

ARTÍCULO ORIGINAL

Nuevo prototipo de vacuna de mucosa contra el HSV-2 basada en partículas semejantes a bacterias como portador y adyuvante de antígenos

Novel mucosal vaccine against HSV-2 based on the LysM-BLP system as carrier and antigen adjuvant

Raya-Tonetti, Fernanda ^{1,2,3}; Villena, Julio ^{1D}³; Vizoso-Pinto, María Guadalupe ^{1,2}

¹Laboratorio de Biología de las Infecciones, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), CONICET-UNT. Tucumán, Argentina.

²Laboratorio de Ciencias Básicas y Or. Genética, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina.

³Laboratorio de Inmunobiología, Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA-CONICET). Tucumán, Argentina.

*Contacto: Vizoso-Pinto, María Guadalupe, Laboratorio de Ciencias Básicas y Or. Genética, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán. Av Kirchner 2100, (C.P. 4000), Tucumán, Argentina; mgvizoso@fm.unt.edu.ar.

Resumen

Introducción: El desarrollo de una vacuna contra el virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2), el cual causa una infección de transmisión sexual de por vida, sería un gran paso para mejorar la salud sexual y reproductiva mundial. **Objetivos:** Estudiar las respuestas inmunes de mucosa y sistémica inducidas por una vacuna experimental, consistente en partículas semejantes a bacterias (BLP) derivadas de lactobacilos, que conservan su matriz de peptidoglicano y exponen el antígeno gD del HSV-2 en su superficie gracias a la fusión con dominios LysM. **Materiales y métodos:** Ratones BALB/c de seis semanas de edad fueron inmunizados por vía nasal con el complejo His-Acglu-gD-BLP027 los días 0, 14 y 28. Como control, se administró His-Acglu-gD por vía intranasal o His-gD con adyuvante completo de Freund por vía peritoneal. Se evaluaron los niveles de inmunoglobulinas específicas en suero y en lavado broncoalveolar (BAL), así como la producción de citocinas por parte de los esplenocitos, en respuesta a la reestimulación antigenica. **Resultados:** La vacuna experimental indujo mayores niveles de IgA en BAL en comparación con los ratones inmunizados con el adyuvante de Freund. **Conclusiones:** Este nuevo sistema de presentación de antígenos podría ser una herramienta útil para el desarrollo de vacunas mucosas que estimulen la inmunidad local y a distancia.

Palabras clave: vacunas de mucosas, partículas semejantes a bacterias, presentación de antígenos, adyuvantes, respuesta inmune adaptativa.

Abstract

Introduction: The development of a vaccine against herpes simplex virus type 2 (HSV-2), which causes a lifelong sexually transmitted infection, would be a great step to improve sexual and reproductive health worldwide. **Objectives:** To study the mucosal and systemic immune responses induced by an experimental vaccine consisting of bacterium-like particles (BLP) derived from lactobacilli, which retain their peptidoglycan matrix and expose the HSV-2 gD antigen on their surface thanks to its fusion with LysM domains. **Materials and methods:** Six-week-old BALB/c mice were nasally immunized with the His-Acglu-gD-BLP027 complex on days 0, 14, and 28. As a control, His-Acglu-gD was administered intranasally or His-gD with complete Freund's adjuvant peritoneally. The levels of specific immunoglobulins in serum and in bronchoalveolar lavage (BAL), as well as the production of cytokines by splenocytes after the antigenic restimulation, were evaluated. **Results:** The experimental vaccine induced higher levels of IgA in BAL than in mice immunized with Freund's adjuvant. **Conclusions:** This new antigen presentation system could be a useful tool for the development of mucosal vaccines that stimulate local and distant immunity. **Key words:** mucosal vaccines, bacterium-like particles, antigen presentation, adjuvants, adaptive immune response.

Introducción

El desarrollo de una vacuna contra el virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2), una infección de transmisión sexual (ITS) de por vida, mejoraría de manera crítica la salud sexual y reproductiva mundial¹. Según la OMS, en 2016 había 491 millones de personas de 15 a 49 años (13 % de la población) infectadas en todo el mundo, de las cuales el 64 % eran mujeres². El HSV-2 puede causar lesiones genitales dolorosas, recurrentes y, a menudo, se asocia con efectos psicosociales negativos como vergüenza, ansiedad y depresión³. Además, está demostrado que la infección por HSV-2 triplica el riesgo de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)⁴. Por otro lado, este virus puede causar herpes neonatal cuando el recién nacido se expone al HSV en el canal parto. Este tipo de herpes tiene una frecuencia estimada de 10 casos por cada 100.000 nacidos en todo el mundo, pero es una afección grave que puede producir discapacidad neurológica persistente e incluso la muerte⁵.

Los antivíricos como el aciclovir, el famciclovir y el valaciclovir son los más eficaces para el tratamiento de las personas infectadas por HSV. Sin embargo, aunque pueden reducir la intensidad y frecuencia de los síntomas, no curan la infección⁶.

Por todo lo expuesto, es necesario desarrollar mejores intervenciones de tratamiento y prevención y, en particular, vacunas contra el HSV-2, ya que este virus causa 23 millones de infecciones nuevas cada año. El desarrollo de vacunas de subunidad se ha centrado principalmente en la generación de anticuerpos neutralizantes dirigidos a la glicoproteína D (gD) de la envoltura viral. Esta glicoproteína media la fusión con la membrana celular y se ha demostrado que los anticuerpos contra gD impiden la entrada del virus⁷.

Aunque aún no hay vacunas de administración nasal disponibles para enfermedades de transmisión sexual, existen antecedentes que indican que este abordaje sería el más apropiado, ya que estas son capaces de estimular la producción de anticuerpos específicos en la mucosa vaginal^{1,8}. Las vacunas administradas por esta vía también estimulan la respuesta inmune celular, en particular, la de las células T de memoria, indispensables en las infecciones crónicas como la causada por el HSV-2^{1,9}.

La administración de antígenos a través de las vías mucosas es un desafío porque puede generar tolerancia en lugar de respuestas inmunitarias efectoras. La inmunotolerancia es la respuesta inmune natural de la mucosa, que ha evolucionado para prevenir respuestas inflamatorias dañinas, a los antígenos solubles¹⁰. Ante este escenario, las bacterias lácticas (BL) con capacidad inmunomoduladora o inmunobióticas surgen como potenciales vectores de antígenos y adyuvantes para el desarrollo de vacunas de mucosa¹¹⁻¹³. La cepa *Lacticaseibacillus rhamnosus* IBL027 tiene propiedades inmunomoduladoras antivirales intrínsecas y propiedades como adyuvante de mucosas¹⁴. Como la viabilidad de las BL no es un requisito indispensable para lograr un efecto inmunomodulador óptimo¹⁵, empleamos las partículas similares a bacterias (BLP) derivadas de la cepa IBL027 (BLP027), las cuales mejoran las respuestas inmunes locales y sistémicas, humorales y celula-

res cuando se administran junto con una vacuna viral por vía mucosa¹⁶.

Las BLP se obtienen mediante el tratamiento de las BL con ácido y calor, lo que resulta en la muerte bacteriana y la pérdida de ADN y proteínas citoplasmáticas. Este tratamiento expone el peptidoglicano (PG) presente en la pared celular, de modo que la capacidad de unión de proteínas con motivos LysM aumenta al menos 10 veces¹⁷. El motivo LysM es un dominio de unión de pared celular ampliamente distribuido en la naturaleza que se une de manera no covalente a los residuos de N-acetilglucosamina del PG^{18,19}. Hasta la fecha, más de 40 antígenos diferentes de naturaleza bacteriana, viral o parasitaria se han fusionado con el dominio C-terminal de AcmA - una autolisina de *Lactococcus lactis*²⁰-, el cual les permitió unirse a las BLP y quedar expuestas en su superficie.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en trabajos anteriores, desarrollamos una plataforma para vacunas mucosas que explota el potencial inmunomodulador bien descripto de *L. rhamnosus* IBL027 en combinación con los 5 dominios LysM de la glicoproteína manosil-endo-beta-N-acetilglucosamidasa (Acglu) (GenBank: KPH22907.1) derivada de *Limosilactobacillus fermentum*, capaz de estimular la respuesta inmune celular y humoral, tanto mucosa como sistémica, cuando se administra por vía intranasal²¹. En este enfoque, la pared celular gruesa y rígida de *L. rhamnosus*, libre de proteínas y ácidos teicoicos expone el PG para unir proteínas con dominios LysM. La unión no covalente de los antígenos del patógeno a la superficie de las BLP se logra mediante la simple mezcla de los antígenos heterólogos purificados con las partículas lácticas²¹. En este trabajo, proponemos el uso de esta plataforma para presentar la glicoproteína gD del HSV-2 como antígeno en su superficie. Por último, proponemos estudiar las respuestas inmunes de mucosa y sistémica provocadas por la vacuna experimental utilizando inmunizaciones intranasales en un modelo de ratón. Aunque será necesario realizar estudios que evalúen los niveles de anticuerpos inducidos por esta plataforma en la mucosa genital, su capacidad de neutralización viral y la capacidad protectora de la vacuna frente a un desafío con HSV-2, los resultados preliminares obtenidos en este trabajo indican que la plataforma constituida por Acglu-BLP027 es una herramienta prometedora para la generación de vacunas mucosas.

Materiales y métodos

Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano

L. fermentum IBL038 y *L. rhamnosus* IBL027, depositados en la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán (Tucumán, Argentina), se cultivaron durante 12 h a 37 °C en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (fase logarítmica final).

Las cepas de *E. coli* (TOP10, DH5α, DB3.1 y Rosetta) se cultivaron en caldo Luria Bertani o en placas de agar a 37 °C suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de gentamicina o 17 µg/ml de cloranfenicol para el plásmido de selección.

Clonado recombinante de la glicoproteína gD del HSV-2

El antígeno viral usado en el desarrollo de esta vacuna experimental fue un polipéptido recombinante de 45 kDa que comprende los aminoácidos 1 - 340 de la glicoproteína gD (GenBank: JQ956374.1) de HSV-2. Se partió del plásmido PENTRY207-gD perteneciente a la genoteca del Laboratorio de Biología de Infecciones de INSIBIO (Tucumán, Argentina). La secuencia codificante para gD sin los dominios transmembrana, flanqueada por los sitios attB fue subclonada en el vector de destino personalizado pETG-N-RGS-His-[rfB] con el objetivo de agregarle a dicha proteína una etiqueta de polihistidina (His) que permitirá, luego, purificarla y usarla como control. También, el antígeno de interés fue subclonado en el vector pENHAC-[rfb] donde, además de la etiqueta de polihistidina, se agregó la secuencia de Acglu, que permitirá unir el antígeno de interés a la superficie de las BLP para generar una vacuna de mucosa. Para este fin, se usó la LR-clonasa II (clonado recombinatorio Gateway®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se aisló con el kit comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche) y la integridad de los vectores resultantes se verificó mediante análisis de restricción con HindIII/XbaI (New England Biolabs) seguido de electroforesis en agarosa.

Expresión y purificación de las proteínas recombinantes His-gD e His-Acglu-gD

Las proteínas recombinantes se identificaron en *E. coli* Rosetta, como se describió anteriormente^{22,23}. La expresión de la proteína His-gD se indujo con 1 mM de IPTG de acuerdo con lo descripto en la literatura²⁴. Por otro lado, se puso a punto la expresión de His-Acglu-gD por tratarse de una proteína aún no descripta. Para ello, se indujeron cultivos de 10 ml con diferen-

tes concentraciones de IPTG (0,1; 0,5; 1,0 o 2,0 mM) durante 2, 3 o 4 h, se centrifugaron a 4 °C para separar el sedimento celular del sobrenadante, y las fracciones de proteínas nativas y desnaturalizadas se obtuvieron como se describió previamente²³.

Ambas proteínas se purificaron utilizando cromatografía Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión y pureza de las proteínas recombinantes se analizaron mediante SDS-PAGE seguida de la tinción con el colorante azul de Coomassie y se verificaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal anti-RGS-His de ratón (Qiagen, Alemania). Las proteínas purificadas se almacenaron a -80 °C. La concentración de proteínas se determinó con el reactivo de Bradford (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de la vacuna His-Acglu-gD-BLP027

Se prepararon las BLP027 como se describió anteriormente¹⁶. Se incubaron diferentes concentraciones de la proteína recombinante His-Acglu-gD purificada en condiciones desnaturalizantes (30, 70 o 90 µg de proteína) con las BLP (10⁸ partículas) en rotación suave durante 1 h a temperatura ambiente. Las partículas se lavaron 3 veces con PBS estéril, se resuspendieron en el mismo buffer y se almacenaron a -80 °C. La cantidad de proteína unida se comparó con estándares de BSA por SDS-PAGE utilizando el programa ImageJ.

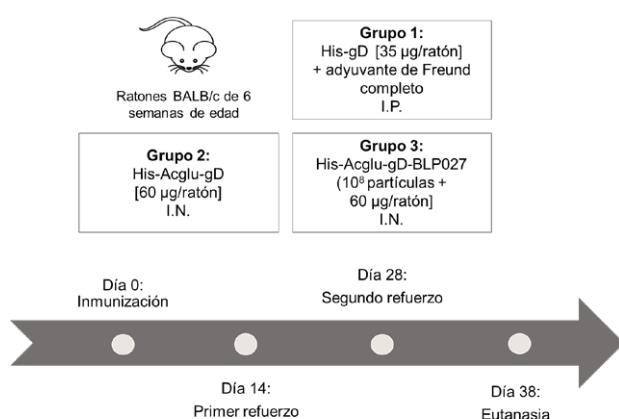
Inmunización de los ratones

Los ratones BALB/c se obtuvieron de una colonia cerrada, mantenida en CERELA-CONICET (Tucumán, Argentina). Se alojaron en jaulas de plástico a temperatura ambiente con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los parámetros se estudiaron en 8 ratones por grupo. Todos los grupos fueron alimentados con una dieta balanceada convencional *ad libitum*. Antes de la eutanasia, todos los animales fueron anestesiados usando una mezcla de clorhidrato de ketamina y clorhidrato de xilazina en una proporción de 20:1. No se observaron signos de malestar o dolor durante el experimento.

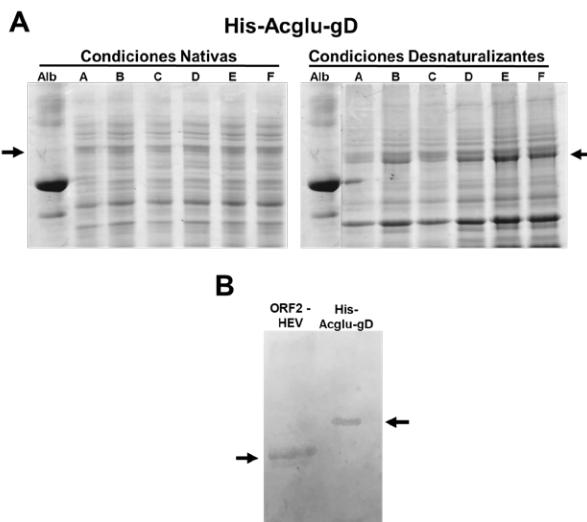
Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y fueron aprobados prospectivamente por el Comité Ético de Cuidado Animal del CERELA (protocolos n.º BIOT-CRL/11).

Para las inmunizaciones, se utilizaron ratones BALB/c de seis semanas de edad divididos en tres grupos. El grupo 1 se inmunizó por vía intraperitoneal con 35 µg de His-gD con adyuvante completo de Freund. El grupo 2 recibió 60 µg de la proteína His-Acglu-gD por vía intranasal y el grupo 3 se inmunizó usando His-Acglu-gD-BLP027 por la misma vía (10⁸ partículas/ratón con 60 µg de proteína). De esta manera, los 3 grupos recibieron la misma cantidad (en micromoles) de proteína. Todos los grupos de animales fueron inmunizados con una primera dosis el día 0 y recibieron dos refuerzos los días 14 y 28, respectivamente (Figura 1).

Figura 1. Esquema de inmunización.



- Los ratones BALB/c de seis semanas de edad se inmunizaron por vía intraperitoneal (I.P.) con His-gD con adyuvante completo de Freund los días 0 (primera dosis), 14 y 28 (refuerzos). Este grupo fue usado como control para las comparaciones. El resto de los ratones fueron vacunados por vía intranasal (I.N.) His-Acglu-gD o His-Acglu-gD-BLP027. Diez días después del primer o del segundo refuerzo, se obtuvieron muestras de suero y BAL para la determinación de anticuerpos específicos IgG e IgA. Cada grupo experimental estuvo integrado por 8 ratones.

Figura 2. Expresión de la proteína His-Acglu-gD recombinante.

► [A] SDS-PAGE de His-Acglu-gD (75 KDa) expresada en seis clones de *E. coli* Rosetta [A-F] después de la inducción con 1 mM de IPTG en condiciones nativas [CN] o desnaturalizantes [CD]; Alb, albúmina de 65 KDa usada como marcador de peso molecular. [B] Western blot de la proteína recombinante His-Acglu-gD en condiciones desnaturalizantes utilizando un anticuerpo primario anti-RGS-His y la proteína ORF2 del HEV de 66 KDa como control.

Detección de anticuerpos en suero y BAL

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción cardíaca 10 días después del segundo refuerzo y se recogieron en tubos heparinizados. Las muestras de lavado broncoalveolar (BAL) se obtuvieron como se describió anteriormente¹⁴. Brevemente, se expuso la tráquea y se intubó con un catéter. Se realizaron dos BAL secuenciales en cada ratón inyectando 1 ml de PBS estéril; el fluido recuperado se centrifugó durante 10 min a 900 x g. Los sobrenadantes

se congelaron a -80 °C para análisis posteriores. Los anticuerpos anti-gD específicos (IgA e IgG) se determinaron por ELISA siguiendo lo descripto anteriormente¹⁴, sensibilizando las placas de poliestireno con 3 µg de la proteína His-gD por pociño.

Análisis de datos

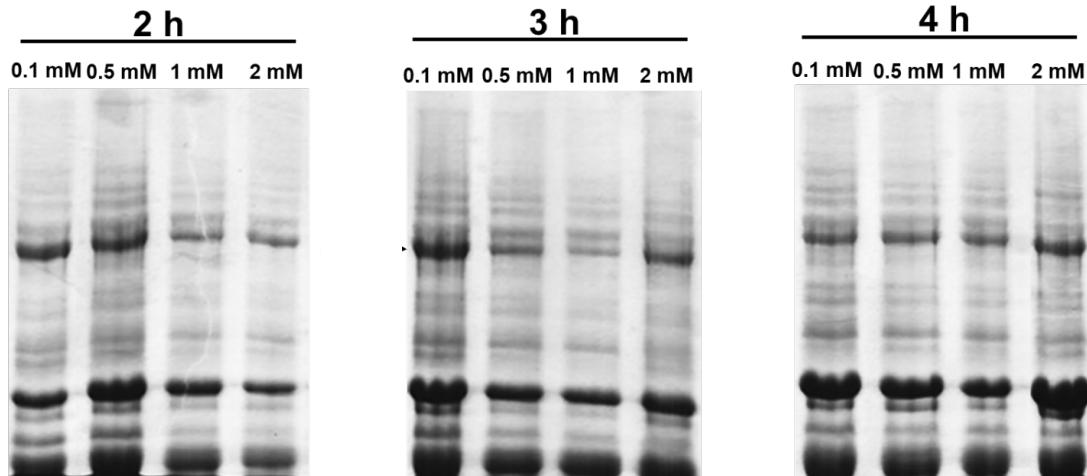
Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media ± DE. La prueba de Tukey, para comparaciones por pares de las medias, se utilizó para evaluar las diferencias entre los grupos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

Expresión y purificación de las proteínas quiméricas gD del HSV-2

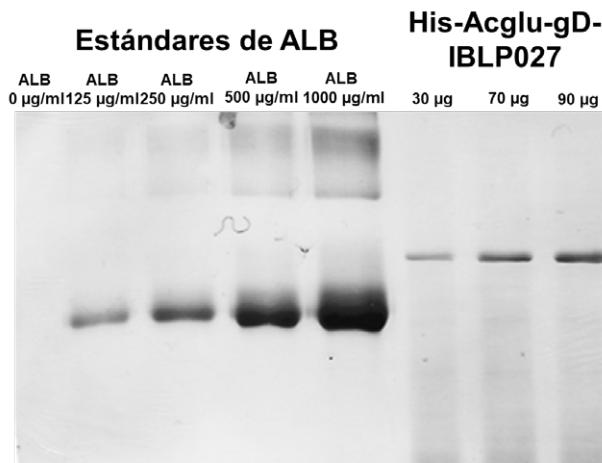
La proteína recombinante His-gD del HSV-2 (45 KDa) se expresó en *E. coli* Rosetta después de la inducción con 1 mM de IPTG, según lo descripto en la literatura²⁴, utilizando los plásmidos pETG-N-RGS-His-gD y pENHAc-N-gD. Las proteínas de la fracción citoplasmática (CN) y de los cuerpos de inclusión (CD) fueron analizadas mediante SDS-PAGE. Encontramos una mayor cantidad de His-gD en condiciones desnaturalizantes (Figura 2A). Esta proteína se purificó con buffer urea 8 M usando cromatografía de afinidad Ni-NTA. Su pureza se analizó mediante SDS-PAGE (Figura 2A) y se verificó mediante Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-RGS-His de ratón (Figura 2B) y la proteína ORF2 del virus de la hepatitis E (*Hepatitis E virus*: HEV) de 66 KDa como control²⁵.

Además, se establecieron las condiciones óptimas de expresión de la proteína recombinante His-Acglu-gD (75 KDa). Para ello, se indujo la expresión en cultivos de 10 ml usando cuatro concentraciones diferentes de IPTG (0,1; 0,5; 1 y 2 mM) y diferentes tiempos de inducción (2, 3 y

Figura 3. Condiciones óptimas de expresión de His-Acglu-gD.

► SDS-PAGE de His-Acglu-gD (75 KDa) expresada en *E. coli* Rosetta, inducida con las siguientes concentraciones de IPTG: 0,1; 0,5; 1 y 2 mM a 37°C durante 2, 3 o 4 h. La flecha negra indica la condición de inducción seleccionada para los siguientes experimentos.

Figura 4. Unión de la proteína recombinante His-Acglu-gD a las BLP027.



► SDS-PAGE de His-Acglu-gD (75 KDa) expresada en *E. coli* Rosetta después de la inducción con 0,1 mM de IPTG y purificada en condiciones desnaturalizantes (CD), unida a las BLP de *Lacticaseibacillus rhamnosus* IBL027. Tres concentraciones diferentes (30, 70 y 90 µg) de la proteína recombinante purificada se unieron a 108 BLP027. La cantidad de proteína unida se determinó en comparación con los estándares de ALB.

4 h]. Las proteínas obtenidas en CN y CD, en cada una de las condiciones, fueron analizadas mediante SDS-PAGE. La banda correspondiente a His-Acglu-gD se visualizó en mayor cantidad en CD en todas las condiciones analizadas (Figura 3). Sorprendentemente, se observó una mayor cantidad de proteína luego de 3 h de haber inducido la expresión con IPTG a la menor concentración testeada (0,1 mM). Se pudo determinar que un tiempo de inducción de 4 h no aumenta la expresión de la proteína (Figura 3).

Desarrollo de una vacuna de mucosa experimental usando gD como antígeno

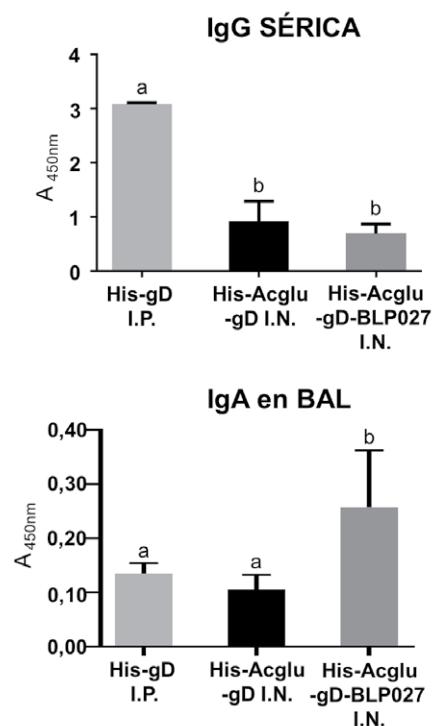
A continuación, se desarrolló una vacuna experimental mediante el uso de una proteína de fusión, resultado del dominio LysM de Acglu, las BLP027 y gD del HSV-2 como antígeno. Para ello, se mezclaron diferentes concentraciones de la proteína recombinante His-Acglu-gD purificada por cromatografía Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific) en condiciones desnaturalizantes (30, 70 o 90 µg de proteína) con las BLP (10^8 partículas) con el objetivo de determinar cuál era la máxima cantidad de proteína que podía unirse a las partículas, ya que, según los resultados obtenidos previamente²¹, una mayor cantidad de antígeno sería capaz de estimular la respuesta inmune celular con mayor eficiencia. Después del lavado, las partículas se sometieron a un análisis por SDS-PAGE y se compararon con estándares de albúmina sérica bovina (ALB). El análisis de la densidad de las bandas realizado con *ImageJ* indicó que 10^8 BLP027 podrían unirse como máximo a 60 µg de His-Acglu-gD (Figura 4). La vacuna experimental se designó His-Acglu-gD-BLP027.

Inmunogenicidad de la vacuna experimental basada en gD-BLP027

Para investigar si la vacuna experimental His-Acglu-gD-BLP027 era inmunogénica, realizamos experimentos en ratones adultos inmunocompetentes. Para estandarizar las inmunizaciones, dados los diferentes PM de las proteínas de fusión, elegimos administrar el mismo número de moles (10^{-6}) en cada dosis según lo detallado en la sección "Materiales y Métodos". Diez días después del segundo refuerzo, se analizaron los niveles de IgG específicos en suero, así como los niveles de IgA en BAL por ELISA (Figura 5).

Se observó que His-gD es inmunogénica cuando se administra por vía intraperitoneal con el adyuvante completo de Freund, ya que se detectaron anticuerpos IgG específicos de gD en suero (Figura 5). Además, este protocolo de inmunización también fue capaz de inducir una respuesta inmune humorala en el tracto respiratorio, ya que se encontraron anticuerpos IgA específicos de gD en BAL (Figura 5). La respuesta más potente se observó en el grupo experimen-

Figura 5. Inmunogenicidad de la vacuna experimental His-Acglu-gD-BLP027.



► Los ratones BALB/c de seis semanas de edad se inmunizaron por vía intraperitoneal (I.P.) con His-gD con adyuvante completo de Freund los días 0 (primera dosis), 14 y 28 (refuerzos). Este grupo fue usado como control para las comparaciones. El resto de los ratones fueron vacunados por vía intranasal (I.N.) con His-Acglu-gD o His-Acglu-gD-BLP027. Diez días después del segundo refuerzo, se obtuvieron muestras de suero y BAL para la determinación de anticuerpos específicos IgG e IgA por ELISA. Las placas de poliestireno se sensibilizaron con 3 µg de la proteína His-gD por pocillo. Cada grupo experimental estuvo integrado por 8 ratones. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los grupos. P<0,05 se consideró significativo.

tal que recibió la inmunización intraperitoneal con His-gD asociada al adyuvante completo de Freund, el cual es uno de los adyuvantes conocidos más eficaces, cuyo uso está restringido para humanos (Figura 5). Las inmunizaciones intranasales con His-Acglu-gD y el complejo His-Acglu-gD-BLP027 resultaron en niveles elevados de anticuerpos IgG específicos anti-gD, sin diferencias significativas entre los dos grupos. Sin embargo, se observó que la vacuna experimental desarrollada en este trabajo tiende a inducir mayores niveles de IgA en BAL en comparación con los grupos de ratones inmunizados con His-Acglu-gD o con el adyuvante de Freund (Figura 5).

Discusión

Diferentes cepas de *Lactobacillus* pueden estimular las respuestas inmunitarias innatas y específicas y, en consecuencia, se han propuesto como vectores de vacunas²⁶. La activación de la respuesta inmune innata está mediada por los receptores de reconocimiento de patrones [RRP] expresados en las células inmunes que reconocen estructuras moleculares conservadas, los MAMP, que activan la producción de citoquinas, quimioquinas y otros efectores innatos. El reconocimiento de los *Lactobacillus* por el huésped está mediado predominantemente por el receptor TLR2, que reconoce el PG de la pared celular, lo que conduce a la activación y maduración de las células dendríticas²⁷ y a la diferenciación de precursores monocíticos²⁸. Además, la viabilidad de las BL no es necesaria para lograr este efecto inmunomodulador. De hecho, previamente, este equipo de trabajo demostró que las partículas semejantes a bacterias derivadas de la cepa IBL027 mejoran las respuestas inmunitarias locales y sistémicas, humorales y celulares cuando se administran conjuntamente con una la vacuna oral contra el rotavirus¹⁶, con la vacuna contra el virus de la influenza administrada por vía nasal¹⁴ o cuando son usadas como vectores del antígeno modelo Venus²¹. La interacción MAMP-RRP desencadena una respuesta inflamatoria controlada, que es el principal mecanismo de acción observado en las BLP utilizadas como plataformas de liberación de antígenos²⁵.

Tradicionalmente, las especies de *Lactobacillus* se han diseñado con el fin de expresar antígenos virales y bacterianos para inducir respuestas inmunitarias protectoras. Este enfoque tiene un problema regulatorio, ya que genera organismos genéticamente modificados que están estrictamente controlados por entes gubernamentales²⁶. En el sistema que desarrollamos en nuestro laboratorio, los antígenos etiquetados con Acglu, una proteína con dominios LysM, se adhieren pasivamente a la superficie de las BLP027 sin alteración del genotipo y, por lo tanto, sin generación de microorganismos transgénicos. Por esta razón, se espera que las vacunas basadas en esta estrategia de presentación de antígenos tengan un proceso de aprobación más fácil, más rápido y menos costoso. Teniendo esto en cuenta, se estudió si esta estrategia es adecuada para el desarrollo de una vacuna candidata contra el HSV-2.

Los virus del herpes simple son la principal causa de úlceras genitales en todo el mundo y se transmiten principalmente por

vía sexual. La respuesta inmunitaria al HSV-2 típicamente controla la infección mucosa aguda; sin embargo, el virus permanece latente en los ganglios, y hay una excreción esporádica de bajo grado del virus durante toda la vida desde las neuronas sensoriales hacia la mucosa. Por lo tanto, mientras el HSV se esconde de por vida en los ganglios del trigémino, autónomico o de la raíz dorsal, se reactiva y se elimina de manera asintomática, lo que hace que la transmisión sea alta²⁹. La terapia actual incluye tratamiento antivírico episódico para reducir el tiempo de curación y terapia antiviral supresora diaria para reducir la frecuencia de las recurrencias, la diseminación del virus y el riesgo de transmisión³⁰. Por este motivo, las vacunas preventivas o terapéuticas son muy deseables para controlar la infección y/o las enfermedades por herpes³¹. A pesar de los intentos de desarrollar vacunas eficaces contra el HSV-2, actualmente, no hay ninguna vacuna aprobada disponible.

Una vacuna preventiva sería ideal para prevenir la infección activa y la transmisión del virus, lo que evitaría la infección latente de los ganglios de la raíz dorsal, la reactivación y las manifestaciones clínicas que la acompañan. También evitaría las secuelas de la infección primaria y la propagación viral dentro de la población y las complicaciones graves que implica la reactivación³³. Sin embargo, la utilidad de tal vacuna está en duda. La mayoría de las infecciones por herpesvirus ocurren en la adolescencia³⁴, por lo que cualquier vacuna profiláctica solo tendría una utilidad óptima si su administración fuera segura durante la primera infancia. Entonces, podría ser más realista centrarse en vacunas terapéuticas, ya que el propósito de estas vacunas no es solo prevenir la diseminación del virus, sino también destinarlas a personas que ya están infectadas por el virus, con el objetivo de reducir la recurrencia clínica, la duración o gravedad de la misma³². Aunque la mayoría de las vacunas terapéuticas no son tan eficaces para atacar el virus latente, el trabajo reciente en la edición del genoma que involucra endonucleasas autoguaidas y los sistemas CRISPR/cas9 ofrecen un puente para completar la eliminación viral³⁵. Una vacuna terapéutica sería rentable y se administraría de manera más eficiente en comparación con una vacuna profiláctica, dirigida al subconjunto de individuos seropositivos con síntomas clínicos. Si bien la infección por HSV-2 tiene una amplia gama de presentaciones, que varían según el individuo (que van desde asintomáticas hasta complicaciones graves como la queratitis ocular), esta sería una estrategia más eficaz para la prevención de complicaciones clínicas graves en comparación con las vacunas profilácticas³⁴.

Se demostró que gD es la glicoproteína más abundante en el virión y el principal estímulo para la generación de anticuerpos neutralizantes contra el virus, por lo tanto, es importante su estudio para el diseño de vacunas y para el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas³⁶. Sin embargo, hasta el momento, los estudios clínicos realizados con candidatos a vacunas contra el HSV-2 han resultado decepcionantes, a pesar de los datos preclínicos prometedores con vacunas diseñadas para provocar respuestas de anticuerpos neutralizantes que se dirigen principalmente contra gD³⁷. A pesar de los estudios

preclínicos prometedores y de un ensayo clínico de fase 3 de parejas serodiscordantes, que demostraron protección en mujeres doblemente seronegativas para HSV-1 y HSV-2 (pero no en hombres), realizados con una vacuna formulada con la proteína recombinante gD-2, un adyuvante patentado de hidróxido de aluminio (alumbre) y monofosforil lípido A, gD2-AS04 (GlaxoSmithKline, Brentford, Reino Unido), un ensayo de campo posterior no encontró protección contra la infección o enfermedad por HSV-2 en mujeres doblemente seronegativas^{38,39}. La vacuna se administró por vía intramuscular a los 0, 1 y 6 meses.

Otra vacuna que completó los ensayos clínicos de fase I es una cepa de HSV-2 defectuosa en la replicación, con dos genes involucrados en la replicación viral eliminados (UL5 y UL29), denominada *dl5-29* (HSV529, Sanofi Pasteur, Lyon, Francia)⁴⁰. En estudios preclínicos, la vacuna fue segura, indujo respuestas robustas de anticuerpos y células T y redujo el establecimiento de latencia en los nervios periféricos^{40,41}. El estudio de fase I, donde se administró HSV529 o placebo mediante inyección intramuscular los días 0, 30 y 180, también encontró que la vacuna era segura y provocó un aumento de >4 veces en las respuestas de anticuerpos en participantes seronegativos para HSV, pero no, un aumento sostenido en las respuestas de anticuerpos en participantes seropositivos. Además, solo un subconjunto de participantes tuvo respuestas significativas de células T CD4 e incluso, menos CD8^{40,41}.

Actualmente, existe un impulso para examinar el potencial de otros adyuvantes y rutas de inmunización para lograr alcanzar una respuesta inmune protectora contra el herpes genital.

Por otro lado, la inmunogenicidad de una vacuna se ve afectada por la forma en que se presentan los antígenos virales (virus atenuado, con replicación defectuosa, de ciclo único, virus inactivado o subunidad de proteína con adyuvante), así como la dosis y la vía de administración. La vía de inmunización se basa a menudo en consideraciones pragmáticas más que inmunológicas. Las vacunas inactivadas pueden ser más inmunogénicas cuando se administran por vía intradérmica, por ejemplo, debido a la abundancia de células inmunoestimuladoras como las células dendríticas en la dermis³⁷.

Se demostró en estudios experimentales en animales y humanos que la inmunización nasal es un medio eficaz para inducir respuestas de memoria celular y de anticuerpos contra antígenos en el tracto respiratorio, así como en la mucosa del tracto genital⁴². Sin embargo, la vacuna contra la influenza viva atenuada Flumist® es actualmente la única vacuna nasal autorizada. Se han propuesto diferentes adyuvantes y sistemas de administración para el desarrollo de nuevas vacunas nasales eficaces. No obstante, los esfuerzos previos en humanos con adyuvantes experimentales derivados de toxinas para la inmunización nasal han fracasado debido a los casos notificados de parálisis facial transitoria (parálisis de Bell) después de la vacunación nasal⁴². Por lo tanto, la seguridad de los nuevos inmunoestimuladores diseñados para la administración nasal en humanos debe evaluarse a fondo.

Los adyuvantes actualmente aprobados están restringidos,

en gran medida, para promover respuestas a las rutas parenterales de inmunización. Sin embargo, la próxima generación de vacunas requerirá la inclusión de adyuvantes que también den lugar a potentes respuestas celulares de tipo Th1 que puedan contribuir significativamente a la inmunidad contra infecciones por patógenos intracelulares. Las nuevas estrategias de vacunación deben usar adyuvantes que estimulen las respuestas mucosas y sistémicas a través de diferentes rutas de inmunización³⁷.

En este trabajo, se evaluó la capacidad de la construcción His-Acglu-gD-BLP027 para inducir respuestas inmunes específicas cuando se administra por vía nasal a ratones adultos inmunocompetentes. La proteína recombinante His-Acglu-gD, administrada por la misma vía, se usó para las comparaciones. Se observó que la inmunización nasal con His-Acglu-gD-BLP027 fue eficaz para estimular las respuestas inmunes humorales, respiratorias y sistémicas, lo cual fue demostrado por el aumento de los niveles de anticuerpos específicos en BAL y en las muestras de suero de los ratones vacunados. El complejo His-Acglu-gD-BLP027 incrementó los niveles de IgA específica en BAL, sin embargo, los niveles de anticuerpos séricos en ratones tratados con His-Acglu-gD no fueron estadísticamente diferentes de los observados en los ratones que recibieron el complejo con las BLP027 por vía nasal. Cabe recordar que la exhibición de proteínas implica una compensación entre una alta exposición, que mejorará las interacciones con las CPA, y una baja exposición, que protegerá la proteína mostrada. El grado de exposición y su efecto sobre la inmunogenicidad no se puede medir ni racionalizar¹⁰. De hecho, el uso del sistema de anclaje propuesto en este trabajo puede resultar en respuestas del hospedador claramente diferentes⁴³; esto debe tenerse en cuenta al diseñar estrategias de entrega basadas en BLP.

Existen estudios en donde la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano-16 (*human papillomavirus*: HPV-16) se ha mostrado con éxito en la superficie de *L. lactis*, y la inmunización intranasal de ratones C57BL/6 con las bacterias recombinantes indujo una respuesta inmune específica para E7⁴⁴. Basándose en estos resultados, Ribelles *et al.* exploraron la posibilidad de generar una BAL no modificada genéticamente que muestre la oncoproteína. Para lograr esto, E7 se unió a la superficie de *L. lactis* o *L. casei* (no recombinante). La administración de estas cepas provocó una respuesta inmune débil en comparación con las respuestas observadas para las cepas modificadas genéticamente⁴⁵. Este estudio muestra claramente que la localización del antígeno juega un papel importante, pero no revela una tendencia general sobre qué tipo de localización es más prometedora o sobre cuál será la respuesta inmune inducida.

Por otro lado, recientemente, se ha demostrado que el dominio LysM es un agonista del TLR2 y que actúa como adyuvante: los dominios LysM mezclados o fusionados con antígenos pueden provocar respuestas inmunes robustas contra los mismos⁴⁶. Este efecto parece ser independiente de cualquier activación de células T o de la presencia de epítopos de células T, que es para lo que se utilizan a menudo los adyuvantes de

proteínas. Además, se ha identificado que los dominios LysM son capaces de aumentar la inmunogenicidad de los antígenos que se coadministran o se unen a ellos y también, de aumentar los títulos de anticuerpos funcionales específicos para dichos inmunógenos^{18,46}. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria potenciada, provocada por los adyuvantes inmunológicos LysM no es una respuesta proinflamatoria genérica, sino una respuesta específica que es útil para adyuvar vacunas. Es así como nuestros resultados sugieren que para algunos antígenos se podría prescindir del uso de las BLP porque, al fusionarlos con el dominio Acglu, se obtiene una respuesta inmune humoral sistémica semejante a la formulación con las partículas. Aunque es necesario realizar nuevos estudios para profundizar en este punto y para evaluar si ajustando ciertos parámetros como la dosis o el esquema de inmunización se puede obtener un efecto similar en la producción de anticuerpos en las mucosas, el uso del dominio LysM como adyuvante simplificaría el proceso de preparación de la vacuna y disminuiría los costos de la misma.

Además, los esplenocitos de los ratones tratados con este complejo produjeron niveles más altos de TNF- α e IFN- γ en respuesta a la estimulación con el antígeno específico en comparación con los otros grupos (datos no mostrados). Estos resultados indican que la vacuna experimental probada es capaz de inducir una respuesta inmune celular mediada por linfocitos Th1. Estos hallazgos son importantes, ya que diversos estudios han demostrado que, aunque los anticuerpos, especialmente de tipo IgG, contribuyen significativamente a la protección contra el herpes genital, la inmunidad protectora contra el HSV-2 se correlaciona con el desarrollo de una respuesta potente por parte de las células T CD4 $^+$ o CD8 $^+$ y del IFN- γ , ya que pueden reducir la gravedad de la infección primaria producida en ratones, eliminar el virus del sistema nervioso y protegerlos contra la reactivación *ex vivo*³⁰. Sin embargo, no todas las vacunas administradas por vía intranasal son capaces de estimular respuestas inmunes celulares. En este sentido, se realizaron estudios en donde se probó la capacidad del adyuvante IC31 $^\circ$ en combinación con la glicoproteína D del HSV-2 para inducir inmunidad protectora contra la infección por herpes genital en ratones C57BL/6 luego de administrarlo a través de las vías intranasal, intradérmica o subcutánea. La inmunización con gD más IC31 $^\circ$ a través de las tres rutas desarrolló respuestas elevadas de anticuerpos vaginales y séricos específicos con actividad neutralizante de HSV-2. Sin embargo, solo la inmunización intradérmica dio como resultado una significativa respuesta a IFN- γ esplénico⁴⁷.

Aunque el tracto genital es un componente del sistema inmune de las mucosas, presenta características únicas, que no comparte con otros tejidos mucosos, y secreciones externas típicas. Tanto los tejidos del tracto genital masculino como femenino carecen de sitios mucosos inductivos, análogos a las placas de Peyer intestinales. En consecuencia, las respuestas inmunes humorales y celulares locales, estimuladas por infecciones genitales son débiles o están ausentes, y las inmunizaciones intravaginales repetidas solo dan como resultado respuestas humorales mínimas⁴². En línea con esta observación,

varios estudios han documentado el valor de la inmunización nasal para montar inmunidad protectora contra el herpes genital en ratones⁴⁸. Por ejemplo, la inmunización por vía intranasal con gD combinada con una serie de adyuvantes de probada eficacia como la emulsión de aceite en agua MF59, las micropartículas de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLG) (encapsuladas o coadministradas), los complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) (incorporados o coadministrados con iscomatrix) y la enterotoxina desintoxicada de *E. coli* LT-K63 indujeron respuestas de anticuerpos IgA de mucosas (lavado nasal, saliva y lavado vaginal) que fueron mayores que las inducidas por la administración intramuscular de gD con MF59. La inmunización intranasal con estas formulaciones también indujo niveles sustanciales de IgG en suero y anticuerpos neutralizantes⁴⁹. Otros estudios probaron que la inmunización intranasal con gD en combinación con alfa-galactosilceramida (alfa-GalCer) provoca una fuerte respuesta sistémica de IgG específica de gD, así como una respuesta linfoproliferativa con un perfil mixto de citoquinas Th1/Th2 en el bazo, los ganglios linfáticos mediastínicos y los ganglios linfáticos genitales, y potentes respuestas linfoproliferativas e IFN- γ específicos de gD en los ganglios linfáticos genitales y en el bazo⁵⁰. La vacuna experimental His-Acglu-gD-BLP027 presentada en este trabajo, administrada a ratones adultos inmunocompetentes por vía intranasal fue eficaz para estimular las respuestas inmunes humorales, respiratorias y sistémicas y para inducir una fuerte respuesta inmune celular mediada por linfocitos Th1. Desde el punto de vista de la aplicación, el dominio LysM puede sacarse de su contexto natural y fusionarse con otras proteínas. Por lo tanto, la plataforma presentada en este trabajo permitiría unir cualquier proteína o péptido de interés al PG de las bacterias Gram positivas. Aunque es necesario realizar más estudios, esto abre la posibilidad al desarrollo de vacunas de mucosas multivalentes que permitirán aprovechar la capacidad adyuvante de las BLP optimizando los costos de producción y facilitando la administración de las mismas a la población. Además, como se demostró previamente²¹, la presentación de proteínas recombinantes en la superficie de las IBLP es una excelente estrategia por razones relacionadas con la estabilidad y la accesibilidad de la proteína presentada.

Por otro lado, las BLP derivadas de *L. lactis* con el dominio de unión al PG AcmA se evaluaron ampliamente como portadoras de antígenos respiratorios e intestinales, y se obtuvieron respuestas inmunes mucosas, específicas de dichos antígenos⁵¹. Sabiendo que las BLP se pueden usar de dos maneras: como adyuvantes al mezclarlas con los antígenos o como portadoras cuando el antígeno se une a su superficie a través de una etiqueta de unión al PG, Bi *et al.* Diseñaron una vacuna de administración nasal contra el HIV tipo 1 (HIV-1)⁸. En este estudio, unieron trímeros de la proteína gp120 del HIV-1 a la superficie de las BLP utilizando AcmA o mezclaron la proteína gp120 con las partículas, y se usaron dos vías, intramuscular o intranasal, para inmunizar ratones y cobayas. Encontraron que ambas formulaciones indujeron IgG específica de gp120, pero solo el antígeno unido a las BLP como vehículo de administración indujo

con éxito IgA mucosa en ratones, no solo en la cavidad nasal, sino también en los sitios de la mucosa vaginal y rectal. Además, los lavados nasales de cobayas inmunizadas con gp120 unida a las BLP pudieron neutralizar pseudovirus del HIV-1 de nivel 1⁸. Esto indica que la unión de trímeros de gp120 a las BLP es una buena estrategia para inducir respuestas inmunes humorales y mucosas y que las BLP utilizadas como portadores de los trímeros de gp120 en su superficie inducen mejores respuestas inmunitarias de la mucosa que las BLP mezcladas con los trímeros de esta proteína.

Si bien en este trabajo se valoró la producción de anticuerpos sistémicos y del tracto respiratorio específicos para gD, es necesario continuar con más estudios que evalúen los niveles de anticuerpos presentes en la mucosa genital, su capacidad de neutralización viral y la capacidad protectora de la vacuna frente a un desafío con HSV-2.

Se requiere una vacuna que, administrada por vía intranasal, pueda activar el sistema inmunológico estimulando los sitios mucosos distantes. Los resultados aquí obtenidos y los antecedentes mencionados nos permiten proponer la plataforma constituida por Acglu-BLP027 como una herramienta prometedora para la generación de vacunas mucosas que estimulen no solo la inmunidad local, sino que también potencien la respuesta inmune en sitios mucosos distantes.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada con becas competitivas de la Fundación Allende y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2016-0853) de la Dra. María Guadalupe Vizoso Pinto y (PICT-2016-0410) del Dr. Julio Villena.

Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Kardani K, Basimi P, Fekri M, Bolhassani A. Antiviral therapy for the sexually transmitted viruses: recent updates on vaccine development. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2020;13(9):1001-46. doi:10.1080/1751433.2020.1814743
- Johnston C, Gottlieb SL, Wald A. Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus. *Vaccine.* 2016;34(26):2948-52. doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.076
- Spicknall IH, Looker KJ, Gottlieb SL, Chesson HW, Schiffer JT, Elmes J, et al. Review of mathematical models of HSV-2 vaccination: Implications for vaccine development. *Vaccine.* 2019;37(50):7396-407. doi:10.1016/j.vaccine.2018.02.067
- Stinn T, Kuntz S, Varon D, Huang ML, Selke S, Njikan S, et al. Subclinical Genital Herpes Shedding in HIV/Herpes Simplex Virus 2-Coinfected Women during Antiretroviral Therapy Is Associated with an Increase in HIV Tissue Reservoirs and Potentially Promotes HIV Evolution. *J Virol.* 2020;95(1). doi:10.1128/JVI.01606-20
- LaTourette PC, 2nd, Awasthi S, Desmond A, Pardi N, Cohen GH, Weissman D, et al. Protection against herpes simplex virus type 2 infection in a neonatal murine model using a trivalent nucleoside-modified mRNA in lipid nanoparticle vaccine. *Vaccine.* 2020;38(47):7409-13. doi:10.1016/j.vaccine.2020.09.079
- Byrne CM, Gantt S, Coombs D. Effects of spatiotemporal HSV-2 lesion dynamics and antiviral treatment on the risk of HIV-1 acquisition. *PLoS Comput Biol.* 2018;14(4):e1006129. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006129
- Egan KP, Hook LM, Naughton A, Pardi N, Awasthi S, Cohen GH, et al. An HSV-2 nucleoside-modified mRNA genital herpes vaccine containing glycoproteins gC, gD, and gE protects mice against HSV-1 genital lesions and latent infection. *PLoS Pathog.* 2020;16(7):e1008795. doi: 10.1371/journal.ppat.1008795
- Bi J, Li F, Zhang M, Wang H, Lu J, Zhang Y, et al. An HIV-1 vaccine based on bacterium-like particles elicits Env-specific mucosal immune responses. *Immunol Lett.* 2020;222:29-39. doi: 10.1016/j.imlet.2020.03.002
- Sato A, Suwanto A, Okabe M, Sato S, Nochi T, Imai T, et al. Vaginal memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for protective T cell recruitment and prevention of genital HSV-2 disease. *J Virol.* 2014;88(23):13699-708. doi: 10.1128/JVI.02279-14
- Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):592-605. doi: 10.1038/nri3251
- Villena J, Chiba E, Tomosada Y, Salva S, Marranzino G, Kitazawa H, et al. Orally administered Lactobacillus rhamnosus modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C). *BMC Immunol.* 2012;13:53. doi: 10.1186/1471-2172-13-53
- Villena J, Medina M, Vintini E, Alvarez S. Stimulation of respiratory immunity by oral administration of Lactococcus lactis. *Can J Microbiol.* 2008;54(8):630-8. doi: 10.1139/w08-052
- Villena J, Racedo S, Aguero G, Bru E, Medina M, Alvarez S. Lactobacillus casei improves resistance to pneumococcal respiratory infection in malnourished mice. *J Nutr.* 2005;135(6):1462-9. doi: 10.1093/jn/135.6.1462
- Tonetti FR, Islam MA, Vizoso-Pinto MG, Takahashi H, Kitazawa H, Villena J. Nasal priming with immunobiotic lactobacilli improves the adaptive immune response against influenza virus. *Int Immunopharmacol.* 2020;78:106115. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106115
- Villena J, Barbieri N, Salva S, Herrera M, Alvarez S. Enhanced immune response to pneumococcal infection in malnourished mice nasally treated with heat-killed Lactobacillus casei. *Microbiol Immunol.* 2009;53(11):636-46. doi: 10.1111/j.1348-0421.2009.00171.x
- Raya Tonetti F, Arce L, Salva S, Alvarez S, Takahashi H, Kitazawa H, et al. Immunomodulatory Properties of Bacterium-Like Particles Obtained From Immunobiotic Lactobacilli: Prospects for Their Use as Mucosal Adjuvants. *Front Immunol.* 2020;11:15. doi: 10.3389/fimmu.2020.00015
- Visweswaran GR, Leenhouts K, van Roosmalen M, Kok J, Buist G. Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(10):4331-45. doi: 10.1007/s00253-014-5633-7
- van Roosmalen ML, Kanninga R, El Khattabi M, Neef J, Audouy S, Bosma T, et al. Mucosal vaccine delivery of antigens tightly bound to an adjuvant particle made from food-grade bacteria. *Methods.* 2006;38(2):144-9. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.09.015
- Bosma T, Kanninga R, Neef J, Audouy SA, van Roosmalen ML, Steen A, et al. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(1):880-9. doi: 10.1128/AEM.72.1.880-889.2006
- Van Braeckel-Budimir N, Hajema BJ, Leenhouts K. Bacterium-like particles for efficient immune stimulation of existing vaccines and new subunit vaccines in mucosal applications. *Front Immunol.* 2013;4:282. doi: 10.3389/fimmu.2013.00282
- Raya-Tonetti F, Muller M, Sacur J, Kitazawa H, Villena J, Vizoso-Pinto MG. Novel LysM motifs for antigen display on lactobacilli for mucosal immunization. *Sci Rep.* 2021;11(1):21691. doi: 10.1038/s41598-021-01087-8
- Osterman A, Vizoso Pinto MG, Haase R, Nitschko H, Jager S, Sander M, et al. Systematic screening for novel, serologically reactive Hepatitis E Virus epitopes. *Virology Journal.* 2012;9:28. doi: 10.1186/1743-422X-9-28

- 9-28.
23. Vizoso Pinto MG, Pfrepper KI, Janke T, Noelting C, Sander M, Lueking A, et al. A systematic approach for the identification of novel, serologically reactive recombinant Varicella-Zoster Virus (VZV) antigens. *Virolgy journal*. 2010;7:165. doi: 10.1186/1743-422X-7-165.
24. Domingo C, Gadea I, Pardeiro M, Castilla C, Fernandez S, Fernandez-Clua MA, et al. Immunological properties of a DNA plasmid encoding a chimeric protein of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B and glycoprotein D. *Vaccine*. 2003;21(25-26):3565-74. doi: 10.1016/s0264-410x(03)00423-7.
25. Arce LP, Raya Tonetti MF, Raimondo MP, Muller MF, Salva S, Alvarez S, et al. Oral Vaccination with Hepatitis E Virus Capsid Protein and Immuno-biotic Bacterium-Like Particles Induce Intestinal and Systemic Immunity in Mice. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2019. doi: 10.1007/s12602-019-09598-7.
26. LeCureux JS, Dean GA. Lactobacillus Mucosal Vaccine Vectors: Immune Responses against Bacterial and Viral Antigens. *mSphere*. 2018;3(3). doi: 10.1128/mSphere.00061-18.
27. Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Bruijns SC, Singh SK, Valence F, et al. S layer protein A of Lactobacillus acidophilus NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(49):19474-9. doi: 10.1073/pnas.0810305105.
28. Song J, Lang F, Zhao N, Guo Y, Zhang H. Vaginal Lactobacilli Induce Differentiation of Monocytic Precursors Toward Langerhans-like Cells: in Vitro Evidence. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2437. doi: 10.3389/fimmu.2018.02437. eCollection 2018.
29. Chentoufi AA, Dhanushkodi NR, Srivastava R, Prakash S, Coulon PA, Zayou L, et al. Combinatorial Herpes Simplex Vaccine Strategies: From Bedside to Bench and Back. *Front Immunol*. 2022;13:849515. doi: 10.3389/fimmu.2022.849515. eCollection 2022.
30. Bernstein DI, Flechtner JB, McNeil LK, Heineman T, Oliphant T, Tasker S, et al. Therapeutic HSV-2 vaccine decreases recurrent virus shedding and recurrent genital herpes disease. *Vaccine*. 2019;37(26):3443-50. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.05.009.
31. Schiffer JT, Swan DA, Corey L, Wald A. Rapid viral expansion and short drug half-life explain the incomplete effectiveness of current herpes simplex virus 2-directed antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(12):5820-9. doi: 10.1128/AAC.01114-13.
32. Kardani K, Basimi P, Fekri M, Bolhassani A. Antiviral therapy for the sexually transmitted viruses: recent updates on vaccine development. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2020;1:46. doi: 10.1080/17512433.2020.1814743.
33. Krishnan R, Stuart PM. Developments in Vaccination for Herpes Simplex Virus. *Front Microbiol*. 2021;12:798927. doi: 10.3389/fmicb.2021.798927.
34. ames C, Harfouche M, Welton NJ, Turner KM, Abu-Raddad LJ, Gottlieb SL, et al. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*. 2020;98(5):315-29. doi: 10.2471/BLT.19.237149.
35. Zhang I, Hsiao Z, Liu F. Development of Genome Editing Approaches against Herpes Simplex Virus Infections. *Viruses*. 2021;13(2). doi: 10.3390/v13020338.
36. Du R, Wang L, Xu H, Wang Z, Zhang T, Wang M, et al. A novel glycoprotein D-specific monoclonal antibody neutralizes herpes simplex virus. *Antiviral Res*. 2017;147:131-41. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.10.013.
37. Burn Aschner C, Pierce C, Knipe DM, Herold BC. Vaccination Route as a Determinant of Protective Antibody Responses against Herpes Simplex Virus. *Vaccines* [Basel]. 2020;8(2). doi: 10.3390/vaccines8020277.
38. Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, Bernstein DI, Mindel A, Sacks S, et al. Glycoprotein-D-adjvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med*. 2002;347(21):1652-61. doi: 10.1056/NEJMoa011915.
39. Belshe RB, Leone PA, Bernstein DI, Wald A, Levin MJ, Stapleton JT, et al. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med*. 2012;366(1):34-43. doi: 10.1056/NEJMoa1103151.
40. Dropulic LK, Oestreich MC, Pietz HL, Laing KJ, Hunsberger S, Lumbard K, et al. A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Phase 1 Study of a Replication-Defective Herpes Simplex Virus (HSV) Type 2 Vaccine, HSV529, in Adults With or Without HSV Infection. *J Infect Dis*. 2019;220(6):990-1000. doi: 10.1093/infdis/jiz225.
41. Bernard MC, Barban V, Pradezynski F, de Montfort A, Ryall R, Caillet C, et al. Immunogenicity, protective efficacy, and non-replicative status of the HSV-2 vaccine candidate HSV529 in mice and guinea pigs. *PLoS One*. 2015;10(4):e0121518. doi: 10.1371/journal.pone.0121518.
42. Mestecky J, Moldoveanu Z, Russell MW. Immunologic uniqueness of the genital tract: challenge for vaccine development. *Am J Reprod Immunol*. 2005;53(5):208-14. doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00267.x.
43. Michon C, Langella P, Eijsink VG, Mathiesen G, Chatel JM. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. *Microbial cell factories*. 2016;15:70. doi: 10.1186/s12934-016-0468-9.
44. Cortes-Perez NG, Bermudez-Humaran LG, Le Loir Y, Rodriguez-Padilla C, Gruss A, Saucedo-Cardenas O, et al. Mice immunization with live lactococci displaying a surface anchored HPV-16 E7 oncoprotein. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;229(1):37-42. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00778-X.
45. Ribelles P, Benbouziane B, Langella P, Suarez JE, Bermudez-Humaran LG. Protection against human papillomavirus type 16-induced tumors in mice using non-genetically modified lactic acid bacteria displaying E7 antigen at its surface. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013;97(3):1231-9. doi: 10.1007/s00253-012-4575-1.
46. Altindis Edo U, Liberatori S, Soldani E. *Inventor Vaccine adjuvants* 2015.
47. Cuburu N, Wang K, Goodman KN, Pang YY, Thompson CD, Lowy DR, et al. Topical herpes simplex virus 2 (HSV-2) vaccination with human papillomavirus vectors expressing gB/gD ectodomains induces genital-tissue-resident memory CD8+ T cells and reduces genital disease and viral shedding after HSV-2 challenge. *J Virol*. 2015;89(1):83-96. doi: 10.1128/JVI.02380-14.
48. Wizel B, Persson J, Thorn K, Nagy E, Harandi AM. Nasal and skin delivery of IC31[(R)]-adjuvanted recombinant HSV-2 gD protein confers protection against genital herpes. *Vaccine*. 2012;30(29):4361-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.02.019.
49. Uguzzoli M, O'Hagan DT, Ott GS. Intranasal immunization of mice with herpes simplex virus type 2 recombinant gD2: the effect of adjuvants on mucosal and serum antibody responses. *Immunology*. 1998;93(4):563-71. doi: 10.1046/j.1365-2567.1998.00441.x.
50. Lindqvist M, Persson J, Thorn K, Harandi AM. The mucosal adjuvant effect of alpha-galactosylceramide for induction of protective immunity to sexually transmitted viral infection. *Journal of immunology*. 2009;182(10):6435-43. doi: 10.4049/jimmunol.0900136.
51. Lu J, Hou H, Wang D, Leenhoux K, Roosmalen MLV, Sun T, et al. Systemic and mucosal immune responses elicited by intranasal immunization with a pneumococcal bacterium-like particle-based vaccine displaying pneumolysin mutant Plym2. *Immunology letters*. 2017;187:41-6. doi: 10.1016/j.imlet.2017.05.003.



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución - No Comercio- Compartir - igual 4.0 Internacional - Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que: se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.