de las formulaciones, su utilización generó preocupaciones sobre pasaje de antígeno al sistema nervioso central por el bulbo olfatorio [162] y la administración de una de las formulaciones se relacionó con efectos secundarios neurológicos y parálisis facial [163]. Una de estas vacunas fue retirada del mercado y la ruta de administración generó dudas con respecto a su seguridad incluso en otras vacunas intranasales en desarrollo [164].

Desde hace unos años se está estudiando la ruta de administración sublingual (o “abajo de la lengua”) como vía alternativa de vacunación mucosa contra enfermedades respiratorias. Además de que no presenta riesgo de pasaje hacia el sistema nervioso central, no es invasiva para el sujeto y evita la degradación de los antígenos debido al ambiente estomacal.

En humanos la administración sublingual ha sido utilizada especialmente para la inducción de tolerancia en el tratamiento de alergias y enfermedades autoinmunes [7, 165]. Aunque esta aparente naturaleza tolerogénica podría ser una dificultad para la vacunación por ruta sublingual, descubrimientos recientes en modelos animales afirman su potencial en la generación de inmunidad protectora contra enfermedades infecciosas.

Utilizando una variedad de formulaciones en modelos animales se ha demostrado que la vacunación sublingual es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos sistémicos y secretorios antígeno-específica y también respuestas celulares específicas [166-168]. Empleando un modelo murino de vacunación sublingual con una preparación inactivada y otra atenuada de influenza A; Song *et al.* demostraron la inducción de una respuesta sistémica y de mucosas de anticuerpos y linfocitos T capaz de conferir protección frente a un desafío letal con el mismo virus [169]. En cuanto a *S. pneumoniae* Lu *et al.*

demostraron una reducción en la duración e intensidad de la colonización luego de un desafío con neumococo serotipo 6 en ratones vacunados por ruta sublingual con una cepa no capsulada inactivada, que expresa una variante no hemolítica de PLY [170]. Cabe destacar que en comparación con la ruta intranasal, requirió de una dosis diez veces mayor y la formulación no fue capaz de generar inmunidad esterilizante en todos los animales.

Tomando en cuenta lo ya mencionado puede concluirse que si bien las vacunas inyectables presentan inducen inmunidad protectora en el compartimiento sistémico [171], su capacidad de generar inmunidad a nivel de superficies mucosas es limitada. La gran mayoría de patógenos y moléculas reconocidas por el sistema inmune ingresan al organismo a través de epitelios mucosos. Solo las enfermedades causadas por microorganismos que afectan el tracto respiratorio bajo y gastrointestinal representan el 11,4% de las causas de muerte anuales en todo el mundo, y si además se toman en cuenta otras enfermedades como tuberculosis y HIV/SIDA la cifra se eleva hasta más del 15%, lo que representa 7.8 millones de fallecimientos anuales [8]. La inducción de respuestas locales a nivel de las mucosas es fundamental para prevenir el ingreso de patógenos a nivel de la puerta de entrada, reducir la invasión, su capacidad de colonizar epitelios mucosos y por lo tanto también reducir su transmisión en la comunidad. El desarrollo de vacunas de aplicación mucosa es de particular importancia para inducir protección frente a diversos patógenos humanos, en particular causantes de infecciones gastrointestinales y respiratorias. Sin embargo, el mantenimiento de la homeostasis en las mucosas depende en gran medida de mecanismos activos que promueven tolerancia frente a los antígenos y esto dificulta el desarrollo de estrategias de inmunización capaces de inducir respuestas protectoras.

El desafío actual consiste en el desarrollo de nuevas formulaciones capaces de favorecer la activación del sistema inmune sobre la inducción de tolerancia, preservando a su vez la función de la mucosa. La eficacia de las vacunas de aplicación mucosa no solo dependerá de selección de antígenos apropiados y su combinación con adyuvantes sino también de elección de la ruta de administración. Sin embargo, las reglas para el desarrollo de vacunas eficaces y seguras aún no se conocen en profundidad y mayores esfuerzos por elucidar los mecanismos de activación inmune en las superficies mucosas son requeridos.

En el caso particular de *S. pneumoniae* nuevas vacunas siguen siendo requeridas y existe urgencia por nuevas formulaciones capaces de conferir protección independiente

de serotipo, contra la más amplia variedad de las diferentes manifestaciones de la enfermedad neumocócica, particularmente contra la neumonía aguda y que a su vez induzcan inmunidad protectora a nivel de la nasofaringe de modo de prevenir la colonización. La vacunación intranasal parece prometedora en este sentido en general para prevenir infecciones respiratorias de diversas etiologías pero se ha asociado con efectos secundarios neurológicos. Como alternativa más segura de vacunación mucosa se ha comenzado a caracterizar la ruta sublingual, para la cual ya existen antecedentes en modelos pre clínicos de generación de inmunidad protectora contra los dos principales patógenos respiratorios. Por lo tanto, evaluar la ruta sublingual como una ruta alternativa de vacunación contra *S. pneumoniae* en un modelo de neumonía aguda podría acercar resultados que consideren su uso en humanos. Asimismo, es interesante estudiar los efectos de la administración de antígenos de diferente naturaleza química por esta ruta y evaluar su capacidad de inducir inmunidad protectora. En este trabajo se plantea entonces el empleo de un modelo murino de vacunación sublingual para caracterizar la respuesta inmune inducida tras la vacunación con el polisacárido capsular purificado de tipo 1 (PnPs1) y de una variante recombinante no tóxica de neumolisina y su capacidad de conferir protección frente a la neumonía neumocócica.

II. Objetivos

II.1 Objetivo General

Caracterizar los efectos de la administración sublingual de compuestos inmunoestimulantes purificados sobre el tracto respiratorio y evaluar su utilidad en el tratamiento de infecciones respiratorias, empleando como modelo neumonía neumocócica en ratones.

II.2 Objetivos particulares

II.2.1 Caracterizar la respuesta inmune tras vacunación con polisacárido capsular por ruta sublingual y evaluar la capacidad de la formulación de conferir protección en un modelo murino de neumonía neumocócica.

II.2.2 Producir y purificar una variante recombinante no tóxica de neumolisina, un antígeno proteico de neumococo para su empleo en la formulación de una vacuna sublingual.

II.2.3 Evaluar la respuesta humoral en suero tras la vacunación con dos variantes toxoides recombinante de neumolisina y evaluar la protección en un modelo murino de neumonía neumocócica.

III. Materiales y métodos

III.1. Producción de neumolisina recombinante

La variante de neumolisina carente de la región carboxilo terminal responsable de la actividad hemolítica PLYt, fue producida a partir de la cepa recombinante *Escherichia coli* W3110-056 construida en nuestro laboratorio como se describió en [144]. Brevemente, un fragmento de 1275 pares de bases (pb) del gen de neumolisina (1413 pb) que codifica desde la metionina inicial hasta el nucleótido anterior a la región de la proteína asociada a la citotoxicidad, fue amplificado por PCR (del inglés: polymerase chain reaction) mediante el empleo de cebadores específicos a partir de ADN cromosómico aislado de una cepa de *S. pneumoniae* serotipo 14. El producto de PCR fue clonado en el plásmido pPACIB.9. Dicho plásmido posee un marcador de selección de resistencia a ampicilina y la inducción está controlada por un promotor triptófano inducible por ácido β -indoleacrilico [172].

Las colonias transformadas fueron seleccionadas en placas de LB-ampicilina 100 μ g/ml. Las colonias aisladas se inocularon en caldo LB-Ampicilina (100 μ g/ml) y cultivaron a 37°C en agitación (200 r.p.m.) durante 16 horas. Posteriormente, se realizaron diluciones 1/100 (v/v) de los cultivos y se incubaron 3 hs más en las mismas condiciones hasta entrar en fase exponencial, momento en el que se indujo la expresión del gen PLYt mediante agregado de ácido β -indoleacrilico (Sigma) a una concentración final de 25 μ g/ml. Los cultivos se incubaron por 6 horas más en las condiciones ya mencionadas. A continuación las bacterias se cosecharon por centrifugación durante 15 min a 400 g. El pellet bacteriano obtenido fue resuspendido en buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.2) en un volumen de 50 ml correspondiente a 1/20 del volumen de cultivo original.

Las suspensiones bacterianas se lisaron por sonicación por pulsos de no más de 30 segundos de entre 40-60 A durante 30 min y las fracción soluble e insoluble resultantes se separaron por centrifugación a 14000 g, 4 °C durante 1 h. La fase insoluble conteniendo los cuerpos de inclusión con la proteína de interés fue recuperada y resuspendida en 30 ml de buffer TE y centrifugada nuevamente por 30 min a 14000 g. La solubilización de la variante truncada de neumolisina contenida en los cuerpos de inclusión se realizó mediante el empleo de urea en alta concentración. En primer lugar, se realizó un lavado en un volumen equivalente a 1/50 del original en TE-urea 2M. Luego los cuerpos de inclusión fueron centrifugados 1 h a 14000g, 4 °C. Para el

segundo lavado el pellet se resuspendió en el mismo volumen de TE-urea 8M y se incubó 1 h a 4 °C. Por último se realizó la centrifugación en las condiciones ya mencionadas y se recuperó el sobrenadante con la proteína recombinante solubilizada. La renaturalización de la proteína se realizó mediante por diálisis contra 4 L de PBS 1X utilizando una membrana con tamaño de poro de 12400 Da (Sigma) a 4° C. Transcurridas 16 h se realizó un cambio de solución por 4 L de PBS 0,5X y se continuó dializando durante 14-16 h a 4° C.

Las distintas fracciones obtenidas en el proceso fueron analizadas por SDS-PAGE al 12%, en condiciones reductoras en minigeles de acrilamida de 1,5 mm de espesor. Pevio a sembrar las muestras en el gel se prepararon diluciones en buffer muestra (12, 5 mM Tris pH 6.8; 0.4% SDS; 2% glicerol; 0.001% Azul de Bromofenol; 5% Beta-mercaptoetanol) y posteriormente se calentaron a 100 °C durante 5 min. De la misma manera se prepararon para sembrar como referencia estándares de BSA de concentración conocida. Las muestras fueron sembradas en 20 µl por carril. La corrida electroforética se realizó en sistema Mini-PROTEAN II, BIORAD a 40 A (Power-Pac 300, BIO RAD) durante 50 min. Para visualizar las proteínas el gel fue teñido con colorante azul de Coomassie. El peso molecular fue estimado empleando el marcador de peso molecular Thermo Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder el cual fue preparado según las instrucciones del fabricante.

III. 2. Preparación de los stocks bacterianos de *Streptococcus pneumoniae*.

La cepa de *S. pneumoniae* serotipo 1 E1586 empleada se obtuvo de la colección del Centro Nacional de Referencia del Ministerio de Salud Pública de Uruguay. La misma proviene de un aislado clínico de sangre de un paciente con diagnóstico de neumonía [173]. Las bacterias se recibieron en placas de agar-sangre (Agar Tripticasa Soja – TSA, complementado con 5% de sangre ovina estéril).

Las bacterias fueron manipuladas siempre manipuladas en condiciones asépticas, con mechero o en cabina de flujo laminar apta para trabajo con patógenos de nivel de bioseguridad 2. El descarte de todo el material contaminado con se realizó con previa descontaminación en solución de hipoclorito de sodio o esterilización en autoclave.

III.2.1. Preparación del stock madre

La preparación del stock madre se realizó como se describió anteriormente en Muñoz et al. 2010, Marques et al. 2011 y Muñoz et al. 2014 [48, 174, 175].

Brevemente, previo a la preparación de los stocks se prepararon placas frescas de agar-sangre y medio THYB. Para la preparación de las placas se disolvieron 40 g de agar TSA (Difco) en un litro de agua y se calentó con agitación hasta obtenerse una solución translúcida. Inmediatamente la solución de TSA se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez retirado del autoclave y cuando la solución alcanzó una temperatura aproximada de 45-50 °C, se agregaron 5 ml de sangre ovina estéril. El contenido se repartió en placas de Petri estériles en cámara de flujo laminar o bajo mechero Bunsen, aproximadamente 20 ml por placa. Una vez solidificado el agar, las placas fueron envueltas en film y almacenadas a 4 °C por hasta 2 semanas.

El caldo THYB se preparó disolviendo 37 g de medio Todd Hewitt (Sigma) y 0.5 g de extracto de levadura (Sigma) en un litro de agua destilada. El medio se calentó bajo agitación a 40 °C hasta lograr la solubilización completa de los componentes secos y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tubos estériles de 15 ml conteniendo 10 ml de caldo THYB fueron inoculados con 7 a 10 colonias aisladas y se incubaron a 37 °C en baño de agua con agitación lineal moderada hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.2- 0.4 Unidades de Absorbancia (UA). En ese momento 2 ml de la parte superior de cada tubo se transfirieron a un tubo estéril de 50 ml y se adicionó un volumen igual de caldo THYB y glicerol estéril a una concentración final de 12 % v/v. Alícuotas de 1.2 ml se almacenaron en tubos estériles a -80 °C por hasta 18 meses.

III.2.2. Preparación del stock de trabajo

Las alícuotas de trabajo se prepararon a partir de extendidos de una alícuota madre en placas de agar sangre, siguiendo un procedimiento similar al descrito pero incubando los cultivos hasta obtener una OD a 600 nm de 0.7 – 0.9 UA. Estas alícuotas fueron almacenadas hasta tres meses [48, 174, 175].

Antes de realizar los protocolos de infección, una alícuota del stock de trabajo fue descongelada y centrifugada a 2500 g por 5 minutos a temperatura ambiente para descartar el medio de preservación. El pellet bacteriano se lavó con 1 ml de solución salina estéril y tras centrifugarse nuevamente en idénticas condiciones, se suspendió en 1 ml de solución salina estéril y se homogeneizó en vortex por 30 segundos. El número de UFC/ml se realizó mediante siembra de diluciones seriadas de la suspensión madre en placas de agar sangre y recuento de colonias con la morfología característica

descrita para *S. pneumoniae* (colonias umbilcadas, de aspecto brillante y color verde-grisáceo, rodeadas por un halo correspondiente a alfa-hemólisis) [48, 175].

III.3. Inmunización de animales

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a la normativa vigente y fueron habilitados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de Uruguay (protocolos N° 08-05-10, 071140-000821-12 y 071140-002275-12).

En todos los experimentos se emplearon ratones convencionales, hembras de entre 8 y 12 semanas de edad de las cepas C57/BL6 o BALB/c obtenidos de la División Nacional de Laboratorios Veterinarios (DI.LA.VE.). Los animales se mantuvieron en aisladores individualmente ventilados con aire filtrado, con régimen de comida y agua *ad libitum* y fueron manipulados en cabinas aptas para trabajo con patógenos de nivel de bioseguridad 2 en todo momento.

Todas las inmunizaciones se realizaron por ruta sublingual (s.l.) según se describió en Muñoz-Wolf et al 2014 [175]. Brevemente, los animales fueron anestesiados mediante inyección de un cóctel conteniendo 110 mg/kg de Ketamina y 5.5 mg/kg de Xilacina, administrada por inyección intraperitoneal. Tras 10 minutos luego de la inducción, la boca del animal se mantuvo abierta empleando una micro pinza de cirugía, sosteniendo la cara dorsal de la lengua contra el paladar. Los antígenos fueron administrados en un volumen máximo de 10 µl, colocándose la mitad en el piso de la boca y el resto en la cara ventral de la lengua.

III.3.1. Inmunización con PnPs1

Cinco ratones C57/BL6 fueron inmunizados por ruta s.l. con una única dosis de 100 µg de polisacárido capsular serotipo 1 (ATCC) preparado en solución salina, en un volumen total 10 µl.

De modo de contar con un control positivo y comparar el tipo de respuesta inmune inducida por la vacunación con la observada en animales protegidos por exposición previa a una dosis subletal de la bacteria, un grupo de ratones fue desafiados con una dosis subletal de *S. pneumoniae* serotipo 1 (Sp1) (2×10^4 UFC) en 50 µl como se describió anteriormente en [48] y también en la sección V.

Como control negativo se incluyó un grupo de animales tratado con 10 µl de solución salina por ruta s.l..

Ocho días después todos los animales fueron desafiados con una dosis letal de Sp1 como se describe en la sección III.5 (2×10^6 UFC).

A los diez días, dos de los sobrevivientes del desafío de cada grupo junto con animales naive utilizados como control fueron sacrificados y se les extrajeron pulmones y ganglios sub mandibulares para análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo como se describe en la sección III.6.

III.3.2. Inmunizaciones con neumolisina

Dos toxoides de neumolisina PLYA Δ 146 y PLYt fueron evaluados como antígenos para la formulación de una vacuna antineumocócica de aplicación sublingual.

En el primer set de experimentos se empleó un toxoide recombinante derivado de la proteína completa que porta dos mutaciones puntuales en los aminoácidos 146 y 147 que determinan la pérdida de la actividad hemolítica [142]. Este toxoide (PLYA Δ 146R147, al que se hace referencia como PLYA Δ 146) fue producido en cepas de *E. coli* K12 transformadas con el plásmido pKK233-2 conteniendo la secuencia codificante de obtenida previamente de *S. pneumoniae* serotipo 1 [138] y fue cedido por el equipo del Dr. Tim Mitchell del instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Glasgow, Reino Unido.

Como control se empleó PLYa que es la variante recombinante de secuencia completa producida en iguales condiciones que PLYA Δ 146. PLYa presenta actividad hemolítica comparable a la proteína salvaje [142].

Nueve ratones BALB/c fueron inmunizados por ruta s.l. con 30 μ g/dosis de la variante no hemolítica PLYA Δ 146 en un volumen total de 10 μ l. A los días 14 y 28 post-vacunación los animales recibieron recuerdos con la misma formulación nuevamente por ruta s.l..

Con el fin de realizar una comparación preliminar, tres animales fueron vacunados en el mismo régimen con 30 μ g/dosis de la variante de proteína nativa PLYa.

Previo a la primera inmunización y en los días 13, 27 y 59 se tomaron muestras de suero para posterior evaluación de los títulos de anticuerpos específicos por ELISA (ver siguiente sección).

El toxoide PLYt generado tal y como se describió en la sección I se empleó para la vacunación ratones BALB/c (50 μ g/dosis) sola o junto con 10 μ g/dosis de FliC o 2 μ g/dosis de toxina colérica (CT, del inglés: *Cholera Toxin*) como adyuvantes, o con solución salina como control. Cuatro administraciones en 10 μ l totales se llevaron a

cabo los días 0, 7, 14 y 21. La recolección de suero se realizó previa a la primera inmunización y a los días 45 y 70 para posterior evaluación de los títulos específicos. Sesenta días luego de la última dosis, la mitad de los animales de cada grupo fueron desafiados con una dosis letal (2×10^5 UFC/50 μ l) de *S. pneumoniae* serotipo 1 como se describe en III.5. A las 40 h post desafío los animales fueron sacrificados para evaluar la carga bacteriana en pulmón y bazo como se describe en III.7.

III.4. Evaluación de respuesta de anticuerpos IgG anti neumolisina

La respuesta de anticuerpos IgG específicos anti PLY, se evaluó mediante ELISA. Placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) se sensibilizaron con 50 μ l por pocillo de una solución 10 μ g/ml de PLYt en buffer carbonato 50mM, pH 9.6, a 4 °C en cámara húmeda durante 12-16 h. Luego de 3 lavados con PBS-0,05% v/v Tween 20 (PBS-Tw) las placas se bloquearon con 100 μ l por pocillo de PBS- 1% w/v Seroalbúmina Bovina (BSA del inglés, *Bovine Serum Albumin*) (SIGMA) a 37 °C, 1 h 30 min en cámara húmeda.

A fin de prevenir la reactividad inespecífica, todas las muestras de suero fueron pre-incubadas en una solución conteniendo la fracción soluble resultante del sonicado de un cultivo de *E.coli* W3110 conteniendo el plásmido sin inserto (W3110-041), en una concentración final de proteína total de 250 μ g/ml en PBS-Tw durante 30 min, a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS-Tw, 50 μ l de al menos 2 diluciones de cada muestras se sembraron en las placas por duplicado y se incubaron a 4 °C, en cámara húmeda por 12-16 h.

Las muestras se lavaron 3 veces en PBS-Tw y se incubaron con 50 μ l de una solución 1/1000 en PBS-BSA de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (SIGMA). Finalmente, luego de otros tres lavados, se agregaron 50 μ l/pocillo de sustrato TMB (3,3',5,5' Tetrametil benzidina, BD) y se incubó por 10 min hasta detener la reacción por agregado de 25 μ l de H₂SO₄ 2N. La absorbancia de cada muestra se determinó contra blanco de PBS-BSA en lector de microplacas (MRX II, Dynex Technologies) a 450 nm (con referencia a 630 nm). En cada placa se sembraron, en paralelo, diluciones seriadas de un suero positivo considerado como referencia preparado anteriormente mediante inmunización de ratones con neumolisina purificada por vía intraperitoneal [144].

III. 5. Desafío con *Streptococcus pneumoniae*

Los animales fueron anestesiados como se describió en la sección III.3. Transcurridos 10 minutos, el inóculo bacteriano fue administrado en ambas narinas en un volumen final de 50 µl de solución salina. Los animales se mantuvieron en posición vertical durante 1 minuto para asegurar que el inóculo alcanzara los pulmones. La dosis infectiva del inóculo bacteriano se determinó luego de realizada la infección mediante siembra de diluciones seriadas en agar-sangre y recuento de UFC tras incubación por 16 a 18 horas en estufa a 37 °C y 5% CO₂.

III. 6. Análisis por citometría de flujo de poblaciones celulares en ganglios sub mandibulares.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se procedió a la disección y recuperación de los ganglios sub mandibulares. Para obtener suspensiones celulares, se realizó la disrupción mecánica de los ganglios empleando émbolos de jeringas de 2 ml y filtros descartables con mallas de nylon de 70 µm. Las células ganglionares obtenidas fueron lavadas con 1 ml de PBS libre de Ca²⁺/Mg²⁺-1 mM EDTA-1% BSA (FACS-EDTA) y finalmente resuspendidas en la misma solución [175].

Luego de determinar el número de células viables, las mismas se resuspendieron a una concentración final de 1x10⁶/ml en medio completo (cRPMI) conteniendo 50 ng/ml PMA (forbol-12-miristato-13-acetato), 500 ng/ml de Ionomicina. Con el fin de inhibir la secreción de citoquinas, se agregó Brefeldina A a una concentración final de 10 µg/ml. Como control negativo se emplearon células a las que se agregó únicamente Brefeldina en la misma concentración en ausencia de PMA/ionomicina.

Tras 4 h de incubación a 37 °C, las células se centrifugaron a 400 g por 5 min. Los sobrenadantes fueron descartados y luego de un lavado con FACS-EDTA las células se resuspendieron en 50 µl de la misma solución.

Para el marcado de epítopes de superficie, las suspensiones celulares se incubaron por 30 min a 4 °C con anticuerpos monoclonales específicos conjugados a fluorocromos en dilución 1/1000, (anti CD4-APC Cy7, anti-CD3 PerCP y anti CD8-PE Cy7, BD).

Luego de lavadas en 1 ml de PBS, las células se resuspendieron en una solución de paraformaldeído 1% v/v final y se incubaron en la oscuridad en hielo por 20 minutos. Las suspensiones celulares se lavaron nuevamente en PBS y luego se resuspendieron en 50 μ l de la solución de permeabilización PBS-S-BSA (PBS suplementado con 0.1% w/v isotópicos, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 0.1% w/v BSA, 10 mM HEPES, pH to 7.4). Las suspensiones celulares se incubaron por 30 minutos en hielo, en la oscuridad y se procedió al marcado mediante agregado de 50 μ l de una solución 2X de anticuerpos específicos contra las citoquinas IL17 e IFN- γ (IL17-PE, IFN- γ -APC, BD) o los controles isotópicos adecuados durante 30 minutos en hielo y en oscuridad.

Tras un lavado, las células fueron resuspendidas en FACS-EDTA y analizadas en un citómetro FACS Canto II (Becton-Dickinson). Los porcentajes de cada población fueron analizados en FACS-Diva Software.

III. 7. Evaluación de carga bacteriana en Bazo y Pulmón

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y de cada uno fueron extraídos los pulmones y el bazo. Individualmente y bajo esterilidad los órganos se disgregaron mecánicamente en homogeneizador manual y se resuspendieron en 1 ml de PBS estéril. A partir de este homogeneizado se realizaron diluciones seriadas 1/10 que fueron sembradas en placas de agar-sangre para el recuento UFC. La carga bacteriana de *S. pneumoniae* se determinó como UFC/órgano.

III.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Para comparación entre grupos se utilizó el test ANOVA de una vía con test de comparación multiple de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$).

IV. Resultados

Tanto durante la etapa de colonización como durante la infección, antes de acceder al medio interno *S. pneumoniae* interacciona con el hospedero a nivel de las superficies mucosas, en particular con la mucosa nasofaríngea y del tracto respiratorio alto. Por este motivo, y como se discutió anteriormente, el desarrollo de nuevas vacunas antineumocócicas de aplicación mucosa resulta una alternativa atractiva para inducir inmunidad local y protección a nivel de la “puerta de entrada”.

Diferentes estudios han señalado a la ruta sublingual como una alternativa segura capaz de inducir inmunidad protectora en el tracto respiratorio. Durante varias décadas agentes terapéuticos y/o profilácticos, en particular en lisados bacterianos, han sido administrados por ruta sublingual para el tratamiento de afecciones respiratorias recurrentes [176-178] Más recientemente, un trabajo realizado en el modelo murino demostró que la administración sublingual de una formulación preparada en base a una cepa inactivada de neumococo portadora de una variante no hemolítica de neumolisina, es capaz de conferir protección frente a la colonización nasofaríngea. El trabajo sin embargo, no evaluó la eficacia de la formulación en la prevención de la neumonía [170]. Si bien el uso de lisados o preparaciones basadas en microorganismos inactivados ha sido exitoso en términos generales, el empleo de combinaciones definidas de antígenos podría ser ventajosa para la mejor caracterización de las formulaciones y obtención de mayor reproducibilidad entre diferentes lotes, caracterización de los mecanismos inmunes involucrados en la respuestas protectoras y para manipular la respuesta inmune de modo de favorecer un perfil específico, por ejemplo promoviendo el desarrollo de respuestas humorales y celulares del tipo Th1/Th17. Sin embargo, los reportes sobre la eficacia de vacunas sublinguales basadas en antígenos purificados son limitados. Particularmente, en cuanto a las vacunas antineumocócicas de administración sublingual basadas en antígenos definidos, hasta la fecha no existen reportes acerca de su uso en ensayos clínicos ni tampoco a nivel preclínico. Por lo tanto, en el contexto de la generación de nuevas vacunas antineumocócicas, explorar la capacidad de formulaciones de aplicación sublingual basadas en antígenos definidos de neumococo resulta interesante.

A lo largo de las siguientes secciones se presentan los resultados correspondientes a la evaluación de diferentes antígenos de neumococo purificados como candidatos para la formulación de vacunas antineumocócicas.

Dado que los polisacáridos capsulares son el antígeno presente en las formulaciones actualmente disponibles, como primera aproximación para abordar este objetivo se seleccionó el polisacárido capsular de tipo 1. Este serotipo resulta interesante desde el punto de vista clínico, ya que cepas de neumococo con este polisacárido capsular suelen estar asociadas al desarrollo de neumonía invasiva [32]. Nuestro laboratorio cuenta con un aislado clínico de este serotipo capaz de generar una manifestación similar en el modelo murino, lo que permite estudiar la protección conferida tras la vacunación sublingual en un modelo animal de neumonía invasiva [48, 174, 175]. Estos resultados se presentan a continuación en la Sección IV.1.

En segunda instancia, y con el fin de investigar antígenos capaces de promover protección independiente de serotipo, se realizaron experimentos empleando variantes no tóxicas de neumolisina como ejemplos de antígenos proteicos para la formulación de vacunas antineumocócicas de aplicación sublingual. Estos resultados se presentan en las secciones VI.2 y IV.4.

IV.1. Vacunación sublingual con PnPs

Con el fin de evaluar la eficacia e inmunogenicidad de una vacuna polisacáridica de aplicación sublingual, se empleó el modelo murino de vacunación sublingual previamente puesto a punto en nuestro laboratorio, trabajo también realizado en el contexto de este trabajo de grado, tal y como se describió en [175] (ver apéndice). Este trabajo previo y datos provenientes de inmunizaciones por ruta intranasal, permitieron determinar la mínima dosis requerida para la vacunación sublingual. Cabe destacar que la dosis de polisacárido requerida para la vacunación sublingual fue de 100 μg /ratón, lo que equivale a una dosis 10 veces mayor a la empleada por ruta intranasal. El requerimiento de tan alta dosis seguramente se debe a que la degradación de los antígenos es mayor en la cavidad bucal que en la nasofaringe, y a que la constante exposición de la mucosa sublingual a los alimentos probablemente hace que sea más refractaria a montar una respuesta inmune de gran magnitud. Naturalmente, la gran cantidad de antígeno requerida limitó el número de animales a ser inmunizados.

La figura 2 muestra el resultado de la inmunización sublingual de ratones C57BL/6j con una única dosis de PnPs 1 y posterior desafío letal con neumococo. Como control de sobrevida se empleó un modelo de protección por exposición a una dosis subletal por

ruta intranasal de la misma cepa que se empleó para el desafío letal, previamente establecido por nuestro grupo de investigación [48]; como control negativo se emplearon animales vacunados con solución salina. Diez días después de la vacunación o desafío subletal todos los grupos fueron desafiados por ruta intranasal con una dosis letal de *S. pneumoniae* serotipo 1 y la sobrevivida de los animales fue registrada diariamente durante 8 días.

Tal como ilustra el panel C de la figura 2, una única dosis de 100 µg de PnPs 1 administrada por ruta sublingual fue capaz de conferir una protección del 60% frente a un desafío letal con una cepa de tipo capsular homólogo. Contrariamente, ninguno de los animales del grupo control que recibieron salina sobrevivió al desafío. Al igual que en los reportes previos [48], el 100% de los animales expuestos a la dosis subletal de bacterias por ruta intranasal sobrevivió al desafío letal homólogo.

Este resultado sugiere por primera vez que la inmunización sublingual con una única dosis de un antígeno polisacárido purificado y en ausencia de adyuvantes, es capaz de conferir protección en un modelo murino de neumonía invasiva causada por una cepa de tipo capsular homólogo.

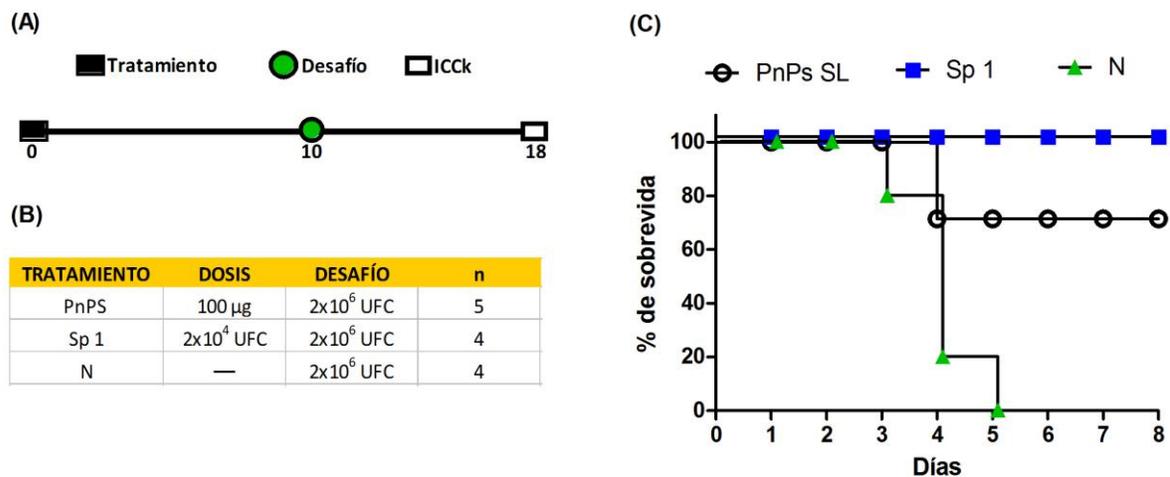


Fig 2. Vacunación sublingual con PnPs 1 y sobrevivida frente al desafío letal homólogo. Ratones C57BL/6j fueron tratados con 100 µg de PnPs 1 por vía sublingual. Como control de protección un grupo de animales fue desafiado por ruta intranasal con una dosis subletal de Sp1 (2x10⁴ UFC); como control negativo se emplearon ratones naive. Diez días después todos los grupos fueron desafiados con una dosis letal de Sp1 (2x10⁶ UFC). La sobrevivida se siguió 8 días después del desafío. (A) Esquema del experimento. (B) Tratamiento y grupos. (C) Sobrevivida luego de desafío letal.

Tanto en investigaciones de nuestro laboratorio [48] como de otros grupos [113, 179, 180], se ha reportado que IL-17 e IFN- γ tiene un rol importante en la protección contra *S. pneumoniae*. En particular nuestro grupo ha demostrado que animales protegidos tras exposición a un desafío i.n. subletal con la cepa de serotipo 1 y redesafío con una dosis letal de la misma cepa, muestran un incremento de células T CD4⁺ productoras de IL-17 y células CD45⁺CD4⁻ productoras de IFN- γ en los pulmones.

Con el fin de determinar si la vacunación s.l. con PnPs 1 inducía un perfil similar al ya observado en los animales protegidos, 2 sobrevivientes de cada grupo fueron sacrificados 8 días post desafío y se les extrajeron ganglios submandibulares, mediastinales y pulmones para el análisis de poblaciones celulares productoras de IFN- γ y IL-17 tras restimulación con PMA/ionomicina por citometría de flujo, según la estrategia de análisis mostrada en la figura 3A.

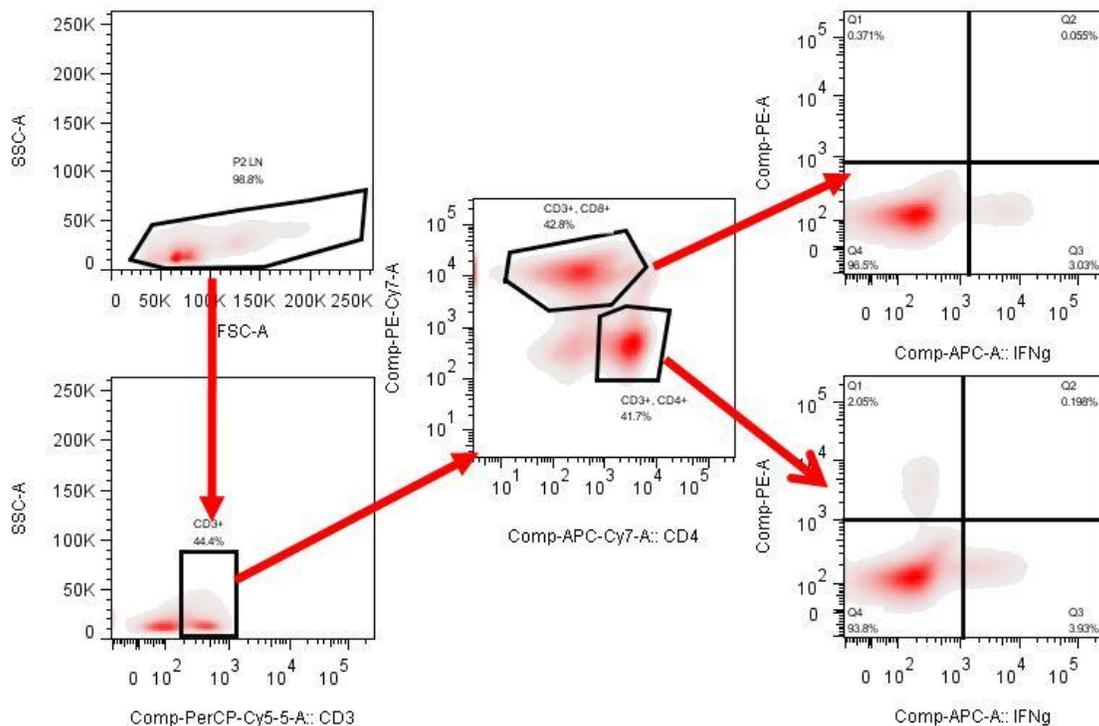


Fig. 3A. Estrategia utilizada para el análisis de poblaciones celulares productoras de IFN γ e IL-17 de ganglios mediastinales, submandibulares y pulmones. Del total de eventos analizados en cada muestra, en primer lugar fueron seleccionados por forward/side scatter los linfocitos (población P2). Dentro de esta población a su vez se seleccionaron los CD3⁺ y luego se analizaron por separado las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ para la expresión de IFN γ e IL – 17.

El análisis de los resultados en los ganglios submandibulares reveló que en los animales vacunados con PnPs 1 por ruta s.l. un 4.6% de células T CD4⁺ eran productoras de IL-17 en comparación con un 0.1% en el grupo naive y 0.7% en el grupo que protegido por exposición a la infección subletal. Esto representa un aumento de las células T productoras de IL-17 de 46 veces en el grupo vacunado respecto al control y de 6.6 veces respecto al grupo protegido por exposición a la dosis subletal de neumococo (figura 3B panel ii).

En cambio, a nivel de pulmón los animales vacunados con PnPs 1 por ruta s.l. mostraron un aumento modesto, de 1.5 veces respecto al grupo naive, mientras que los los animales protegidos por exposición a la dosis subletal de neumococo mostraron un incremento de 4 veces en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-17 respecto al mismo grupo control (Figura 3B, panel i).

El análisis de la respuesta en ganglios mediastinales reveló que sólo los animales expuestos al desafío subletal incrementaron el porcentaje de células T CD4⁺ productoras de IL-17 tras la restimulación con PMA/ionomicina en este sitio anatómico (Figura 2B, panel iii).

Aunque en menor medida, también se observó que existe un porcentaje aumentado de células CD4⁺ productoras de IFN- γ en los ganglios submandibulares de los ratones vacunados con PnPs 1 que no se observa en el caso de los animales expuestos al desafío subletal, que en cambio sí mostraron un incremento en estas células solamente en los ganglios mediastinales (Figura 3B, paneles ii y iii respectivamente).

En cuanto a las células T CD8⁺, se encontró que únicamente los animales vacunados por ruta s.l. presentan un incremento de CD8⁺ productoras de IFN γ en los ganglios submandibulares (Figura 3B, panel v).

A pesar de que por el reducido número de animales utilizado estos resultados son de carácter preliminar, como se mencionó anteriormente comprenden el primer antecedente de protección frente a un desafío letal mediante la administración s.l. de un antígeno purificado de neumococo, en particular de un antígeno polisacárido. Además, la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ observada sugiere el potencial de la ruta en cuanto a la generación de inmunidad celular protectora en línea con lo reportado en la bibliografía [168, 176].

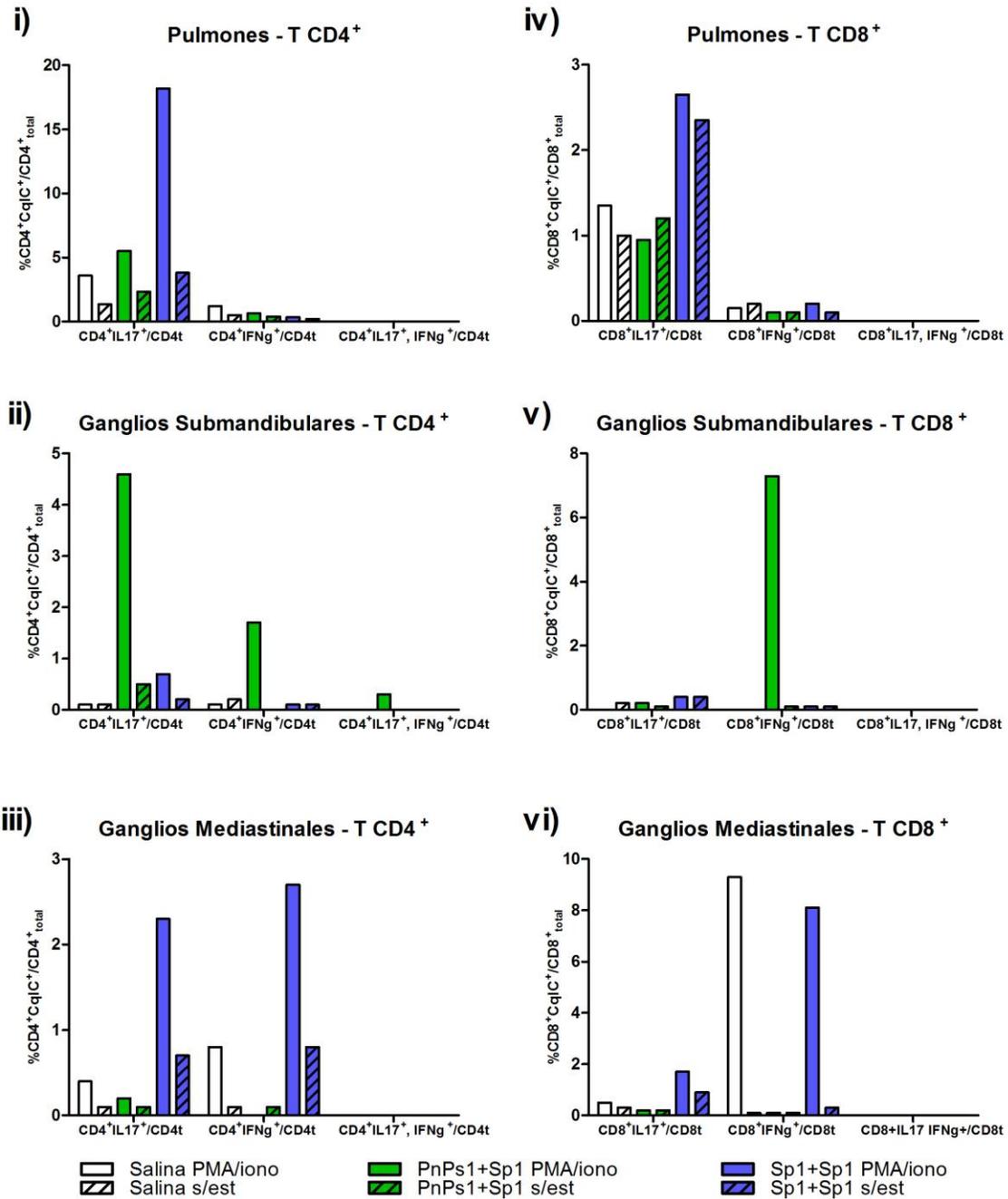


Fig. 3B. Células productoras de IFN γ e IL-17 en pulmones, ganglios submandibulares y mediastinales. Diez días post desafío letal, se extrajeron ganglios sub mandibulares, mediastinales y pulmones de 2 sobrevivientes de cada grupo. La producción intracelular de IFN γ e IL-17 en células T frente a una re-estimulación *in vitro* con PMA/Ionomicina (ICCK) se analizó por citometría de flujo. Las barras representan la media de expresada como porcentaje de células productoras de las citoquinas en función del total de células CD4⁺ o CD8⁺ de cada par de individuos. Las barras sólidas representan estimulación con PMA/ionomicina y las barras rayadas de igual color el control sin estimular para cada grupo.

IV.2. Vacunación sublingual con PLYAΔ146

Para investigar la capacidad inmunogénica de antígenos proteicos administrados por ruta s.l. se emplearon neumolisinas recombinantes no hemolíticas. Como primera aproximación, la variante no hemolítica PLYAΔ146 previamente estudiada y empleada como antígeno para la formulación de vacunas antineumocócicas en modelos experimentales [142] fue empleada para vacunar ratones BALB/c por ruta sublingual.

Paralelamente y a fin de investigar si la pérdida de actividad hemolítica afecta la inmunogenicidad de la proteína, un grupo de ratones fue vacunado con un recombinante PLYa producido en las mismas condiciones pero que cuenta con actividad hemolítica comparable a la neumolisina salvaje. En todos los casos los animales recibieron 3 dosis de 30 µg de cada proteína a intervalos de 2 semanas.

Los niveles de anticuerpos IgG totales anti-neumolisina en suero fueron evaluados por ELISA previo a la primera inmunización, previo a cada uno de los recuerdos y cuatro semanas luego de la tercera y última administración (Figura 4A). Únicamente se observaron diferencias apreciables luego de la tercera dosis por lo que todos los análisis mostrados corresponden al último sangrado.

Los animales vacunados con PLYa mostraron un aumento importante de los niveles de IgG específicos, siendo la media aritmética 30 veces mayor al día 60 luego de tres dosis en comparación con los títulos a día 0 previo a la vacunación. Para el caso de los animales vacunados con PLYAΔ146 las diferencias no fueron apreciables (Figura 4B).

Estos resultados sugieren que mediante la administración sublingual de antígenos proteicos purificados de neumococo se logra inducir una respuesta adaptativa humoral específica a nivel sistémico.

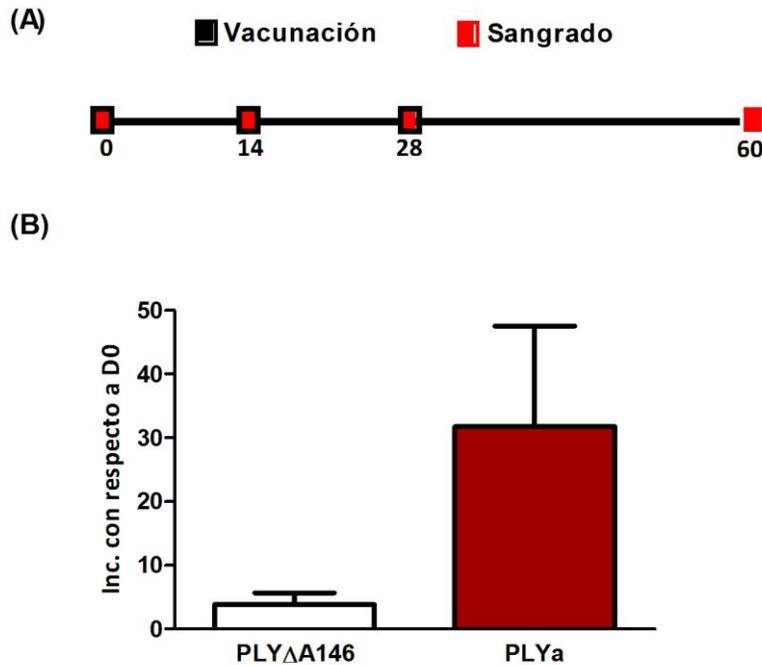


Fig 4. Vacunación sublingual con dos variantes de PLY. Respuesta humoral IgG. Tres dosis sublinguales de 30 μ g fueron administradas en ratones C57BL/6j los días 0, 14 y 28. Un grupo recibió la variante no hemolítica PLY Δ A146 (n=9) y el otro la variante hemolítica PLYa (n=3). (A) Esquema de vacunación. (B) La gráfica muestra los resultados del análisis realizado por ELISA de los niveles de anticuerpos IgG totales anti neumolisina en suero extraído en D60. Los resultados se expresan como la media del incremento respecto al día 0 de cada animal \pm SD.

A pesar de que la variante hemolítica PLYa no mostró efectos tóxicos tras ser administrada por ruta s.l., su gran potencial citotóxico hace que no sea del todo adecuada para la formulación de vacunas. Por su capacidad hemolítica reducida las variantes toxoides son candidatos más aptos para vacunación, sin embargo PLY Δ A146 en este esquema no fue capaz de inducir un aumento apreciable de los niveles de IgG al ser administrada sola. Para inducir una respuesta humoral satisfactoria se planteó investigar otros esquemas de inmunización con mayores dosis y también empleando adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad de la formulación.

IV.3. Producción de PLYt

Puesto que la disponibilidad de PLY Δ A146 era limitada, y para descartar que lo observado fuese una particularidad del toxoide empleado, se procedió a la producción

PLYt, otro toxoide carente de actividad hemolítica generado anteriormente en nuestro laboratorio.

PLYt se produjo a partir de la cepa recombinante *E. coli* W3110-056 portadora del plásmido pPACIB.9 con el gen de neumolisina que carece del segmento carboxilo terminal asociado a la toxicidad según el protocolo esquematizado en la Figura 5, panel A.

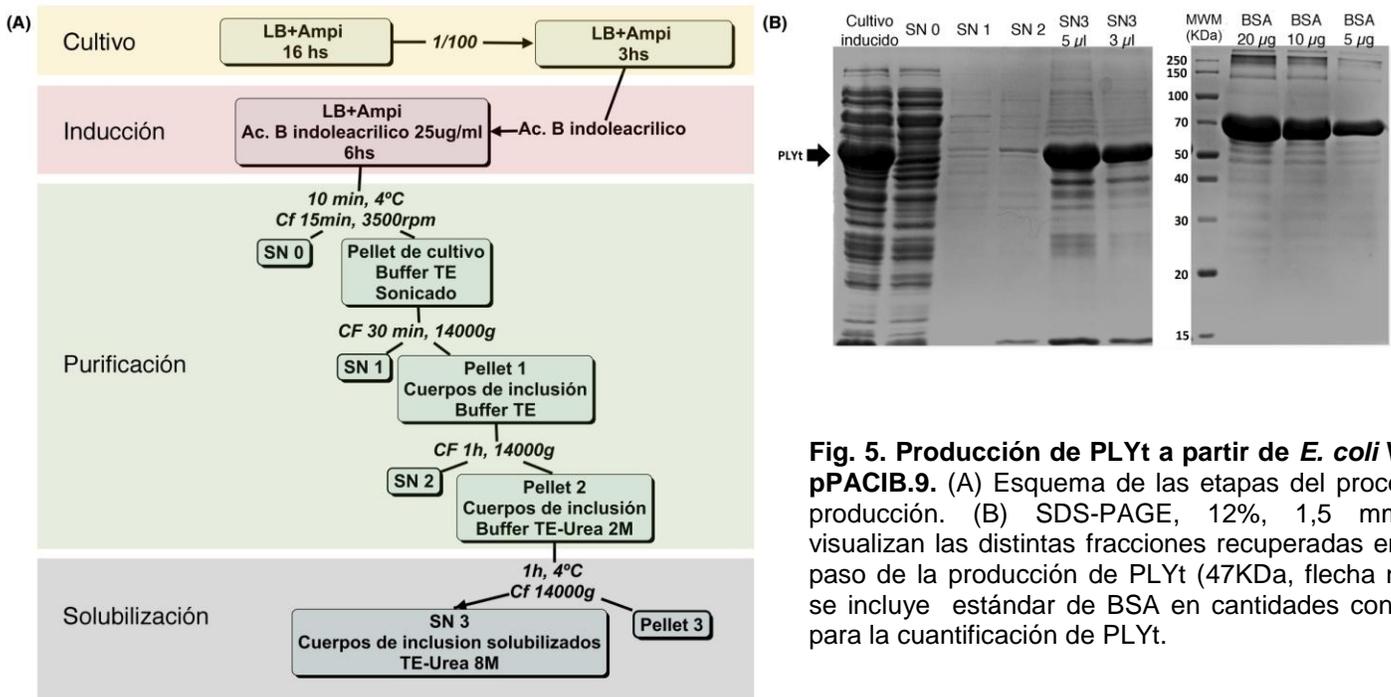


Fig. 5. Producción de PLYt a partir de *E. coli* W3110 pPACIB.9. (A) Esquema de las etapas del proceso de producción. (B) SDS-PAGE, 12%, 1,5 mm. Se visualizan las distintas fracciones recuperadas en cada paso de la producción de PLYt (47KDa, flecha negra), se incluye estándar de BSA en cantidades conocidas para la cuantificación de PLYt.

Las diferentes fracciones recogidas en las diferentes etapas de purificación se analizaron en gel de poliacrilamida (Figura 5 B), observándose una banda de ~50 KDa, concordante con el peso molecular esperado para PLYt [144]. La banda correspondiente a PLYt fue la banda mayoritaria incluso en la fracción total del cultivo inducido (banda ausente en fracciones de cultivo de W3110 no transformadas) indicando que PLYt es producida en gran cantidad. En los pasos siguientes de purificación la mayoría de las otras proteínas fueron eliminadas en las fracciones solubles (SN0, SN1 y SN2), permitiendo enriquecer las fracciones insolubles en PLYt, la

cual fue luego solubilizada para dar lugar a la fracción final SN3. En la fracción final del proceso se conservó la gran mayoría de la proteína de interés; la pureza se estimó por densitometría de bandas siendo de alrededor del 95%. Si bien se observan otros productos proteicos que co-purificaron con PLYt, éstos son minoritarios. La proteína recombinante porta una cola de poli-histidina que podría emplearse para purificar PLYt por cromatografía de afinidad utilizando una columna de níquel-agarosa. Sin embargo, los antecedentes en nuestro laboratorio indican que dicho procedimiento de purificación no resulta en una mayor pureza y provoca una importante disminución en el rendimiento de la purificación. En ausencia de purificación adicional el rendimiento del protocolo descrito fue de 193 mg PLYt/L cultivo.

Este protocolo de producción y purificación de PLYt permitió obtener suficiente cantidad de proteína con un grado de pureza relativa alto y apto para su uso en experimentos de vacunación sublingual.

IV.4. Vacunación sublingual con PLYt

Dado que la variante no hemolítica PLY Δ A146 empleada anteriormente no resultó suficientemente inmunogénica, se procedió a evaluar el efecto de la utilización de un adyuvante en la formulación. Para ello, se administró la nueva variante no hemolítica PLYt, sola o en conjunto con Toxina Colérica (CT), la cual ha mostrado ser un potente adyuvante por ruta s.l. [167] o flagelina purificada de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (FliC), agonista de TLR5 (del inglés, Toll-like Receptor 5) y NLRC4 (del inglés, Nod-like receptor CARD domain-containing protein 4), molécula que también posee un potente efecto adyuvante cuando es administrada por vía i.n. [181, 182] ; y por ruta s.l. [183]

En este caso, los animales fueron vacunados con 4 dosis de 50 μ g de PLYt sola o con adyuvantes, administradas por ruta s.l. a intervalos de una semana. El análisis de los niveles de anticuerpos IgG totales de sueros extraídos a día 0 y 45 (Figura 6B) indicó que tanto los ratones vacunados con PLYt sola como en los que recibieron PLYt junto con CT presentan niveles de IgG total específica significativamente aumentados respecto a día 0. El grupo PLYt+FliC no presentó diferencias significativas aunque hay una tendencia al aumento respecto a día 0. A día 70 las diferencias son aún mayores en

los tres grupos y aunque no llegan a ser significativas en el grupo PLYt+FliC la tendencia al incremento parece también evidente.

Con el fin de evaluar la eficacia de la vacunación sublingual en este modelo preclínico, la mitad de los ratones de cada grupo fueron desafiados con una dosis letal de *S. pneumoniae* por ruta i.n. y se midió la protección conferida a nivel local y sistémico mediante recuento de UFC en pulmones y bazo respectivamente, cuarenta horas después del desafío.

La figura 6C muestra el resultado del recuento en pulmones. Todos los grupos mostraron una clara tendencia de disminución de la carga bacteriana en pulmones con respecto al grupo naive, y los niveles entre los diferentes grupos de tratamiento.. En cambio a nivel de bazo, las diferencias entre grupos son más dispares y la tendencia no es tan clara.

Los resultados indican que la respuesta inmune generada por la vacunación sublingual con neumolisina confiere protección parcial contra la neumonía aguda disminuyendo la carga bacteriana a nivel pulmón.. Sin embargo, la vacunación no fue capaz de prevenir la invasión hacia el torrente sanguíneo cuando los animales fueron desafiados 50 días después de la última inmunización. En concreto, la administración sublingual de neumolisina recombinante purificada es capaz de inducir una producción significativa de anticuerpos sistémicos específicos y protección local a nivel pulmonar frente a un desafío letal con *S. pneumoniae* pero no previno la diseminación de la infección.

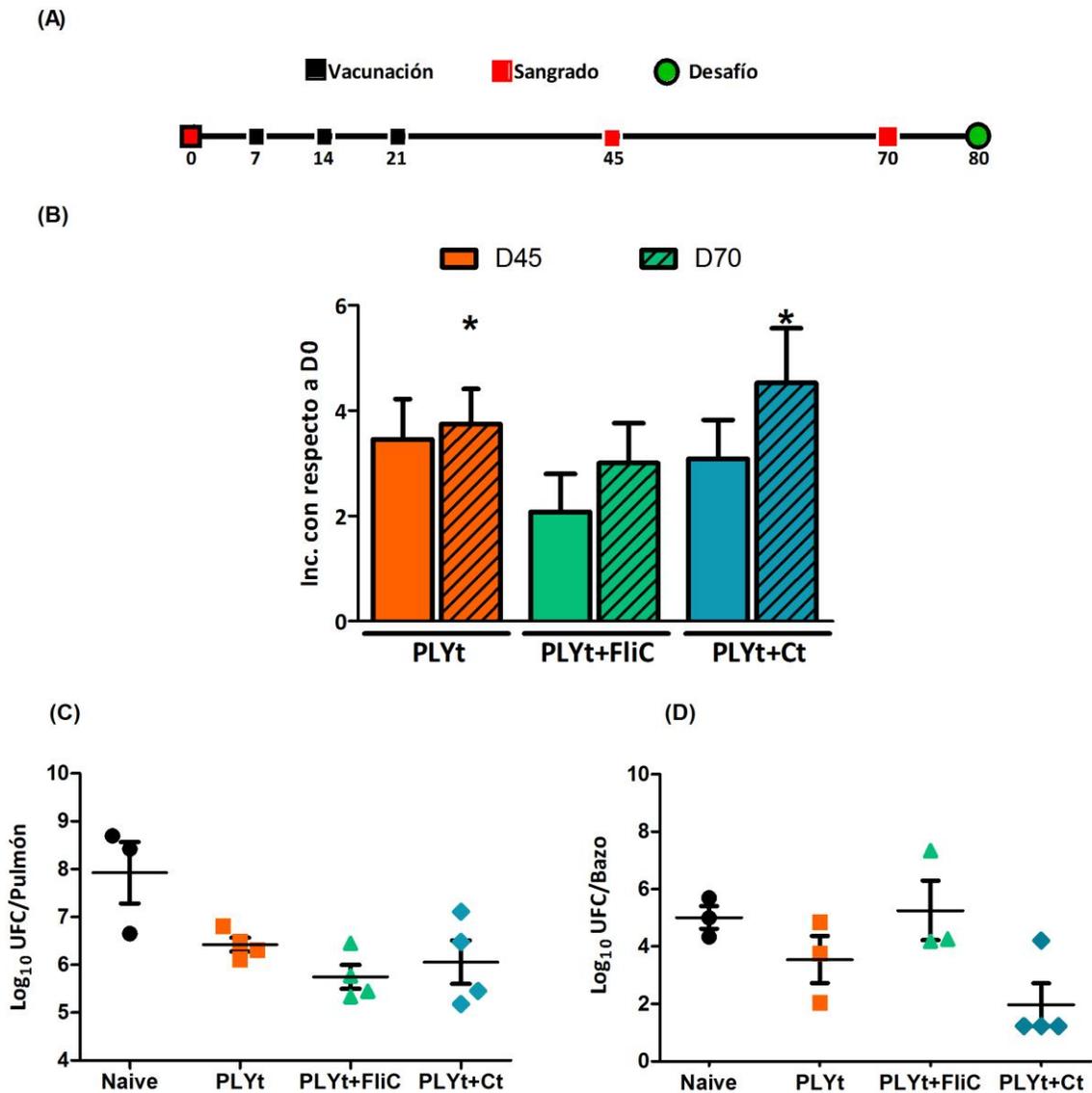


Fig 6. Vacunación sublingual con PLYt y adyuvantes. Respuesta humoral y protección frente al desafío letal. Cuatro dosis sublinguales de 50 μ g de PLYt fueron administradas a ratones BALB/c ($n=8$) en los días 0, 7, 14 y 21. Los animales recibieron la proteína sola (barras anaranjadas), en conjunto con 10 μ g de Flagelina purificada (FliC) (barras verdes) o con 2 μ g de toxina colérica (Ct, barras azules). (A) Esquema del experimento. (B) Análisis por ELISA de los niveles de anticuerpos IgG totales anti neumolisina de sueros extraídos a día 45 y día 70. Los resultados están expresados como diferencia del día indicado con respecto a D0. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a D0 evaluado por ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$). (C-D) Evaluación de la carga bacteriana en pulmón y bazo 40 h luego del desafío letal con *S. pneumoniae* (2×10^5 UFC) 80 días después de la primera dosis. No hubo diferencias significativas al evaluado por ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$)

V. Discusión

El polisacárido capsular es el principal factor de virulencia de neumococo y el antígeno en el que se basan las vacunas anti neumocócicas actuales. Previamente en nuestro laboratorio se estableció que la administración de PnPs 1 por ruta i.n. protege ratones frente a un desafío letal homólogo. En esta investigación se observó que una única administración del polisacárido capsular por ruta sublingual, confiere un 60% de protección frente a un desafío letal. Al momento es el primer antecedente reportado de protección contra neumonía aguda mediado por la administración sublingual de un antígeno purificado. El perfil de la protección conferida se vio asociada a la proliferación de linfocitos T productores de INF γ e IL-17. Esto representa un punto en común en el correlato inmunológico con otros antecedentes de protección contra la infección neumocócica de nuestro y otros grupos [48][180]

Comparada con otras rutas mucosas, sobre todo con respecto a la ruta i.n., una de las principales características de la inmunización s.l. es que requiere dosis mayores. En este caso la protección por vacunación s.l. requirió una dosis de PnPs de 10 a 50 veces mayor que la utilizada por ruta i.n. en el mismo modelo, lo que se encuentra dentro de lo reportado en la bibliografía para otros modelos. Por otro lado, en los animales vacunados por ruta sublingual no hubo estimulación a nivel de ganglios mediastinales por lo menos en los parámetros evaluados, así como no hubo estimulación a nivel de ganglios submandibulares en los vacunados por ruta i.n. Estos resultados confirman que el sitio inductor de la administración sublingual en el ratón son los ganglios submandibulares.

Para continuar con la caracterización de esta protección, en futuras investigaciones sería razonable buscar dilucidar el correlato humoral de los animales protegidos. Especialmente evaluar la respuesta de anticuerpos específicos contra PnPs frente a la vacunación sublingual y su evolución luego del desafío letal para las sub clases IgM e IgG a nivel sistémico e IgA en secreciones.

La estrategia actual de vacunación presenta limitaciones impuestas por la variación antigénica y la naturaleza T independiente del polisacárido capsular de *S. pneumoniae*. Por esta razón, si bien las vacunas existentes han significado un gran avance en el control de la enfermedad neumocócica, no representan una solución definitiva. Desde hace décadas se busca desarrollar una vacuna anti neumocócica basada en un antígeno proteico y conservado entre los distintos serotipos. Por su importancia como factor de virulencia, neumolisina representa un candidato natural y existen varios

antecedentes pre clínicos de vacunación, pero hasta ahora ninguno por ruta sublingual. Debido a la toxicidad de la PLY salvaje, se han generado variantes no hemolíticas más seguras para inmunizar, que permiten ser administradas en dosis mayores sin provocar efectos perjudiciales.

La variante PLY Δ 146 presenta una delección aminoacídica puntual que reduce la capacidad de formación de poros sobre membranas eucariotas y carece de otras propiedades inmunológicas asociadas a la toxicidad. A pesar de esto retiene la misma capacidad que la variante salvaje de inducir una respuesta IgG al ser administrada por vía subcutánea con alúmina como adyuvante [142]. Aquí, al administrar PLY Δ 146 por ruta sublingual, no se observó un aumento de los niveles de anticuerpos IgG específicos en suero, por el contrario con el mismo esquema y dosis, al vacunar con la variante hemolítica los niveles aumentaron 6 veces. Al igual de lo que sucede con otras toxinas y en contraposición con lo reportado por los autores, en estas condiciones la variante toxoide es menos inmunogénica. Si bien esta tendencia es clara, debe tenerse en cuenta que estos resultados son preliminares. Debido al bajo número de animales vacunados con PLYa por la disponibilidad de la proteína, presentan variaciones interindividuales considerables y no son respaldados por la estadística. Por esta razón, la interpretación más relevante del ensayo es que la vacunación sublingual con variantes no hemolíticas requiere dosis mayores y/o administrar en conjunto con un adyuvante.

En nuestro laboratorio disponemos de PLYt, otra variante de neumolisina que presenta actividad hemolítica reducida por delección del extremo carboxilo terminal. El buen rendimiento de la cepa *E. coli* W3110 pPACIB.9 permite producir el antígeno de forma recombinante en alta concentración y cantidad y por lo tanto administrar dosis mayores a más cantidad de animales.

Los resultados demostraron mediante la administración sublingual de PLYt en estas condiciones, existe una producción de anticuerpos IgG específicos en suero, que alcanza a ser significativa tanto al administrar la proteína sola como en conjunto con CT. Este representa el primer antecedente de inducción de una respuesta humoral por administración s.l. de un antígeno purificado de neumococo. Los niveles se mantienen con tendencia al aumento hasta 50 días luego de la última dosis lo que indica la inducción de mecanismos de memoria inmunológica.

Como se encuentra reportado en la bibliografía [167] los resultados muestran una clara tendencia del potencial de CT como adyuvante sublingual. Por el contrario, el efecto

adyuvante de FliC no parece tan claro. Este resultado es por lo menos llamativo ya que en varias investigaciones se ha demostrado el potencial como adyuvante de FliC [181, 184]. Particularmente, en nuestro laboratorio previamente se demostró que FliC de *Salmonella Typhimurium* administrado por ruta sublingual estimula la respuesta innata y potencia la respuesta humoral en la co-administración con ovoalbúmina [174, 175]. Cabe especular que la naturaleza del antígeno pueda influir en la capacidad adyuvante de FliC.

Hay elementos para sostener que la vacunación sublingual con PLYt puede tener valor protector ante un desafío letal, lo cual sería un resultado de gran relevancia.

Frente a un desafío letal con serotipo 1, a nivel de pulmón en todos los grupos hay una clara tendencia de reducción de la carga bacteriana. A nivel sistémico no es tan clara la tendencia, pero se relaciona con la producción de anticuerpos IgG en suero lo que apoya el resultado. El correlato de la protección generada en pulmón no parece estar enteramente relacionado con los niveles de anticuerpos IgG, por lo que vendría dado por otro aspecto de respuesta inmune inducido por la vacunación sublingual con PLYt.

La inducción de otras subclases de anticuerpos podrían complementar el correlato de la protección observada. La neutralización de la actividad de la neumolisina en el contexto de la infección pulmonar significaría una reducción del estado inflamatorio que en última instancia favorece la supervivencia y diseminación de la bacteria y compromete el intercambio gaseoso. En futuras investigaciones se buscará evaluar especialmente la producción de IgA, pero también de IgM frente a la vacunación.

En su conjunto los resultados obtenidos demuestran el potencial de la ruta de vacunación sublingual en cuanto a su uso como tratamiento profiláctico frente a infecciones respiratorias. Mediante la administración sublingual de 2 antígenos de distinta naturaleza, se induce una respuesta inmune adaptativa, humoral y de linfocitos T. Este tratamiento es capaz de conferir protección frente a un desafío letal de *S. pneumoniae* en modelo de neumonía aguda en términos de sobrevivencia y reducción de la carga bacteriana a nivel de pulmón.

Tanto al vacunar con PnPs o al vacunar con las dos variantes de PLY se observan diferencias interindividuales importantes. Las diferencias en términos de sobrevivencia o títulos de anticuerpos pueden deberse a variaciones en la cantidad de antígeno muestreada por el sistema inmune en cada administración. Los mecanismos de captación y procesamiento a nivel sublingual requieren de investigaciones adicionales y se considera uno de los puntos más importantes para el avance de esta ruta.

Adicionalmente, encontrar estrategias apropiadas en la utilización de adyuvantes y vehículos que puedan disminuir la variación interindividual observada y potencien la respuesta generada. Así mejorar el rendimiento de las administraciones, lo que permita reducir la dosis y el número de administraciones.

VI. Referencias

1. McGhee, J.R. and K. Fujihashi, *Inside the mucosal immune system*. PLoS Biol, 2012. **10**(9): p. e1001397.
2. Cesta, M.F., *Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue*. Toxicol Pathol, 2006. **34**(5): p. 599-608.
3. Fujikuyama, Y., et al., *Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity*. Expert Rev Vaccines, 2012. **11**(3): p. 367-79.
4. Lamichhane, A., T. Azegami, and H. Kiyono, *The mucosal immune system for vaccine development*. Vaccine, 2014. **32**(49): p. 6711-6723.
5. Pavot, V., et al., *New insights in mucosal vaccine development*. Vaccine, 2012. **30**(2): p. 142-54.
6. Lycke, N., *Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(8): p. 592-605.
7. Holmgren, J. and C. Czerkinsky, *Mucosal immunity and vaccines*. Nat Med, 2005. **11**(4 Suppl): p. S45-53.
8. WHO, *The top 10 causes of death*, in *Fact Sheet*. 2013, World Health Organization.
9. Trotter, C.L., et al., *Increasing hospital admissions for pneumonia, England*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(5): p. 727-33.
10. Niederman, M., *In the clinic. Community-acquired pneumonia*. Ann Intern Med, 2009. **151**(7): p. ITC4-2-ITC4-14; quiz ITC4-16.
11. Postma, D.F., et al., *New trends in the prevention and management of community-acquired pneumonia*. Neth J Med. **70**(8): p. 337-48.
12. Pavia, A.T., *What is the role of respiratory viruses in community-acquired pneumonia?: What is the best therapy for influenza and other viral causes of community-acquired pneumonia?* Infect Dis Clin North Am, 2012. **27**(1): p. 157-75.
13. Martin, A.A., et al., *Aetiology and diagnosis of community acquired pneumonia and its complicated forms*. An Pediatr (Barc), 2012. **76**(3): p. 162 e1-18.
14. Gentile, A., et al., *Epidemiology of community-acquired pneumonia in children of Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis*. Int J Infect Dis, 2012. **16**(1): p. e5-15.
15. WHO. *Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age, 2008*. 2008 [cited; Available from: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/Pneumo_hib/en/].
16. Pachon, J., et al., *Severe community-acquired pneumonia. Etiology, prognosis, and treatment*. Am Rev Respir Dis, 1990. **142**(2): p. 369-73.
17. Liu, H., et al., *[Study on epidemic characteristics and etiology of community acquired pneumonia in Guangzhou from 2009 to 2012]*. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2012. **47**(12): p. 1089-94.
18. Salyers and Whitt, *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. 2nd ed. 2002: ASM Press.
19. Joklik, et al., *Zinsser Microbiología* 20 ed. 1994: Editorial Médica Panamericana.
20. Bogaert, D., et al., *Colonisation by Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus in healthy children*. Lancet, 2004. **363**(9424): p. 1871-2.
21. van der Poll, T. and S.M. Opal, *Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia*. Lancet, 2009. **374**(9700): p. 1543-56.
22. CDC, *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 2012.

23. Brown, A.O., et al., *Streptococcus pneumoniae translocates into the myocardium and forms unique microlesions that disrupt cardiac function*. PLoS Pathog, 2014. **10**(9): p. e1004383.
24. Jambo, K.C., et al., *Potential role for mucosally active vaccines against pneumococcal pneumonia*. Trends Microbiol, 2009. **18**(2): p. 81-9.
25. Kadioglu, A., et al., *The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(4): p. 288-301.
26. Turner, D. and R. Taylor, *Pneumonia: Parliament unites to tackle global problem*. BMJ, 2008. **336**(7638): p. 233-4.
27. O'Brien, K.L., et al., *Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates*. Lancet, 2009. **374**(9693): p. 893-902.
28. Mook-Kanamori, B.B., et al., *Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(3): p. 557-91.
29. Song, J.Y., M.H. Nahm, and M.A. Moseley, *Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance*. J Korean Med Sci, 2013. **28**(1): p. 4-15.
30. Sleeman, K.L., et al., *Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of Streptococcus pneumoniae in a population of children*. J Infect Dis, 2006. **194**(5): p. 682-8.
31. Hausdorff, W.P., D.R. Feikin, and K.P. Klugman, *Epidemiological differences among pneumococcal serotypes*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(2): p. 83-93.
32. Ritchie, N.D., T.J. Mitchell, and T.J. Evans, *What is different about serotype 1 pneumococci?* Future Microbiol, 2012. **7**(1): p. 33-46.
33. Hausdorff, W.P., et al., *Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I*. Clin Infect Dis, 2000. **30**(1): p. 100-21.
34. Camou, T., et al., *Invasive pneumococcal diseases in Uruguayan children: comparison between serotype distribution and conjugate vaccine formulations*. Vaccine, 2003. **21**(17-18): p. 2093-6.
35. Hortal, M., et al., *Pneumococcal pneumonia in hospitalized Uruguayan children and potential prevention with different vaccine formulations*. J Pediatr, 2008. **152**(6): p. 850-3.
36. Hortal, M., et al., *Hospitalized children with pneumonia in Uruguay: pre and post introduction of 7 and 13-valent pneumococcal conjugated vaccines into the National Immunization Program*. Vaccine, 2012. **30**(33): p. 4934-8.
37. Jedrzejewski, M.J., *Pneumococcal virulence factors: structure and function*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(2): p. 187-207 ; first page, table of contents.
38. AlonsoDeVelasco, E., et al., *Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines*. Microbiol Rev, 1995. **59**(4): p. 591-603.
39. Nelson, A.L., et al., *Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance*. Infect Immun, 2007. **75**(1): p. 83-90.
40. Mantegazza, A.R., et al., *Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II*. Traffic, 2014. **14**(2): p. 135-52.
41. Vyas, J.M., A.G. Van der Veen, and H.L. Ploegh, *The known unknowns of antigen processing and presentation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 607-18.
42. Martin, F. and J.F. Kearney, *B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory"*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 70-9.
43. Weintraub, A., *Immunology of bacterial polysaccharide antigens*. Carbohydr Res, 2003. **338**(23): p. 2539-47.

44. Baxendale, H.E., et al., *Natural human antibodies to pneumococcus have distinctive molecular characteristics and protect against pneumococcal disease*. Clin Exp Immunol, 2008. **151**(1): p. 51-60.
45. Kalka-Moll, W.M., et al., *Zwitterionic polysaccharides stimulate T cells by MHC class II-dependent interactions*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6149-53.
46. Cobb, B.A. and D.L. Kasper, *Zwitterionic capsular polysaccharides: the new MHCII-dependent antigens*. Cell Microbiol, 2005. **7**(10): p. 1398-403.
47. Velez, C.D., et al., *Type I Streptococcus pneumoniae carbohydrate utilizes a nitric oxide and MHC II-dependent pathway for antigen presentation*. Immunology, 2009. **127**(1): p. 73-82.
48. Marques, J.M., et al., *Protection against Streptococcus pneumoniae serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN-gamma-mediated immunity*. Immunobiology, 2011. **217**(4): p. 420-9.
49. Nieto, P.A., et al., *Gene elements that regulate Streptococcus pneumoniae virulence and immunity evasion*. Curr Gene Ther, 2013. **13**(1): p. 51-64.
50. Shaper, M., et al., *PspA protects Streptococcus pneumoniae from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5031-40.
51. Hammerschmidt, S., et al., *Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of Streptococcus pneumoniae via a hexapeptide motif*. Mol Microbiol, 2000. **36**(3): p. 726-36.
52. Zhang, J.R., et al., *The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells*. Cell, 2000. **102**(6): p. 827-37.
53. Dave, S., et al., *Dual roles of PspC, a surface protein of Streptococcus pneumoniae, in binding human secretory IgA and factor H*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 471-7.
54. Berry, A.M. and J.C. Paton, *Additive attenuation of virulence of Streptococcus pneumoniae by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins*. Infect Immun, 2000. **68**(1): p. 133-40.
55. Berry, A.M., et al., *Contribution of autolysin to virulence of Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun, 1989. **57**(8): p. 2324-30.
56. Canvin, J.R., et al., *The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus*. J Infect Dis, 1995. **172**(1): p. 119-23.
57. Kalin, M., et al., *Diagnosis of pneumococcal pneumonia by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to pneumococcal hemolysin (pneumolysin)*. J Clin Microbiol, 1987. **25**(2): p. 226-9.
58. Tweten, R.K., *Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins*. Infect Immun, 2005. **73**(10): p. 6199-209.
59. Nollmann, M., et al., *The role of cholesterol in the activity of pneumolysin, a bacterial protein toxin*. Biophys J, 2004. **86**(5): p. 3141-51.
60. Solovyova, A.S., et al., *The solution structure and oligomerization behavior of two bacterial toxins: pneumolysin and perfringolysin O*. Biophys J, 2004. **87**(1): p. 540-52.
61. Tilley, S.J., et al., *Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin*. Cell, 2005. **121**(2): p. 247-56.
62. Marriott, H.M., T.J. Mitchell, and D.H. Dockrell, *Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction*. Curr Mol Med, 2008. **8**(6): p. 497-509.
63. Cockeran R., A.R., Feldman C., *Pneumolysin as a vaccine and drug target in the prevention and treatment of invasive pneumococcal disease*. Arch Immunol Ther Exp, 2005. **53**: p. 189–198.

64. Bonev, B.B., et al., *Structural analysis of the protein/lipid complexes associated with pore formation by the bacterial toxin pneumolysin*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5714-9.
65. Feldman, C., et al., *Pneumolysin induces the salient histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991. **5**(5): p. 416-23.
66. Maus, U.A., et al., *Pneumolysin-induced lung injury is independent of leukocyte trafficking into the alveolar space*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1307-12.
67. Rubins, J.B., et al., *Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells in vitro*. Infect Immun, 1992. **60**(5): p. 1740-6.
68. Paton, J.C., B. Rowan-Kelly, and A. Ferrante, *Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin*. Infect Immun, 1984. **43**(3): p. 1085-7.
69. Jounblat, R., et al., *Pneumococcal behavior and host responses during bronchopneumonia are affected differently by the cytolytic and complement-activating activities of pneumolysin*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 1813-9.
70. Mitchell, T.J., et al., *Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein*. Mol Microbiol, 1991. **5**(8): p. 1883-8.
71. Kadioglu, A., et al., *Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice*. Infect Immun, 2000. **68**(2): p. 492-501.
72. Moreland, J.G. and G. Bailey, *Neutrophil transendothelial migration in vitro to Streptococcus pneumoniae is pneumolysin dependent*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(5): p. L833-40.
73. Cockeran, R., et al., *Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro*. J Infect Dis, 2002. **186**(4): p. 562-5.
74. Cockeran, R., et al., *Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils*. J Infect Dis, 2001. **183**(4): p. 604-11.
75. Houldsworth, S., P.W. Andrew, and T.J. Mitchell, *Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes*. Infect Immun, 1994. **62**(4): p. 1501-3.
76. Kung, E., et al., *The Pneumococcal Polysaccharide Capsule and Pneumolysin Differentially Affect CXCL8 and IL-6 Release from Cells of the Upper and Lower Respiratory Tract*. PLoS One. **9**(3): p. e92355.
77. Rijneveld, A.W., et al., *Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice*. J Infect Dis, 2002. **185**(1): p. 123-6.
78. Mizgerd, J.P., *Respiratory infection and the impact of pulmonary immunity on lung health and disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **186**(9): p. 824-9.
79. Malley, R., et al., *Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1966-71.
80. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 24-32.
81. Gray, C., et al., *Activation of memory Th17 cells by domain 4 pneumolysin in human nasopharynx-associated lymphoid tissue and its association with pneumococcal carriage*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(3): p. 705-17.
82. Dogan, S., et al., *Pneumolysin-induced CXCL8 production by nasopharyngeal epithelial cells is dependent on calcium flux and MAPK activation via Toll-like receptor 4*. Microbes Infect, 2011. **13**(1): p. 65-75.
83. McNeela, E.A., et al., *Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4*. PLoS Pathog, 2011. **6**(11): p. e1001191.
84. Kenneth, M., Travers, P., Walport, M. , *Immunobiología de Janeway*. 7 ed. Vol. 1. 2009: Mc Graw Hill.

85. Bals, R. and P.S. Hiemstra, *Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens*. Eur Respir J, 2004. **23**(2): p. 327-33.
86. Garcia-Rodriguez, J.A. and M.J. Fresnadillo Martinez, *Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens*. J Antimicrob Chemother, 2002. **50 Suppl S2**: p. 59-73.
87. van Rossum, A.M., E.S. Lysenko, and J.N. Weiser, *Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by Streptococcus pneumoniae in a murine model*. Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7718-26.
88. Simell, B., T.M. Kilpi, and H. Kayhty, *Pneumococcal carriage and otitis media induce salivary antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides in children*. J Infect Dis, 2002. **186**(8): p. 1106-14.
89. Goldblatt, D., et al., *Antibody responses to nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae in adults: a longitudinal household study*. J Infect Dis, 2005. **192**(3): p. 387-93.
90. Malley, R., et al., *Anticapsular polysaccharide antibodies and nasopharyngeal colonization with Streptococcus pneumoniae in infant rats*. J Infect Dis, 1998. **178**(3): p. 878-82.
91. Dagan, R., et al., *Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine*. J Infect Dis, 1996. **174**(6): p. 1271-8.
92. Trzcinski, K., et al., *Protection against nasopharyngeal colonization by Streptococcus pneumoniae is mediated by antigen-specific CD4+ T cells*. Infect Immun, 2008. **76**(6): p. 2678-84.
93. Malley, R., et al., *CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(13): p. 4848-53.
94. Cohen, J.M., et al., *Protective contributions against invasive Streptococcus pneumoniae pneumonia of antibody and Th17-cell responses to nasopharyngeal colonisation*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25558.
95. Zhang, Z., T.B. Clarke, and J.N. Weiser, *Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 1899-909.
96. Lu, Y.J., et al., *Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization*. PLoS Pathog, 2008. **4**(9): p. e1000159.
97. Pittet, L.A., et al., *Earliest innate immune responses require macrophage RelA during pneumococcal pneumonia*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(3): p. 573-81.
98. Clement, C.G., et al., *Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(12): p. 1322-30.
99. Gordon, S.B., et al., *Intracellular trafficking and killing of Streptococcus pneumoniae by human alveolar macrophages are influenced by opsonins*. Infect Immun, 2000. **68**(4): p. 2286-93.
100. Standiford, T.J., et al., *Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(1): p. 24-8.
101. Mizgerd, J.P., *Acute lower respiratory tract infection*. N Engl J Med, 2008. **358**(7): p. 716-27.
102. Kadioglu, A., et al., *The integrins Mac-1 and alpha4beta1 perform crucial roles in neutrophil and T cell recruitment to lungs during Streptococcus pneumoniae infection*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5907-15.
103. Kolls, J.K., *Th17 cells in mucosal immunity and tissue inflammation*. Semin Immunopathol, 2010. **32**(1): p. 1-2.

104. Kolls, J.K. and S.A. Khader, *The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(6): p. 443-8.
105. Pletz, M.W., et al., *Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaptation of the species*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **32**(3): p. 199-206.
106. Rapola, S., et al., *Natural development of antibodies to pneumococcal surface protein A, pneumococcal surface adhesin A, and pneumolysin in relation to pneumococcal carriage and acute otitis media*. J Infect Dis, 2000. **182**(4): p. 1146-52.
107. Virolainen, A., et al., *Human antibodies to pneumococcal surface protein A in health and disease*. Pediatr Infect Dis J, 2000. **19**(2): p. 134-8.
108. Brown, J.S., et al., *The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to Streptococcus pneumoniae infection in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16969-74.
109. Plotkin, S.A., *Correlates of protection induced by vaccination*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(7): p. 1055-65.
110. Lipsitch, M., et al., *Are anticapsular antibodies the primary mechanism of protection against invasive pneumococcal disease?* PLoS Med, 2005. **2**(1): p. e15.
111. Chen, K. and J.K. Kolls, *T cell-mediated host immune defenses in the lung*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 605-33.
112. Lu, Y.J., et al., *Mechanisms in the serotype-independent pneumococcal immunity induced in mice by intranasal vaccination with the cell wall polysaccharide*. Microb Pathog, 2009. **47**(3): p. 177-82.
113. Malley, R. and P.W. Anderson, *Serotype-independent pneumococcal experimental vaccines that induce cellular as well as humoral immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(10): p. 3623-7.
114. Klugman, K.P., *Contribution of vaccines to our understanding of pneumococcal disease*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011. **366**(1579): p. 2790-8.
115. Moberley, S.A., et al., *Vaccines for preventing pneumococcal infection in adults*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(1): p. CD000422.
116. Astronomo, R.D. and D.R. Burton, *Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations?* Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(4): p. 308-24.
117. Klein Klouwenberg, P. and L. Bont, *Neonatal and infantile immune responses to encapsulated bacteria and conjugate vaccines*. Clin Dev Immunol, 2008. **2008**: p. 628963.
118. Webster, J., et al., *An evaluation of emerging vaccines for childhood pneumococcal pneumonia*. BMC Public Health, 2011. **11 Suppl 3**: p. S26.
119. Jakobsen, H., et al., *Intranasal immunization with pneumococcal conjugate vaccines with LT-K63, a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin, as adjuvant rapidly induces protective immunity against lethal pneumococcal infections in neonatal mice*. Infect Immun, 2002. **70**(3): p. 1443-52.
120. Baumann, U., *Mucosal vaccination against bacterial respiratory infections*. Expert Rev Vaccines, 2008. **7**(8): p. 1257-76.
121. MSP, *Campaña de Vacunación Antineumocócica 23 Valente*. Dirección General de la Salud División Epidemiología - Inmunizaciones, 2011.
122. Quian, J., *Actualizaciones del Certificado Esquema de Vacunación. Perspectivas a futuro en vacunación en la niñez*. Arch Pediatr Urug, 2010. **81**((1)): p. 34-45.
123. Giachetto Larraz, G.T.O., H. Speranza Mourine, N. Giglio N, Cané A, Pérez García MC, et al., *Costo-efectividad de la vacunación universal antineumocócica en Uruguay*. Rev Panam Salud Publica. Rev Panam Salud Publica, 2010. **28**(2): p. 92-9.

124. Giachetto Larraz G, T.O.H., Speranza Mourine N, Giglio N, Cané A, Pírez García MC, et al., *Costo-efectividad de la vacunación universal antineumocócica en Uruguay*. *Rev Panam Salud Publica*. *Rev Panam Salud Publica*, 2010. **28**(2): p. 92–9.
125. Hortal, M., et al., *Impact of pneumococcal conjugate vaccines on the incidence of pneumonia in hospitalized children after five years of its introduction in Uruguay*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e98567.
126. Singleton, R.J., et al., *Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage*. *JAMA*, 2007. **297**(16): p. 1784-92.
127. Hicks, L.A., et al., *Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004*. *J Infect Dis*, 2007. **196**(9): p. 1346-54.
128. Weinberger, D.M., R. Malley, and M. Lipsitch, *Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination*. *Lancet*. **378**(9807): p. 1962-73.
129. Glover, D.T., S.K. Hollingshead, and D.E. Briles, *Streptococcus pneumoniae surface protein PcpA elicits protection against lung infection and fatal sepsis*. *Infect Immun*, 2008. **76**(6): p. 2767-76.
130. Briles, D.E., et al., *The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection*. *Vaccine*, 2000. **18**(16): p. 1707-11.
131. Briles, D.E., et al., *Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*, 2003. **188**(3): p. 339-48.
132. Briles, D.E., et al., *PspA, a protection-eliciting pneumococcal protein: immunogenicity of isolated native PspA in mice*. *Vaccine*, 1996. **14**(9): p. 858-67.
133. Briles, D.E., et al., *Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 2000. **68**(2): p. 796-800.
134. Brooks-Walter, A., D.E. Briles, and S.K. Hollingshead, *The pspC gene of Streptococcus pneumoniae encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia*. *Infect Immun*, 1999. **67**(12): p. 6533-42.
135. Hirst, R.A., et al., *The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis*. *Clin Exp Immunol*, 2004. **138**(2): p. 195-201.
136. Rapola, S., et al., *Antibody response to the pneumococcal proteins pneumococcal surface adhesin A and pneumolysin in children with acute otitis media*. *Pediatr Infect Dis J*, 2001. **20**(5): p. 482-7.
137. Paton, J.C., R.A. Lock, and D.J. Hansman, *Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 1983. **40**(2): p. 548-52.
138. Paton, J.C., et al., *Cloning and expression in Escherichia coli of the Streptococcus pneumoniae gene encoding pneumolysin*. *Infect Immun*, 1986. **54**(1): p. 50-5.
139. Paton, J.C., et al., *Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to Streptococcus pneumoniae type 19F polysaccharide*. *Infect Immun*, 1991. **59**(7): p. 2297-304.
140. Alexander, J.E., et al., *Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 1994. **62**(12): p. 5683-8.

141. Korchev, Y.E., et al., *A conserved tryptophan in pneumolysin is a determinant of the characteristics of channels formed by pneumolysin in cells and planar lipid bilayers*. *Biochem J*, 1998. **329 (Pt 3)**: p. 571-7.
142. Kirkham, L.A., et al., *Construction and immunological characterization of a novel nontoxic protective pneumolysin mutant for use in future pneumococcal vaccines*. *Infect Immun*, 2006. **74(1)**: p. 586-93.
143. Grotiuz, G., et al. *Cloning and production of a truncated form of pneumolysin for its use in a streptococcus pneumoniae vaccine*. . V Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI). . in V Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI). 1999. Punta del Este, Uruguay.
144. Grotiuz, G., *Producción y purificación de neumolisina recombinante para su uso en una vacuna contra la infección neumocócica*. , in *Laboratorio de Investigación en Vacunas - Dpto. Desarrollo Biotecnológico*. 2000, Facultad de Medicina - UdelaR: Montevideo
145. Herzog, C., *Influence of parenteral administration routes and additional factors on vaccine safety and immunogenicity: a review of recent literature*. *Expert Rev Vaccines*. **13(3)**: p. 399-415.
146. Plotkin, S.A., *Vaccines: the fourth century*. *Clin Vaccine Immunol*, 2009. **16(12)**: p. 1709-19.
147. Gyawali, S., et al., *Strategies and challenges for safe injection practice in developing countries*. *J Pharmacol Pharmacother*, 2013. **4(1)**: p. 8-12.
148. Miller, M.A. and E. Pisani, *The cost of unsafe injections*. *Bull World Health Organ*, 1999. **77(10)**: p. 808-11.
149. Neutra, M.R. and P.A. Kozlowski, *Mucosal vaccines: the promise and the challenge*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6(2)**: p. 148-58.
150. Quiding-Jarbrink, M., et al., *Human circulating specific antibody-forming cells after systemic and mucosal immunizations: differential homing commitments and cell surface differentiation markers*. *Eur J Immunol*, 1995. **25(2)**: p. 322-7.
151. Czerkinsky, C. and J. Holmgren, *Topical immunization strategies*. *Mucosal Immunol*, 2010. **3(6)**: p. 545-55.
152. Czerkinsky, C., et al., *Antibody-producing cells in peripheral blood and salivary glands after oral cholera vaccination of humans*. *Infect Immun*, 1991. **59(3)**: p. 996-1001.
153. Jertborn, M., et al., *Local and systemic immune responses to rectal administration of recombinant cholera toxin B subunit in humans*. *Infect Immun*, 2001. **69(6)**: p. 4125-8.
154. Kozlowski, P.A., et al., *Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women*. *Infect Immun*, 1997. **65(4)**: p. 1387-94.
155. Quiding-Jarbrink, M., et al., *Differential expression of tissue-specific adhesion molecules on human circulating antibody-forming cells after systemic, enteric, and nasal immunizations. A molecular basis for the compartmentalization of effector B cell responses*. *J Clin Invest*, 1997. **99(6)**: p. 1281-6.
156. Rudin, A., et al., *Differential kinetics and distribution of antibodies in serum and nasal and vaginal secretions after nasal and oral vaccination of humans*. *Infect Immun*, 1998. **66(7)**: p. 3390-6.
157. Wassen, L., et al., *Local intravaginal vaccination of the female genital tract*. *Scand J Immunol*, 1996. **44(4)**: p. 408-14.
158. Rudin, A., G.C. Riise, and J. Holmgren, *Antibody responses in the lower respiratory tract and male urogenital tract in humans after nasal and oral vaccination with cholera toxin B subunit*. *Infect Immun*, 1999. **67(6)**: p. 2884-90.

159. Staats, H.F., S.P. Montgomery, and T.J. Palker, *Intranasal immunization is superior to vaginal, gastric, or rectal immunization for the induction of systemic and mucosal anti-HIV antibody responses*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1997. **13**(11): p. 945-52.
160. Egan, M.A., et al., *Immunogenicity of attenuated vesicular stomatitis virus vectors expressing HIV type 1 Env and SIV Gag proteins: comparison of intranasal and intramuscular vaccination routes*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2004. **20**(9): p. 989-1004.
161. Ambrose, C.S., M.J. Levin, and R.B. Belshe, *The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults*. *Influenza Other Respir Viruses*, 2011. **5**(2): p. 67-75.
162. van Ginkel, F.W., et al., *Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues*. *J Immunol*, 2000. **165**(9): p. 4778-82.
163. Mutsch, M., et al., *Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(9): p. 896-903.
164. Lemiale, F., et al., *Enhanced mucosal immunoglobulin A response of intranasal adenoviral vector human immunodeficiency virus vaccine and localization in the central nervous system*. *J Virol*, 2003. **77**(18): p. 10078-87.
165. Moingeon, P., et al., *Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy*. *Allergy*, 2006. **61**(2): p. 151-65.
166. Czerkinsky, C., et al., *Sublingual vaccination*. *Hum Vaccin*, 2011. **7**(1): p. 110-4.
167. Cuburu, N., et al., *Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice*. *Vaccine*, 2007. **25**(51): p. 8598-610.
168. Cuburu, N., et al., *Sublingual immunization with nonreplicating antigens induces antibody-forming cells and cytotoxic T cells in the female genital tract mucosa and protects against genital papillomavirus infection*. *J Immunol*, 2009. **183**(12): p. 7851-9.
169. Song, J.H., et al., *Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(5): p. 1644-9.
170. Lu, Y.J., et al., *Options for inactivation, adjuvant, and route of topical administration of a killed, unencapsulated pneumococcal whole-cell vaccine*. *Clin Vaccine Immunol*, 2010. **17**(6): p. 1005-12.
171. Yuki, Y. and H. Kiyono, *Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery*. *Expert Rev Vaccines*, 2009. **8**(8): p. 1083-97.
172. Vázquez, J.E.F., F.; Ayala, M.; Canaán-Haden, L. , *Production of a Single-chain Fv Antibody Fragment Specific to Carcinoembryonic Antigen as a Cytoplasmic Protein in Escherichia coli*. *Biotecnología Aplicada*, 1999. **16**(3): p. 169-172.
173. Tomasz, A., et al., *Molecular epidemiologic characterization of penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae invasive pediatric isolates recovered in six Latin-American countries: an overview*. *PAHO/Rockefeller University Workshop. Pan American Health Organization*. *Microb Drug Resist*, 1998. **4**(3): p. 195-207.
174. Munoz, N., et al., *Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection*. *Infect Immun*, 2010. **78**(10): p. 4226-33.
175. Muñoz-Wolf, N., Rial, A., Saavedra, J.M., Chabalgoity, J.A. , *Sublingual Immunotherapy as an Alternative to Induce Protection Against Acute Respiratory Infections*. *Journal of Visualized Experiments*, 2014(90).
176. Alecsandru, D., et al., *Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4+ T cells and impact on clinical outcome*. *Clin Exp Immunol*, 2011. **164**(1): p. 100-7.

177. Cogo, R., et al., *Prophylaxis for acute exacerbations of chronic bronchitis using an antibacterial sublingual vaccine obtained through mechanical lysis: a clinical and pharmaco-economic study*. Acta Biomed, 2003. **74**(2): p. 81-7.
178. Rosaschino, F. and L. Cattaneo, *Strategies for optimizing compliance of paediatric patients for seasonal antibacterial vaccination with sublingually administered Polyvalent Mechanical Bacterial Lysates (PMBL)*. Acta Biomed, 2004. **75**(3): p. 171-8.
179. Dockrell, D.H., M.K. Whyte, and T.J. Mitchell, *Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution*. Chest, 2012. **142**(2): p. 482-91.
180. Malley, R., et al., *Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide*. Infect Immun, 2006. **74**(4): p. 2187-95.
181. Mizel, S.B. and J.T. Bates, *Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential*. J Immunol, 2010. **185**(10): p. 5677-82.
182. Van Maele, L., et al., *Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(3): p. 489-500.
183. Muñoz-Wolf, N., *Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como base para nuevas inmunoterapias contra Streptococcus pneumoniae*, in *Departamento de Desarrollo Biotecnológico*. 2013, UdelaR: Montevideo.
184. Gupta, S.K., et al., *Flagellin a toll-like receptor 5 agonist as an adjuvant in chicken vaccines*. Clin Vaccine Immunol, 2014. **21**(3): p. 261-70.

VII. Anexo