EFECTO ASOCIADO A LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN VACUNACIÓN ADN FRENTE AL VIRUS DEL MAEDI-VISNA

de Andrés[1], X., Reina[1], R ., Ramírez[1], H., Crespo[1], H., Glaría[1], I., Pérez[2], M., Grilló[1], MJ., Luján[2], L., Blacklaws[3], B., Niesalla[4], H., Harkiss[4], G., de Andrés[1], D. y Amorena[1],B.
[1]Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra; [2]Universidad de Zaragoza; [3]University of Cambridge, Cambridge, UK; [4]University of Edinburgh, Edinburgh, UK ximena.deandres@unavarra.es.

INTRODUCCIÓN

El virus del Maedi/visna (VMV) infecta al ganado ovino y caprino y pertenece al ampliamente extendido grupo de lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR) (Glaría et al, 2003). Hasta el momento, las estrategias seguidas para la eliminación de LVPR se han basado en el diagnóstico de la infección y sacrificio de los animales seropositivos, pero no se han desarrollado vacunas que prevengan eficazmente la infección. En especies como la equina, primates no humanos y humanos, el control de la viremia inicial tras la infección por lentivirus está asociado a la presencia de los linfocitos T citotóxicos (CTL) (McGuire et al., 2004), si bien en las infecciones por VMV también se han detectado CTL en animales infectados (Blacklaws et al*.,* 1994, 1995b). Las vacunas generadas hasta el momento frente al VMV han conseguido disminuir la carga viral tras el desafío con el VMV pero no prevenir la infección vírica crónica y pueden provocar un aumento de la lesión en órganos diana (Reina et al., 2008). Algunas de ellas son vacunas ADN, capaces de generar respuestas inmunes mediadas por células o por anticuerpos (Donnelly et al., 2005). En este estudio, hemos realizado un análisis comparativo de los efectos que ejerce una vacunación conjunta con plásmidos recombinantes, que incluyen los genes *gag* y *env* del VMV, en presencia o no de plásmidos recombinantes para distintos adyuvantes inmunológicos (molécula coestimuladora CD80 sóla o con CD86; o interferón gamma, IFN-γ), sobre la respuesta inmune celular y si dicha respuesta ejerce una protección eficaz frente a la infección y/o las respuestas inflamatorias (aparición de lesiones).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 37 animales raza Lleyn de un año de edad, libres de VMV. La inmunización se realizó por la vía epidérmica mediante el método balístico en las semanas 0 y 4 con plásmidos pN3 recombinantes, concretamente pN3-*gag* y pN3-*env*, en presencia o no de los adyuvantes pN3-*CD80*, pN3-*CD86* o pN3-*IFN* (10 μg/plásmido/inóculo/animal), estableciéndose los grupos de inmunización indicados en la Tabla 1 y un grupo control inoculado con pN3 sin inserto. Se realizó un recuerdo (semana 10) con el virus vaccinia Ankara recombinante (MVA) que expresaba el gen *gag* (MVA-*gag*) y el *env* (MVA-*env*) del VMV. El desafío con el VMV se realizó con 1×10^3 $TCID_{50}$ a las 12 semanas de la primera inmunización por la vía intra-traqueal. El protocolo de inmunización-desafío utilizado fue el descrito previamente (Niesalla et al., 2009). Se recogieron muestras de sangre de cada animal a tiempo 0 y en las semanas 7, 12, 16, 20 y 24 y se extrajo suero para los ensayos de respuesta de anticuerpos a la vez que se aislaron células mononucleadas sanguíneas (PBMC) para los ensayos de medición de respuesta celular (respuesta linfoproliferativa frente a antígenos GAG del VMV y actividad CTL frente a fibroblastos infectados con VMV) según la metodología descrita (Reina et al., 2008). El grado de protección se cuantificó determinando la carga proviral por PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR) de la región *gag* en sangre, pulmón y ganglio mediastínico (MLN) y el grado de inflamación/lesión de dichos órganos post-mortem (Reina et al., 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la inmunización con plásmidos *env* y *gag*, el recuerdo con un MVA recombinante (MVA-*gag* y MVA-*env*) y el desafío con VMV, en los 4 grupos inmunizados (Tabla1) se observaron

diferencias significativas en respuesta inmune celular respecto del control sin inmunizar (n= 7-8 ovinos por grupo), a las semanas indicadas en la Tabla 1.

***Tabla 1**. Resumen del estudio comparativo de los grupos inmunizados con DNA y sometidos a un desafío por VMV: respuesta inmune celular linfoproliferativa y de actividad CTL antes del desafío y protección frente a la infección e índice lesional en examen post-mortem.*

Grupos inmunización	Respuesta inmune celular previamente al desafío con VMV		Protección tras el desafío con VMV		
	Linfoproliferativa	Actividad CTL (% animales)	Porcentaje de animales infectados		Índice lesional
			Sangre	Pulmón y MLN	
gag-env	Semana 12*	Semana 12 (57%)	100	42,8	0,133
gag-env-CD80	Semana 12*	Semana 7 (25%)	100	71,4	0,222*
gag-env-CD80-CD86	Semana 7*, 12*	Semana 7* (62,5%)	50	25	0,233*
gag-env-IFN	Semana 7*, 12*	Semana 7 (48,5%)	100	57,2	0,120

* Diferencias significativas (P<0,05) respecto al grupo control.

La respuesta linfoproliferativa, generalmente de linfocitos Th, resultó significativa en todos los grupos inmunizados previamente al desafío con el VMV (semana 12), siendo más temprana (semana 7) en los grupos que recibieron ambas moléculas coestimuladoras CD80-CD86 y el grupo que recibió IFN-γ, aunque se desconocía el perfil Th1-Th2 (de ayuda a células CTL y B). Se detectó actividad CTL en todos los grupos inmunizados previamente al desafío con el VMV (semana 12), pero sólo los grupos que recibieron adyuvantes inmunológicos (moléculas CD80 y/o CD86; o IFN-γ) presentaron una respuesta CTL temprana (semana 7). Dentro de estos grupos, el que presentó mayor respuesta CTL en dicho momento fue el que recibió CD80+CD86 (62,5%), difiriendo significativamente del grupo control (P<0,05) seguido del grupo con IFN-γ (48,5%) y del grupo con CD80 sólo (25%), que no había mostrado diferencias en respuesta linfoproliferativa, a la semana 7. Por otra parte, el grupo inmunizado sólo con *gag-env* presentó respuesta CTL (57%) pero más tarde (en la semana 12) igual que había sucedido en la respuesta linfoproliferativa. Así, la presencia de moléculas coestimuladoras probablemente favoreció la presentación antigénica en la vacunación y generó linfocitos de memoria Th1 y pre-CTL. Tras el desafío con el virus (semana 12), los grupos que recibieron las moléculas coestimuladoras CD80 y/o CD86 presentaron menor número de animales CTL-positivos que el grupo control, mientras que los grupos con IFN-γ y *gag-env* lo duplicaron. Al determinar el efecto protector de la vacuna mediante Q-PCR se observó que el grupo que recibió ambas moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 mostró un grado de protección significativo, con un 50% de los animales libres de infección. Así, esta protección se hallaba asociada a una temprana respuesta significativa tanto de CTL como linfoproliferativa (semana 7). Ello permitiría una prolongada expansión clonal, formación de células de memoria pre-CTL y diseminación de las células CTL específicas de antígeno a distintos órganos eliminando al virus tras el desafío. Sin embargo, esta protección (ausencia de carga viral) en el grupo con CD80 y CD86, no conllevó un menor grado de lesiones en los órganos diana, pues éstos presentaron en dicho grupo un mayor índice de patología (lesión/inflamación) que el grupo control. Así, la respuesta celular aumentada tras la vacunación y el desafío con el virus parece resultar en un mayor grado lesional (infiltración linfoide y/o hiperplasia folicular). Este incremento significativo de la lesión se encontró en los dos grupos de animales inmunizados con moléculas B7. Sería necesario prolongar el período de estudio para determinar si estas lesiones terminarían por desaparecer o desembocarían en lesiones graves. En el caso del

grupo que recibió el IFN-γ, en el que la respuesta linfoproliferativa generada por la vacuna fue similar a la del grupo con CD80+CD86 y la respuesta CTL temprana no fue significativa pero sí fue elevada tras el desafío, no hubo protección frente a la infección,. En conjunto, estos resultados indican que el tiempo de aparición de respuesta celular, el tipo de respuesta (CTL, Th1, Th2), la calidad (memoria central frente a efectora) y la cantidad y distribución de las células CTL generadas por la vacuna son relevantes a la hora de eliminar el virus de los órganos diana. Finalmente, la producción de anticuerpos (inclusive neutralizantes) no se halló relacionada con la protección frente al virus en las condiciones empleadas en este estudio (datos no mostrados), ya que no fueron detectados previamente al desafío con el virus. En resumen, a pesar de la protección significativa frente a la infección obtenida en el grupo inmunizado en el que se indujo mayor y más temprana respuesta CTL *(gag-eng-CD80-CD86)*, es necesario incrementar dicha protección y determinar si las lesiones en los órganos diana del virus tras el desafío desaparecen con el tiempo. El desarrollo de métodos que induzcan una respuesta inmune, disminuyan en mayor grado la proporción de animales infectados y eviten el desarrollo de lesiones duraderas es un desafío para futuros estudios de vacunación frente a LVPR.

REFERENCIAS

• Glaría, I., Reina, R., García, I., et al. 2003. *ITEA* 24:408-410. • Blacklaws, B.A., Bird, P., Allen, D. & McConnell, I.J. 1994. *Gen Virol.*;75:1589-1596. • Blacklaws, B., Bird, P. & McConnell, I. 1995. *Trends Microbiol.* 3:434-440. • Donnelly, J.J., Wahren, B. & Liu, M.A. 2005. *J Immunol.* 175:633-639. • Niesalla, H., de Andrés, X., Barbezange, C., et al. 2009 *Vaccine.* 27: 260-269. • Reina, R., Glaria, I., Benavides, J., et al. 2007. *Viral Immunol.* 20:609-622. • Reina, R., Berriatua, E., Luján, L., et al. 2008. *Vet J*. • McGuire, T.C., Fraser, D.G. & Mealey, R.H. 2004. *Anim Health Res Rev.* 5:271-276. • Reina, R., Barbezange, C., Niesalla, H., et al. 2008. *Vaccine.* 26:4494-4505.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido cofinanciado por CICYT (AGL2003-08977-C03-01 y AGL2007-66874-C04) y Unión Europea (QLK2-CT-2002-00617).

EFFECT ASSOCIATED WITH CELLULAR IMMUNE RESPONSES UPON DNA-PRIME-BOOST IMMUNIZATION AGAINST VISNA/MAEDI VIRUS

ABSTRACT: Visna/Maedi virus (VMV) establishes a life-long infection of sheep and belongs to the small ruminant lentiviruses (SRLV). SRLV are widely spread and strategies based on early diagnosis, management and culling of seropositive animals have been applied in order to eradicate infection. However, efficient immunoprophylactic tools have not been developed against SRLV and immunization has not conferred sterilizing immunity so far. Cytotoxic T-lymphocytes (CTL) play an important role in immune control of both acute and chronic viral infections and are key immunological mediators of viral clearance. Thus, a vaccine against VMV that triggers CTL production would be expected to prevent infection and consequently, lesion development. In this study we have shown that a DNA-prime boost vaccination regime with two VMV genes (*gag* and *env*) and including or not an immunologic adjuvant (interferon-gamma, IFN-γ), B7 costimulatory molecules (*CD80* and/or *C86*) followed by VMV challenge has been assessed. The inclusion of immunologic adjuvants was successful in inducing a CTL response in sheep, but only the group with both B7 molecules (*gag-env-CD80-CD86*) was able to avoid partially virus infection (50% of the immunized animals were free of virus). Interestingly, lesion development (mononuclear infiltrates) in the target organs (lung and mediastinal lymph node) was not prevented in the protected group. Further studies to improve the degree of protection against infection and determine the evolution of the lesions originated upon vaccination-challenge are warranted.
Keywords: *cytotoxic T cells; Visna/Maedi virus; vaccines; protection; DNA immunization*