

UCH-FC
Biotecnología
F634
C.1



Escuela de Pregrado
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

**CARACTERIZACIÓN DE LA MEMORIA INMUNOLÓGICA
GENERADA POR VACUNAS DE ADN: LT CD8 DE MEMORIA
RESIDENTES DE LA PIEL**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

Camila Saharaí Flores González

Director del Seminario de Título: Dr. Álvaro Lladser

Profesor Patrocinante: Dr. Mario Rosemblatt

Junio 2016
Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

CAMILA SAHARAÍ FLORES GONZÁLEZ

“Caracterización de la memoria inmunológica generada por vacunas de ADN: LT CD8 de memoria residentes de la piel”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dr. Alvaro Lladser Caldera
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul del Dr. Alvaro Lladser Caldera sobre una línea horizontal.

Dr. Mario Roseblatt Silber
Prof. Patrocinante del Seminario

Firma manuscrita en azul del Dr. Mario Roseblatt Silber sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Alejandro Roth Metcalfe
Presidente

Firma manuscrita en azul del Dr. Alejandro Roth Metcalfe sobre una línea horizontal.

Dra. María Rosa Bono Merino
Evaluadora

Firma manuscrita en azul de Dra. María Rosa Bono Merino sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, septiembre de 2016



Mi hermana quiso escribir mi biografía:

Camila Flores llegó al mundo el 3 de abril de 1990, pero no llegué a conocerla hasta que nací, cinco años después. En prácticamente todos mis recuerdos de infancia, está la imagen constante de la Camila, con su forma de ser tan marcada y que en esencia sigue siendo la misma hoy en día: muy determinada, y ensimismada en sus pensamientos. Nos sorprendía y entretenía a todos con sus ocurrencias extravagantes, y se hacía notar por su creatividad y capacidad de absorber nuevos conocimientos.

Como toda hermana menor, pese a las miles de peleas típicas de hermanas que teníamos, veía en ella una persona a quien seguir y admirar. Y así me di cuenta del gran rango de capacidades que tenía, y tiene. Siempre fue matea en el colegio, además de alternar su tiempo entre tocar el teclado, dibujar y escribir historias. Desde el colegio la vi despertar muy temprano, sobrellevar largos viajes en el transporte público, y esforzarse para que le fuera bien en el liceo, pese a lo tarde y cansada que regresaba cada día. Aunque sus talentos eran diversos, estos se inclinaron hacia el mundo de las ciencias, y así fue como empezó su camino en la biotecnología.

Año a año la vimos aprender, estresarse, pegar papelógrafos en su pieza e inventar canciones para aprenderse fórmulas y conceptos que para nosotros, su familia, era

algo más ilegible que el chino, y lograba sacar cada ramo y superar cada desafío. Desde que éramos muy pequeñas me ayudaba a estudiar, y aun cuando en la universidad el tiempo no le sobraba, también me enseñaba cuando yo lo necesitaba. No salíamos limpias de un par de frustraciones, pero agradezco su buena disposición y paciencia.

En sus cinco años de vida universitaria, fuimos testigos de cómo día a día se volvía más y más inteligente, cómo entraban y salían distintas personas de su vida, cómo se llenaba de experiencias, y sobre todo, cómo crecía como persona. En sus primeros pasos en laboratorios, tuvo la fortuna de conocer a Felipe, y lo que comenzó como una amistad entre colegas, se convirtió en un matrimonio que de cierta forma, la ciencia unió. Debo decir que son una pareja que se complementa a la perfección.

Camila es una persona que posee una vasta inteligencia, pero que sin embargo jamás ha tenido una gota de arrogancia en su ser. Es un alma divertida, loca y libre, enamorada del sur, del campo y de la naturaleza. Y también es a la vez, en su vida laboral y estudiantil, una persona seria, trabajadora a más no poder, exigente consigo misma y que cumple con cada meta que se propone. He estado viviendo con ella estos últimos meses, mientras su esposo estudia en Estados Unidos, y más todos los años de compartir en familia, puedo dar fe de cada esfuerzo que ha hecho. Sé que sólo le esperan éxitos en la vida, de corazón se lo deseo, y no tengo dudas de que así será.

De su hermana, Paula F.

*A mi esposo, familia, amigos, Bobby, Morde, Timy, Pensamiento, Recuerdo, Mansita,
Garfield y compañía.*

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres, hermana, abuelos, tíos, primas y familia en general. Mis padres Nelly y Gerardo me apoyaron desde pequeña, entregándome amor, valores e interés por la lectura. Ellos me formaron; mis logros son gracias a ellos. Gracias a mi hermana Paula, ella me enseñó a compartir y sobrellevar las diferencias, nuestras peleas de hermanas y nuestros juegos de niñas siempre los tengo presentes.

Como la universidad quedaba lejos de mi hogar, mis abuelos Kokita y Luis me acogieron en su casa, ellos hicieron una pieza para su nieta. Mi tía Gricel y abuela Nane, también me regalonearon durante la etapa universitaria, muchas veces me quedé con ellas. Mi tata Osvaldo me malcrió desde pequeña y me apoyó también.

Gracias a mis amigos: Vivian, Francisca, Consuelo, Silvia, Kritsye, Benjamín, Marco, Gisselle, Katherine, Nicole, Macarena, James, Joaquín y Berta. Son los mejores.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio de Inmunoterapia Génica y a mi profesor tutor Álvaro por entregarme un espacio donde crecí y aprendí mucho.

Finalmente gracias a Felipe por su apoyo, empezamos como compañeros de laboratorio haciendo nuestras tesis y sin saberlo, terminamos siendo esposos. Nos apoyamos en todo momento y así será siempre.

Gracias a Chanco por liberarme de la ciudad. Tierra de mis ancestros que me da paz y relajo dentro de periodos de estrés. Gracias a Dios por acompañarme durante mis aciertos y errores, y entregarme una familia maravillosa.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
Inmunología del cáncer e inmunoterapias.....	1
Vacunas de ADN	2
Vacunas de ADN y memoria inmunológica.....	4
TRM: LT de memoria residentes.....	8
Hipótesis.....	11
Objetivos	11
MATERIALES Y METODOS.....	12
Materiales.....	12
Electroporación de bacterias	14
Extracción y purificación de ADN plasmidial	15
Animales.....	15
Inmunización mediante electroporación intradérmica in vivo	15
Ensayos de desafío tumoral	16
Procesamiento de la sangre para análisis de LT CD8	16
Reestimulación in vitro de linfocitos provenientes de la sangre.....	17
Tinción de superficie e intracelular de células y análisis por citometría de flujo	17
Ensayo para evaluar poblaciones efectoras en sangre.....	18
Ensayo para evaluar poblaciones de memoria en bazo.....	18
Procesamiento del bazo para análisis de LT CD8.....	19
Ensayo para evaluar linfocitos de memoria en piel	19
Procesamiento de la piel para análisis de LT CD8.....	20
Detección de LT CD8 OVA <small>(257-264)</small> específicos con el dextrámero H-2 Kb OVA <small>(257-264)</small> (SIINFEKL).....	20
Citometría de flujo.....	21
Análisis estadístico	21
RESULTADOS	22

Estudio de la capacidad de las vacunas de ADN convencionales y DREP para generar respuestas potentes de LT CD8 citotóxicos efectoras y protección frente a un desafío con células tumorales de melanoma	22
Estudio de la generación de LT CD8 efectoras y precursoras de memoria en animales inmunizados con vacunas de ADN convencionales y DREP vía intradérmica	25
Estudio de la generación de LT CD8 específicos de memoria central (T_{CM}), efectora (T_{EM}) y residente (T_{RM}) de la piel en animales inmunizados con vacunas de ADN convencionales y DREP	28
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Frecuencia de LT CD8 citotóxicos específicos contra OVA (257-264) productores de IFN- γ y TNF- α en sangre y protección frente a un desafío tumoral con células de melanoma B16F10-OVA en ratones tratados con vacunas de ADN convencionales y DREP.....	24
Figura 2 Frecuencia de poblaciones efectoras de LT CD8 específicos contra OVA (257-264) en sangre de ratones inmunizados con vacunas de ADN convencionales y DREP	27
Figura 3 Frecuencia de poblaciones de LT CD8 de memoria (T_{EM} y T_{CM}) específicos contra OVA (257-264) en bazo de ratones inmunizados con vacunas de ADN convencionales y DREP.....	30
Figura 4 Detección de T_{RM} CD8, específicos contra OVA (257-264) en piel de ratones inmunizados con vacunas de ADN convencionales y DREP	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CD44: Cúmulo de diferenciación 44

CD62L: Selectina L

CD69: Cúmulo de diferenciación 69

CD103: Cúmulo de diferenciación 103

CD127: Cadena α del receptor de interleuquina 7 (IL-7)

CMV: Promotor del citomegalovirus

DC: Células dendríticas

DPEC: Linfocitos T CD8 efectores doble positivos (del inglés double-positive effector cells)

DREP: Vacunas de ADN basadas en replicones alfavirales

EEC: Linfocitos T CD8 efectores de fase temprana (del inglés early effector cells).

FasL: Fas ligando

IFN- γ : Interferón γ

IFN I: Interferón de tipo I

KLRG1: Receptor tipo lectina (del inglés killer lectin-like receptor)

L: Litro

LT: Linfocitos T

mARN: ARN mensajero

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

ml: Mililitro

mM: Milimolar

MPEC: LT efectores precursores de memoria (del inglés memory precursor effector cells).

PFN: Perforina

PKR: Proteína quinasa R

RCF: Fuerza centrífuga relativa

RLR: Receptor tipo RIG-I

SLEC: LT efectores de vida corta (del inglés short-lived effector cells)

T_{EM}: LT CD8 de memoria efectores

T_{CM}: LT CD8 de memoria central

TCR: Receptor de células T

T_{RM}: LT CD8 de memoria residentes

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TLR 3: Receptor 3 tipo Toll

µg: Microgramo

U.I: Unidad internacional

RESUMEN

Las vacunas de ADN son una estrategia atractiva para generar una respuesta eficiente de linfocitos T CD8 antitumorales capaces de destruir el tumor y generar memoria inmunológica, protegiendo frente a la aparición de nuevos tumores. Sin embargo, la memoria inmunológica que generan las vacunas antitumorales ha sido pobremente caracterizada.

Basados en la capacidad de generar memoria, los linfocitos T CD8 (LT CD8) efectores se clasifican en linfocitos T efectores de vida corta (SLEC, del inglés short-lived effector cells) y linfocitos T efectores precursores de memoria (MPEC, del inglés memory precursor effector cells). Los MPEC dan origen a los LT CD8 de memoria efectores (T_{EM}), a los LT CD8 de memoria central (T_{CM}) y a un nuevo subtipo recientemente descrito llamado LT CD8 de memoria residente (T_{RM}) que se establece permanentemente en los órganos no linfoides. Los linfocitos T_{RM} CD8 se caracterizan por expresar en su superficie altos niveles de las moléculas CD69 y CD103, por su gran capacidad efectora y porque su presencia en tumores ha sido correlacionada con mayor supervivencia y mejor pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón y ovario. La vacunación intradérmica es una estrategia altamente atractiva para el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el cáncer debido a la gran cantidad de células dendríticas que se encuentran en la dermis. Sin embargo, se desconoce si las vacunas administradas por esta vía generan linfocitos T_{RM} CD8. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue determinar si la inmunización intradérmica con vacunas de ADN genera linfocitos T_{RM} CD8 en la piel. Para esto se administraron vacunas de ADN convencionales (pVAX) y basadas en replicones alfavirales (DREP) codificantes de la proteína ovoalbúmina (OVA) en ratones C57BL/6. Ambas vacunas generaron altas

frecuencias de MPEC en la fase efectora, respuestas de linfocitos T_{CM} , T_{EM} y T_{RM} de la piel.

Los LT CD8 específicos fueron detectados mediante tinción con un multímero de MHC-I, el dextrámero H-2 Kb/SIINFEKL que reconoce los LT CD8 que poseen el TCR para el péptido inmunodominante de la proteína OVA, OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎. En el sitio vacunado se identificaron dos poblaciones de linfocitos T_{RM} CD8, una $CD103^+$ y otra $CD103^-$, mientras que en sitios distantes (no vacunados) se detectaron principalmente linfocitos T_{RM} CD8 $CD103^+$, indicando que estas células no solo se acumulan en el lugar de administración la vacuna si no que pueden colonizar toda la piel. Queda por determinar el rol de estas células en la inmunidad antitumoral y si es que sus propiedades efectoras difieren entre los fenotipos descritos.

ABSTRACT

DNA vaccination is an attractive strategy to efficiently generate CD8 T cell response able to attack tumors and generate memory, protecting against tumor recurrence. However, T cell memory elicited by DNA vaccines has been poorly described.

Based on the potential to generate memory responses, effector CD8 T cells can be defined as short-lived effector cells (SLEC) and memory precursor effector cells (MPEC). MPEC population originates effector memory (T_{EM}), central memory (T_{CM}) and a recently described subset of resident memory (T_{RM}) T cells that permanently resides in non-lymphoid tissues. CD8 T_{RM} are characterized by the expression of CD69 and CD103, high effector capacity and their presence in tumors predicts a better prognosis and survival in patients with lung and ovarian cancer.

Intradermal vaccination is a highly attractive strategy to deliver therapeutic vaccines against cancer, due to the large amount of dendritic cells found in the dermis. However, it is unknown if intradermally administered vaccines generate CD8 T_{RM} . The aim of this study was to determine whether intradermal immunization with DNA vaccines generates skin CD8 T_{RM} . To this end, female C57BL/6 mice were immunized twice with either conventional DNA (pVAX) or DNA-launched alphavirus replicon-based (DREP) vaccines encoding the model antigen ovalbumin (OVA). Both vaccines generated high levels of MPEC that produced high levels of CD8 T_{CM} , T_{EM} and skin- T_{RM} . Antigen-specific CD8 T cells were recognized by staining with the MHC I multimer H-2 Kb/SIINFEKL to recognize CD8 T cells expressing the TCR specific for the immunodominant peptide OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ of the OVA antigen. In vaccinated skin, both CD103+ and CD103- antigen-specific CD8 TRM populations were identified, whereas in

distant skin areas from vaccination, CD8 TRM CD103+ were mainly detected. These results indicate that CD8 TRM cells not only accumulate in the vaccinated site but they are able to colonize distant sites of the skin. It remains to determine the role of CD8 TRM cells in antitumor immunity and if their effector properties differ between the two phenotypes previously described.

INTRODUCCIÓN

Inmunología del cáncer e inmunoterapias

El cáncer es una enfermedad en la cual células anormales del cuerpo se dividen descontroladamente y se diseminan a otros tejidos (NCI 2012). El cáncer figura como una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial (Siegel y col., 2014). Dentro de las formas más agresivas está el cáncer de piel llamado melanoma el que corresponde a un tumor maligno que se origina en los melanocitos, células de la piel que producen melanina la cual contribuye a protegernos de los efectos dañinos del sol (Hussein, 2008). La eficacia del tratamiento contra el melanoma depende de la detección temprana y del procedimiento quirúrgico para extirparlo. Cuando alcanza un estado avanzado se vuelve resistente a los tratamientos convencionales como quimioterapia y radioterapia (Pawlik & Sondak, 2003).

Las tasas de supervivencia de diez años para pacientes con melanoma metastásico son inferiores al 10% (Bhatia y col., 2009). Por lo tanto se hace necesario e indispensable el desarrollo de nuevas terapias contra el melanoma.

La inmunoterapia contra el cáncer busca promover y activar eficazmente la capacidad del sistema inmune para eliminar células tumorales que han evadido la vigilancia inmunológica. Existen dos tipos, la inmunoterapia pasiva y la inmunoterapia activa. La inmunoterapia pasiva consiste en administrar al paciente de forma exógena células o moléculas efectoras manipuladas *in vitro* (Rosenberg & Dudley, 2009).

Los linfocitos T CD8 (LT CD8) citotóxicos efectoros son el componente principal de la respuesta inmune antitumoral porque son capaces de reconocer y eliminar específicamente las células transformadas (Nakano y col., 2001).

La inmunoterapia activa o vacunas contra el cáncer potencia *in vivo* la generación de LT CD8 citotóxicos específicos contra antígenos que son expresados diferencialmente en tumores primarios y diseminados. Las vacunas contra el cáncer son una alternativa costo efectiva que generan una respuesta inmunológica protectora de larga duración, lo cual representa el mayor objetivo de la inmunoterapia contra el cáncer para controlar la recurrencia de la enfermedad. Un ejemplo de este tipo de terapia son las vacunas de ADN (Schuster y col., 2006; Mellman y col., 2011; Tacke & Figdor, 2011; Yang y col., 2014).

Vacunas de ADN

La vacunación con ADN permite generar una respuesta inmune mediada por LT CD8 citotóxicos, que ha mostrado ser eficiente en diversos modelos preclínicos de cáncer. Las vacunas de ADN son plásmidos que contienen el gen de un antígeno, bajo el control de un promotor fuerte, usualmente el del citomegalovirus (CMV) (Kutzler & Weiner, 2008; Stevenson y col., 2010). Este tipo de vacuna es administrada por vía intradérmica, intramuscular o subcutánea mediante diferentes sistemas de entrega. Una vez dentro de las células del tejido vacunado, ocurre la expresión *in vivo* del antígeno codificado lo que genera una respuesta inmune de LT CD8 citotóxicos contra dicho antígeno (Kutzler & Weiner, 2008; Stevenson y col., 2010).

Las vacunas de ADN poseen varias ventajas comparadas a otras terapias, entre ellas se destacan los bajos costos de producción y purificación a gran escala, son fáciles de generar, altamente estables y son seguras. Además las vacunas de ADN actúan como adyuvantes en sí mismas ya que poseen múltiples y potentes señales capaces de activar receptores de la inmunidad innata (Herrada y col., 2012; Khan, 2013).

Actualmente existen tres vacunas de ADN aprobadas por la FDA para uso veterinario, por ejemplo para melanoma canino, y existen diversos estudios clínicos evaluando la eficacia de las vacunas de ADN contra diferentes enfermedades e infecciones humanas (Stevenson y col., 2010; Ferraro y col., 2011).

En estudios clínicos en humanos, las vacunas de ADN han demostrado generar respuestas inmunes pero con limitada eficacia clínica.

Un obstáculo para el éxito de las vacunas de ADN ha sido su baja eficiencia de transfección *in vivo*. Con el fin de mejorar la eficiencia de transfección se han desarrollado sistemas que mejoran la entrega de los vectores al interior de las células del sitio de vacunación. La electroporación *in vivo* es una técnica eficiente, simple y aplicable en clínica para la administración de las vacunas de ADN porque mejora el ingreso del plásmido a las células mediante la aplicación de pulsos eléctricos breves y controlados que inducen una permeabilización transitoria y reversible de la membrana celular (Sardesai & Weiner, 2011). Esta técnica aumenta la expresión del antígeno, la infiltración de células del sistema inmune en el sitio de inmunización y promueve la producción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias que contribuyen a la inducción de una respuesta inmune eficiente (Babiuk & Baca-Estrada, 2004; Ahlen y col., 2007; Luxembourg y col., 2007).

Otro obstáculo para el éxito de las vacunas de ADN es que la mayoría de los estudios preclínicos se han desarrollado en modelos animales pequeños, requiriéndose altas dosis que son difícilmente escalables a humanos. Las dosis típicas utilizadas en ratones van de los 10 a los 100 μg , lo que escalado a humanos corresponde a 80-200 mg de ADN por inyección mientras que los estudios clínicos usan dosis menores a 1-2 mg (Luxembourg y col., 2007; Rice y col., 2008; Herrada y col., 2012).

Por lo tanto, esto ha impulsado a desarrollar estrategias que mejoren la potencia de las vacunas de ADN, que se requieran en bajas dosis y que sean escalables para su uso en humanos (Ferraro y col., 2011).

En este contexto, una de las estrategias que se ha desarrollado son las vacunas de ADN basadas en sistemas de replicones alfavirales (DREP). Estas vacunas funcionan a dosis más bajas que las vacunas de ADN convencionales (10-100 veces más bajas) y generan una respuesta de LT CD8 citotóxicos más potente (Knudsen y col., 2012). Los DREP son plásmidos que codifican para un replicón de alfavirus bajo el control del promotor CMV. Una vez que el vector DREP se encuentra dentro de la célula, el replicón es transcrito en un ARN mensajero (mARN). Parte de la secuencia es traducida a una replicasa alfaviral, la cual reconoce un promotor subgenómico en dicho mARN, que controla la expresión del antígeno de interés (Quetglas y col., 2010; Lundstrom, 2014). La replicasa amplifica cerca de 100 veces la expresión del antígeno, comparado con las vacunas de ADN convencionales (Driver y col., 1995; Vander y col., 2012).

El potente efecto inmunoestimulador de estas vacunas es atribuido a los altos niveles de expresión del antígeno y a la gran cantidad de intermediarios virales de ARN doble hebra que se unen a receptores de la inmunidad innata como TLR3, RLR y PKR, desencadenando la producción de interferones de tipo I (IFN I) y apoptosis, generando una respuesta inmune adaptativa específica (Diebold y col., 2009; Naslund y col., 2011; Knudsen y col., 2012).

Vacunas de ADN y memoria inmunológica

El objetivo de las vacunas de ADN antitumorales es generar una respuesta eficiente de LT CD8 que elimine las células tumorales y que permita la generación de memoria inmunológica, protegiendo frente a la reaparición de nuevos tumores. Sin embargo, esto no ha sido completamente dilucidado y se requiere de estudios más

acabados de la respuesta de memoria que generan estas vacunas (Castellino y col., 2009).

El repertorio de LT CD8 vírgenes comprende miles de células, cada una expresando un receptor de células T (TCR) que le permite reconocer de forma específica péptidos de 8-10 aminoácidos presentados en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (Blattman y col., 2002). Para que los LT CD8 vírgenes adquieran capacidad efectora deben ser activados por células dendríticas (DC) que son células presentadoras de antígenos profesionales. Frente a un patógeno o infección, las DC poseen la capacidad de captar antígenos provenientes del patógeno o de la célula infectada, procesarlos en péptidos pequeños y cargarlos en moléculas de MHC de tipo I y II. Posteriormente las DC migran a los nódulos linfáticos donde le presentan antígenos a los LT CD4 y CD8 vírgenes (Steinman, 2012). La presentación de antígenos, junto con señales coestimuladoras y la secreción de citoquinas por parte de la DC inducen la activación y proliferación de los LT, los que adquieren un fenotipo efector. Una vez que los LT han sido activados, adquieren la capacidad de dejar el órgano linfoide y viajar al sitio de la infección donde destruyen a las células infectadas y ayudan a controlar la infección (Banchereau y col., 2000). Los LT CD4 efectores son activados por células presentadoras de antígeno que presentan péptidos del patógeno unidos a moléculas del MHC de clase II, produciendo citoquinas que modulan la función de los LT CD8 (Luckheeram y col., 2012). Los LT CD8 citotóxicos reconocen a las células infectadas que expresan péptidos del patógeno unidos a MHC de clase I, destruyéndolas a través de la expresión de moléculas citotóxicas como Fas ligando (FasL), la liberación de vesículas con moléculas citotóxicas, tales como perforina (PFN), granzimas, interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Zhang & Bevan, 2011).

Luego de 1-2 semanas posteriores a la infección se produce el punto más alto de la respuesta efectora de LT CD8 citotóxicos, la mayoría de los cuales muere por apoptosis en los siguientes días durante la fase de contracción de la respuesta (Harty & Badovinac, 2008). Los LT CD8 que sobreviven (~5-10 % de los linfocitos detectados en el máximo de la respuesta efectora) originan a los LT CD8 de memoria. Estas células se caracterizan por persistir en el tiempo y poseer la capacidad para responder rápida y robustamente ante una segunda exposición al antígeno, proporcionando una protección a largo plazo (Kaech y col., 2002; Williams & Bevan, 2007).

Basados en la capacidad de generar memoria, los LT CD8 efectores se pueden clasificar en: LT efectores de vida corta (SLEC, del inglés short-lived effector cells), que confieren protección inmediata, pero contribuyen poco al repertorio de LT de memoria, muriendo durante la etapa de contracción; y LT efectores precursores de memoria (MPEC, del inglés memory precursor effector cells) que tienen la capacidad de responder a señales de supervivencia y convertirse en LT CD8 de memoria (Amsen y col., 2013). Los SLEC y MPEC se diferencian en base a la expresión de la cadena α del receptor de IL-7, CD127, y la expresión de KLRG1 (del inglés killer lectin-like receptor). La expresión de KLRG1 determina que los LT CD8 efectores posean un fenotipo SLEC (Joshi y col., 2007) mientras que la expresión CD127 determina que los LT CD8 efectores se diferencien en LT de memoria y que posean mayor expresión de moléculas antiapoptóticas como Bcl2 (Kaech, Tan et al. 2003). Por lo tanto, los SLEC son CD127⁻KLRG1⁺, mientras que los MPEC son CD127⁺KLRG1⁻ (Kurtulus y col., 2012). Existe un tercer subtipo menos estudiado de LT CD8 efectores, con un fenotipo CD127⁻KLRG1⁻, llamados LT CD8 efectores de fase temprana (EEC, del inglés early effector cells). Se ha visto que estos linfocitos predominan tempranamente en una infección y que tienen la

capacidad de dar origen a SLEC, MPEC y a ellos mismos (Obar & Lefrancois, 2010). Por último, se encuentra una cuarta población descrita, llamada LT CD8 efectores doble positivos (DPEC, del inglés double-positive effector cells) que se define por ser CD127⁺KLRG1⁺. Aunque no se sabe mucho acerca de esta población, pueden ser encontrados cuando se produce la mayor respuesta efectora de LT CD8 citotóxicos luego de una infección (Plumlee y col., 2013).

Los LT de memoria se han definido en base a la expresión de receptores de superficie, localización, propiedades de circulación así como sus funciones efectoras. Los LT de memoria efectoras (T_{EM}) y LT de memoria central (T_{CM}) han sido considerados clásicamente como las dos principales poblaciones de memoria (Chang y col., 2014).

Los T_{EM} recirculan entre tejidos no linfoides y los órganos linfoides secundarios a través de la sangre. Los T_{EM} tienen baja capacidad proliferativa, pero pueden proveer protección inmediata contra el antígeno a través de la producción de citoquinas efectoras tales como IFN- γ y la liberación de vesículas citotóxicas. Los T_{CM} tienden a localizarse en los órganos linfoides secundarios. Los T_{CM} tienen funciones efectoras limitadas pero son capaces de proliferar robustamente y diferenciarse en T_{EM} en respuesta a una estimulación antigénica. También pueden producir interleuquina 2 (IL-2) (Mueller y col., 2013; Chang y col., 2014).

Los T_{CM} y T_{EM} pueden ser diferenciados en base a la expresión de diversas moléculas de superficie, tales como CD44 y CD62L. Los T_{CM} se definen como CD44⁺CD62L⁺ y los T_{EM} como CD44⁺CD62L⁻. CD44 es una glicoproteína que se incrementa luego de la activación de los LT vírgenes durante la respuesta contra el patógeno. Una vez que la infección es controlada, sus niveles de expresión permanecen elevados en la superficie de los LT de memoria por lo que es utilizado

como marcador de exposición previa al antígeno (Baaten y col., 2010; Baaten y col., 2012). CD62L guía la migración de los LT para entrar a los nódulos linfáticos y también participa en la adhesión de los LT al endotelio vascular en los sitios de inflamación. Este receptor también se encuentra presente en los T_{CM} y los LT vírgenes permitiéndoles ingresar a los nódulos linfáticos en búsqueda de células presentadoras que le presenten su antígeno (Kaech y col., 2002; Yang y col., 2011).

T_{RM} : LT de memoria residentes

Recientemente se ha descrito que existe un nuevo tipo de LT de memoria que reside permanentemente en los tejidos no linfoides, los que se denominan LT de memoria residentes (T_{RM}). Los T_{RM} se caracterizan por su persistencia y confinación en un tejido particular fuera del cual no recirculan (Mackay y col., 2012; Schenkel & Masopust, 2014). Luego de una infección en un tejido no linfoide, como la piel, el tracto reproductivo o el tracto gastrointestinal, los LT CD8 presentes en el nódulo linfático drenante son activados y adquieren la expresión de distintos receptores que les permiten migrar al sitio donde ocurrió la infección para eliminar al patógeno (Park & Kupper, 2015). Por ejemplo, en los nódulos linfáticos de la piel, se induce la expresión de receptores en los LT CD8 citotóxicos que facilitan la entrada a la piel tales como ligandos de e-selectina y p-selectina (Jiang y col., 2012) así como receptores de quimioquinas (CCR8 y CCR10) que les permiten infiltrar en este tejido (McCully y col., 2012). Luego de que la infección ha sido eliminada, una población de los LT CD8 precursores de memoria se establece en los órganos no linfoides y da lugar a los T_{RM} . En la piel se ha visto que la formación y mantención de los T_{RM} depende de diversas señales como IL-15, TGF- β , TNF- α e IL-33 (Casey y col., 2012).

Los T_{RM} actúan como primera línea de defensa frente a un patógeno con el que se ha tenido previo encuentro y están preparados constitutivamente para una rápida función efectora (Jiang y col., 2012; Schenkel & Masopust, 2014). Se ha demostrado que esta población de T_{RM} es capaz de proteger potentemente contra infecciones independientemente de los LT CD8 de memoria circulantes (Gebhardt y col., 2009; Jiang y col., 2012; Mackay y col., 2015).

Los T_{RM} CD8 tienen un perfil transcripcional que les distingue de los T_{EM} y T_{CM} , y que contribuye a su mantención en los tejidos no linfoides (Mackay y col., 2013). Los T_{RM} CD8 expresan CD103, CD69 y bajos niveles de S1P1R (Mackay y col., 2013). CD103 es una integrina que se expresa en los T_{RM} CD8 de piel, pulmones, tracto gastrointestinal, cerebro, tracto genital entre otros (Shin & Iwasaki, 2013). Aunque no se expresa en todos los T_{RM} descritos, se ha visto que CD103 tiene un rol importante en la retención y diferenciación de los T_{RM} CD8 en distintos tejidos (Wakim y col., 2010). Por ejemplo, en modelos de infección viral en ratones se ha visto que en la piel, CD103 es necesario para la formación y supervivencia de los T_{RM} CD8 (Mackay y col., 2013). Además se ha determinado que los T_{RM} CD8 CD103⁺ tienen una mayor capacidad de producción de citoquinas efectoras que los T_{RM} CD8 CD103⁻ en modelos animales y humanos (Piet y col., 2011; Park & Kupper, 2015). CD69 es un marcador que expresan los T_{RM} y su expresión está involucrada en la retención de los T_{RM} en tejidos no linfoides ya que interfiere con la expresión y función del receptor S1P1R el cual es crítico para la recirculación de los LT (Mackay y col., 2015). S1P1R detecta gradientes de la molécula S1P1 que se encuentra en altos niveles en la sangre y que sirve para guiar a los linfocitos fuera de los tejidos (Cyster & Schwab, 2012). CD69 hace que disminuyan los niveles de S1P1R, haciendo que los T_{RM} sean incapaces de recircular y responder a las gradientes de S1P (Mackay y col., 2015).

Los T_{RM} CD8 producen niveles elevados de citoquinas efectoras tales como IFN- γ , TNF- α y granzima B (Shin & Iwasaki, 2013; Ariotti y col., 2014).

En infecciones virales se ha determinado que los T_{RM} CD8 estimulan rápidamente la respuesta inmune innata y adaptativa, proveyendo protección contra el agente infeccioso y a la vez contra patógenos no relacionados (Liu y col., 2010; Schenkel y col., 2013). Algunos estudios que han analizado la presencia de LT CD8 en tumores sólidos humanos han proporcionado pruebas de que los T_{RM} CD8 podrían mediar la inmunidad antitumoral. La infiltración de LT CD8 con un fenotipo T_{RM} es indicativo de un pronóstico más favorable en pacientes con cáncer de ovario y pulmón (Webb y col., 2014; Djenidi y col., 2015). Todas estas observaciones han llevado a un creciente interés por desarrollar vacunas que generen T_{RM} CD8 como potencial terapia contra distintas patologías.

La vacunación intradérmica ha sido una estrategia extensamente utilizada para desarrollar vacunas terapéuticas contra el cáncer debido a que la dermis se encuentra densamente poblada por distintos subtipos de DC (Romani y col., 2012). Sin embargo se desconoce si las vacunas de ADN administradas por esta vía generan T_{RM} CD8. Por lo tanto el objetivo de esta tesis fue determinar si la inmunización intradérmica con vacunas de ADN genera T_{RM} CD8 en la piel.

Hipótesis

Las vacunas de ADN entregadas vía intradérmica inducen la generación de LT CD8 específicos de memoria residentes de la piel.

Objetivo General

Estudiar si las vacunas de ADN entregadas vía intradérmica inducen la generación de LT CD8 específicos de memoria residentes de la piel.

Objetivos específicos

1. Comprobar la capacidad de las vacunas de ADN convencionales y basadas en replicones de alfavirus para generar respuestas potentes de LT CD8 citotóxicos efectoras y protección frente a un desafío con células tumorales de melanoma.
2. Evaluar la generación de LT CD8 efectores y precursores de memoria en animales inmunizados con vacunas de ADN convencionales y basadas en replicones de alfavirus vía intradérmica.
3. Evaluar la generación de LT CD8 específicos de memoria central (T_{CM}), efectora (T_{EM}) y residente (T_{RM}) de la piel en animales inmunizados con vacunas de ADN convencionales y basadas en replicones de alfavirus vía intradérmica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Bacterias

Bacterias: Las bacterias *Escherichia coli* cepa *NovaBlue*, fueron facilitadas por la Dra. Evelyn Silva, FCV (Santiago, Chile).

Plásmidos

Los vectores utilizados en esta tesis fueron: pVAX-OVA (pOVA), DREP-OVA (D-OVA), gentileza de Centro del Cáncer del Karolinska Institutet (SK, Suecia) y un vector vacío (DREP) generado en el laboratorio.

Medios de cultivo bacteriano y otros reactivos

Medio Luria-Bertani (LB): 10 g/L de bacto triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl.

Agar LB: 10 g/L de bacto triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl, agar 15 g/L.

Medio SOC: 2% de bacto triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM de glucosa.

Kanamicina (Sigma-Aldrich CO. St. Louis, MO, USA).

Medios de cultivo celular y otros reactivos

Se utilizó medio RPMI 1640 con 10% suero fetal bovino (SFB), 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 100 I.U/ml de penicilina, 100

$\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, 1 mM de piruvato de sodio, todos los reactivos son Gibco life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

Soluciones, reactivos comerciales y kits

Tampón fosfato salino (PBS) (1X): KH_2PO_4 1,06 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,97 mM, NaCl 155,17 mM, pH 7,4 (Gibco, Carlsbad, CA, USA).

Tampón de lisis de glóbulos rojos: RBC Lysis Buffer (10X): pH 7,1 – 7,4 (BioLegend, San Diego, CA, USA).

Sevoflurano (Baxter, IL, USA).

NucleoBond Xtra Midi EF (midiprep) y NucleoBond Xtra Maxi EF (maxiprep) (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Heparina (Laboratorio Sanderson, Santiago, Chile).

Fixation/Permeabilization (BD Biosciences, CA, USA).

Perm/Wash Buffer (BD Biosciences, CA, USA).

GolgiPlug (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Soluciones de lavado

PBS 1X-SFB 2%.

Anticuerpos de Citometría de flujo

Los anticuerpos utilizados fueron obtenidos de Biolegend (San Diego, CA, USA) y corresponden a: CD8-PeCy7 (Clon 53-6.7), CD3-PerCP (Clon 17 A2), IFN- γ -PE (Clon XMG1.2), TNF- α -APC (Clon MP6-XT22), Zombie Aqua-BV510, CD3-APC/Cy7 (Clon 145-2C11), CD8-PECy7 (Clon 53-6.7), KLRG1-BV421 (Clon 2F1/KLRG1), CD127-AF488 (Clon A7R34), CD44-PerCP (IM7), CD62L-PE (MEL-14), CD3-AF488 (Clon 17 A2), CD69-APC/Cy7 (Clon H1.2F3), CD103-BV421 (Clon 2E7).

Péptido

Para la reestimulación *in vitro* de los linfocitos, se utilizó el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ SIINFEKL (GenScript, Piscataway, NJ, USA).

Dextrámero

Se utilizó el multímero de MHC I: Dextrámero H-2 Kb/SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), APC (Immudex, Copenhagen, Dinamarca).

Equipamiento

Incubador de CO₂ (Thermo Scientific serie 8000 WJ modelo 3429TF); microcentrifuga para eppendorf (Brinkmann modelo 5415D); centrifuga refrigerada (Thermo Scientific MegaFuge 40R); lector multimodal para microplacas (BIO-TEK modelo Synergy HT); congelador -80 (Ultra low temperature freezer, Sanyo); citómetro de flujo (BD Biosciences modelo FACSCanto II); electroporador Derma Vax DNA Vaccine Skin Delivery System (Cyto Pulse Sciences); electrodo con agujas paralelas de 2 mm (Cyto Pulse Sciences).

Métodos

Electroporación de bacterias

Se tomaron 1,5 ml de un cultivo de bacterias *Escherichia coli* cepa NovaBlue crecidas durante la noche y se centrifugaron a 5000 RCF por 5 minutos a 4°C. En campana de flujo y en hielo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet bacteriano en 1 ml de H₂O bidestilada fría, este paso se repitió cuatro veces dejando las bacterias peleteadas. Se prendió el electroporador y se setearon las condiciones (25 Uf, 200 Ω y 2,5 kV). Las bacterias se resuspendieron en 100 µL de H₂O bidestilada y se añadió 10 ng de ADN plasmidial. Luego se colocaron en la cubeta de electroporación (previamente enfriada a -20°C) y se oprimieron los botones del electroporador hasta que generó el pulso. Inmediatamente se añadió 1 ml de medio de cultivo LB, se homogenizó y se dejó creciendo en el agitador por 1 h a 37°C. Finalmente las bacterias se centrifugaron 2 minutos a 5000 RCF a

temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en el volumen remanente y se plaquearon en una placa de LB-Agar con kanamicina y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Extracción y purificación de ADN plasmidial

Las bacterias *Escherichia coli* cepa *NovaBlue* transformadas con los plasmidios se crecieron en medio LB suplementado con kanamicina 50 µg/mL. El volumen empleado para cada inóculo fue de 300 ml o 600 ml dependiendo si la preparación correspondía a midiprep o maxiprep, respectivamente. Los sistemas de extracción y purificación empleados para las diferentes preparaciones corresponden a: NucleoBond Xtra Midi EF (midiprep) y NucleoBond Xtra Maxi EF (maxiprep). La extracción y purificación se realizó según las especificaciones del fabricante (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Finalizada esta etapa se determinó la concentración del ADN plasmidial mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (Synergy HT). El ADN plasmidial obtenido es libre de endotoxinas.

Animales

Los ratones hembras C57BL/6 fueron mantenidos a temperatura controlada y con un régimen alternado de luz y oscuridad de 12 h. Los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*. Los procedimientos y normas generales de mantención están descritos en el protocolo de manejo y supervisión animal del proyecto FONDECYT 11110525 aprobado por los Comités de Bioética de la Fundación Ciencia & Vida y de FONDECYT.

Inmunización mediante electroporación intradérmica *in vivo*

Ratones hembras C57BL/6 de 6 – 8 semanas de edad se anestesiaron y se mantuvieron durante todo el procedimiento con sevoflurano 3 %. Los ratones se inyectaron intradérmicamente con una solución de PBS 1X que contenía los ADN plasmidiales utilizados. La inyección se realizó en dos sitios diferentes (20 µL en

cada sitio) cercanos a la base de la cola. Luego de esto se colocó un electrodo con dos hileras de agujas paralelas de 2 mm, dejando el sitio de inyección entre estas dos hileras. Se aplicaron 2 pulsos de 125 V/cm durante 0,05 ms seguidos de 8 pulsos de 275 V/cm durante 10 ms usando un electroporador Dema Vax DNA Vaccine Skin Delivery System.

Ensayos de desafío tumoral

En el experimento terapéutico los animales fueron desafiados con $2,5 \times 10^5$ células de la línea murina de melanoma B16F10 que expresa el antígeno OVA y dos días después fueron vacunados mediante electroporación intradérmica con 2 µg de pOVA, D-OVA o el vector vacío. Posteriormente, los ratones fueron sangrados doce días después de la vacunación con el fin de obtener linfocitos específicos contra el antígeno modelo OVA. Durante 18 días se siguió el crecimiento tumoral, realizando tres mediciones por semana. Al final de los 18 días los animales fueron sacrificados. El cálculo del volumen tumoral, se hizo según la siguiente fórmula: $Volumen (mm^3) = \frac{W \times H \times L}{2}$. Donde W corresponde al ancho del tumor, H corresponde al alto y L corresponde al largo.

Procesamiento de la sangre para análisis de LT CD8

Los ratones fueron sangrados mediante un corte en la cola usando un bisturí estéril y se recolectaron 200-250 µL finales de sangre en tubos de 1,5 ml conteniendo 70 µL de heparina a una concentración 500 U/ml. La sangre se transfirió a tubos de 15 ml y se trató con 3 ml de RBC Lysis Buffer 1X por 10 minutos a temperatura ambiente agitando de vez en cuando, luego se agregaron 10 ml de PBS 1X. A continuación, las muestras se centrifugaron a 400 RCF por 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL de RPMI 1640 con 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 100 I.U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 1 mM de piruvato de sodio. Las

células se centrifugaron a 400 RCF por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se resuspendieron en 250 μ L de medio RPMI 1640 suplementado. Luego se utilizaron 100 μ L de esta suspensión celular para la tinción con anticuerpos de superficie, intracelulares o el dextrámero H-2 Kb/SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), APC. La tinción se realizó en placas de 96 pocillos con fondo redondo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Reestimulación *in vitro* de linfocitos provenientes de la sangre

Luego de procesar los linfocitos provenientes de la sangre, se cultivaron 100 μ L de la suspensión celular obtenida en placas de 96 pocillos y se adicionó 100 μ L de medio RPMI 1640 completo, suplementado con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ a una concentración final de 1 μ g/ml por pocillo. Luego la placa con linfocitos se incubó a 37° C y 5% de CO₂ por 2 h. Posteriormente, cada pocillo de células se trató por 6 h con 50 μ L de medio RPMI 1640 completo suplementado con 0,25 μ L de GolgiPlug con el fin de inducir el acumulamiento intracelular de citoquinas. Pasado este periodo, las células fueron centrifugadas a 400 RCF por 5 minutos y luego resuspendidas en 100 μ L de PBS-SFB 2%, para llevar a cabo posteriormente las tinciones de superficie e intracelular.

Tinción de superficie e intracelular de células y análisis por citometría de flujo

Todas las centrifugaciones de este protocolo se realizaron 400 RCF y a 4°C durante 5 minutos.

Las células se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se procedió con la tinción de superficie, agregando 25 μ L de PBS-SFB 2% por pocillo suplementado con los diferentes anticuerpos de superficie en su dilución apropiada durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente las células se lavaron con 100 μ L de PBS-SFB 2% y se centrifugaron, dos veces. La tinción intracelular se realizó posterior a la tinción de superficie, para esto, la células fueron permeabilizadas con 100 μ L de la solución Fixation/Permeabilization por pocillo durante 20 minutos a 4°C en

oscuridad. Luego se centrifugaron las células y se lavaron con 100 μ L de la solución Perm/Wash Buffer y nuevamente fueron centrifugadas. Las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C en oscuridad con 25 μ L de una solución de Perm/Wash Buffer conteniendo los anticuerpos intracelulares. Finalmente las células se centrifugaron y se lavaron con 100 μ L de Perm/Wash Buffer y se resuspendieron en 100 μ L de PBS-SFB 2% para ser analizadas mediante citometría de flujo. El volumen de anticuerpo que se utilizó por cada 25 μ L de PBS-SFB 2% para los anticuerpos de superficie fue: Zombie Aqua-BV 510 0,05 μ L, CD3-PerCP 0,15 μ L, CD8 PE-Cy7 0,15 μ L y para los anticuerpos intracelulares fue: IFN- γ -PE 0,1 μ L, TNF- α -APC 0,1 μ L.

Ensayo para evaluar poblaciones efectoras en sangre

Grupos de 4 animales fueron inmunizados dos veces con un intervalo de dos semanas con pOVA (a una dosis de 2 y 20 μ g), D-OVA (a una dosis de 2 μ g) o el vector vacío (a una dosis de 2 μ g). Doce días después de la última inmunización los ratones fueron sangrados para evaluar la frecuencia de precursores de LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄. El procesamiento de linfocitos de la sangre se describió previamente. Los LT CD8 que poseen el TCR específico para el péptido inmunodominante de la proteína OVA fueron reconocidos en la sangre utilizando el Dextrámero H-2 Kb/SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), APC, este protocolo se describe posteriormente.

Ensayo para evaluar poblaciones de memoria en bazo

Grupos de 5 animales fueron inmunizados dos veces con un intervalo de dos semanas con pOVA (a una dosis de 2 y 20 μ g), D-OVA (a una dosis de 2 μ g) o el vector vacío (a una dosis de 2 μ g). Seis semanas después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados para evaluar la frecuencia de poblaciones de LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄. Los LT CD8 que poseen el TCR específico para el péptido inmunodominante de la proteína OVA

fueron reconocidos en la sangre utilizando el Dextrámero H-2 Kb/SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), APC este protocolo se describe posteriormente.

Procesamiento del bazo para análisis de LT CD8

Todas las centrifugaciones de este protocolo se hicieron a 400 RCF, 5 minutos a temperatura ambiente.

Se colectaron los bazos de los animales y se disgregó el tejido con el émbolo de una jeringa de 5 mL en una placa de 60 mm que contenía 5 ml de medio RPMI.

La suspensión celular se colectó en un tubo falcon de 15 ml y se centrifugó. Se resuspendió el pellet obtenido en 3 ml de RBC Lysis Buffer 1X y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente agitando de vez en cuando, luego se agregaron 10 mL de PBS 1X. A continuación, las muestras se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 5 ml de RPMI 1640 con 10% SFB, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 100 I.U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 1 mM de piruvato de sodio. Luego las células se centrifugaron y se resuspendieron en 10 ml de RPMI 1640 suplementado. La suspensión celular se pasó a través de un cell strainer y luego se utilizaron 100 µL de esta suspensión para la tinción con anticuerpos de superficie y con el dextrámero H-2 Kb/SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), APC. La tinción se realizó en placa de 96 pocillos.

Ensayo para evaluar linfocitos de memoria en piel

Grupos de 4 animales fueron inmunizados dos veces con un intervalo de dos semanas con pOVA (a una dosis de 2 y 20 µg), D-OVA (a una dosis de 2 µg) o el vector vacío (a una dosis de 2 µg). Seis semanas después de la última inmunización, los ratones fueron sacrificados para evaluar la frecuencia y fenotipo de los LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ en piel. Los LT CD8 que poseen el TCR específico para el péptido inmunodominante de la proteína OVA

fueron reconocidos en la sangre utilizando el dextrámero H-2 Kb/SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), APC.

Procesamiento de la piel para análisis de LT CD8

Se colectó la piel de los animales, del sitio vacunado (zona dorsal cercana a la base de la cola), así como la piel de un sitio distante al vacunado (zona dorsal superior cercana a la nuca). La piel fue cortada en pequeños fragmentos (2 mm x 2 mm aproximadamente) y digerida con 5 mg/ml de colagenasa IV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y 5 µg/ml de DNAsa (AppliChem, St. Louis, MO, USA) en 5 medio RPMI 1640 por 90 minutos a 37°C en agitador. Posteriormente se disgregó mecánicamente la piel con una jeringa de 5 ml y la suspensión celular se pasó a través de un cell strainer. Luego las células fueron centrifugadas 400 RCF, 5 minutos y resuspendidas en 200 µL de medio RPMI 1640.

Detección de LT CD8 OVA₂₅₇₋₂₆₄ específicos con el dextrámero H-2 Kb/SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), APC

Este protocolo se aplicó para detectar LT CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ en sangre, piel y bazo y la tinción se realizó en placa de 96 pocillos. Todas las centrifugaciones se hicieron a 400 RCF, 5 minutos a 4°C.

Las células fueron centrifugadas, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 100 µL de PBS-SFB al 2%. Luego se volvieron a centrifugar, se eliminó el sobrenadante y se agregó el dextrámero a una dilución 1:60 por pocillo. Se tiñeron las células en un volumen de 30 µL de PBS-SFB al 2%. Las células fueron incubadas a temperatura ambiente, 10 minutos en oscuridad. Posteriormente se agregaron los anticuerpos de superficie diluidos en 20 uL de PBS-SFB al 2% por pocillo para tener un volumen final de 50 uL de PBS-SFB al 2%. Luego las células se lavaron con 100 µL de PBS-SFB al 2% y se centrifugaron, dos veces. Finalmente las células fueron

resuspendidas en 100 uL de PBS-SFB al 2% por pocillo para ser analizadas mediante citometría de flujo.

El volumen de anticuerpos de superficie utilizado en 50 uL de PBS-SFB al 2% para sangre fue: CD3- APC/Cy7 0,2 uL, CD8- PECy7 0,2 uL, KLRG1-BV421 0,3 uL, CD127-AF488 0,3 uL.

El volumen de anticuerpos de superficie utilizado en 50 uL de PBS-SFB al 2% para bazo fue: CD3- APC/Cy7 0,2 uL, CD8- PECy7 0,2 uL, CD44- PerCP 0,3 uL, CD62L-PE 0,3 uL.

El volumen de anticuerpos de superficie utilizado en 50 uL de PBS-SFB al 2% para piel fue: CD3-AF488 0,3 uL, CD8- PECy7 0,2 uL, CD69-APC/Cy7 0,3 uL, CD103-BV421 0,3 uL, CD44-PerCP 0,3 uL, CD62L-PE 0,3 uL.

En los tres casos anteriores se utilizó como marcador de viabilidad: Zombie Aqua-BV 510 0,1 µL.

Citometría de flujo

Las mediciones de citometría de flujo se realizaron en un equipo BD FACSCanto II, utilizando el FlowJo versión X.0.7 (Tree Star, Inc. Ashland, OR, USA).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Graphpad Prism versión 6 (Graphpad Software Inc.). Los datos fueron comparados mediante las pruebas estadísticas: Test U de Mann Whitney. Se consideraron significativos aquellos valores de p menores que 0,05 (* $p < 0,05$).

RESULTADOS

Estudio de la capacidad de las vacunas de ADN convencionales y DREP para generar respuestas potentes de LT CD8 citotóxicos efectoras y protección frente a un desafío con células tumorales de melanoma

Dada la importancia de desarrollar nuevas terapias contra el cáncer es que se estudió la generación de LT CD8 citotóxicos específicos y la protección frente a un desafío con células tumorales de melanoma en animales inmunizados con vacunas de ADN convencionales y DREP.

Ratones hembras C57BL/6 de 6-8 semanas fueron inoculadas de manera subcutánea con células tumorales de melanoma B16F10 que expresan la proteína ovoalbúmina (OVA). Dos días después tres grupos de animales fueron vacunados mediante electroporación intradérmica de ADN con los plásmidos pVAX-OVA (pOVA), DREP-OVA (D-OVA) o un vector vacío como control. Dado que los vectores DREP funcionan a dosis más bajas que los vectores convencionales se administraron 2 ug de cada vector a los animales para comparar la protección ofrecida por cada vacuna.

Doce días después de la vacunación, se analizó la respuesta de LT CD8 citotóxicos en la sangre de los animales mediante reestimulación *in vitro* con el péptido inmunodominante de la proteína OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) y posterior tinción intracelular de IFN- γ y TNF- α y análisis por citometría de flujo. Se cuantificó el porcentaje de LT CD8 citotóxicos específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ productores de IFN- γ y TNF- α .

Las figuras 1 A y 1B muestran el resultado de la reestimulación *in vitro* de los LT CD8 proveniente de dos experimentos independientes. Se observa que el grupo de ratones inmunizados con D-OVA es el único que presenta niveles detectables de LT CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄, productores de IFN- γ y TNF- α . El porcentaje de linfocitos generados en este grupo (0,43%) es estadísticamente significativo al comparar las muestras estimuladas con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ respecto de las no estimuladas que fueron utilizadas como un control ($P < 0,05$; datos no mostrados, analizados mediante test U de Mann Whitney). No se observa LT CD8 citotóxicos específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ en el caso del grupo inmunizado con pOVA.

Para evaluar la protección frente a un desafío con células tumorales de melanoma, en los animales vacunados, se realizó el seguimiento del crecimiento tumoral durante 18 días, a través de la medición del ancho, largo y alto de los tumores para posteriormente calcular y graficar el volumen tumoral. En la figura 1 C se muestra el crecimiento tumoral de los diferentes grupos desde el día 0 al 18. El grupo vacunado con el plásmido control presenta el mayor crecimiento tumoral a lo largo del tiempo y el menor crecimiento tumoral lo presenta el grupo vacunado con D-OVA. En la figura 1 D se muestran los tamaños tumorales de los diferentes grupos al día 18 cuando fueron sacrificados los animales. El volumen promedio de los tumores para el grupo que recibió el vector control al día 18 fue $381,5 \text{ mm}^3$, para el grupo que recibió pOVA fue de $98,8 \text{ mm}^3$ y para el grupo que recibió D-OVA fue de $11,3 \text{ mm}^3$. El tamaño de los tumores de los grupos tratados con pOVA y D-OVA es significativamente menor comparado al grupo control ($P < 0,01$ y $P < 0,0001$ respectivamente). El grupo que presenta la mayor protección frente al desafío tumoral es el que fue vacunado con D-OVA, observándose que solo cinco de diez animales desarrollaron tumor, mientras que en el grupo tratado con pOVA, ocho de diez animales desarrollaron tumor.

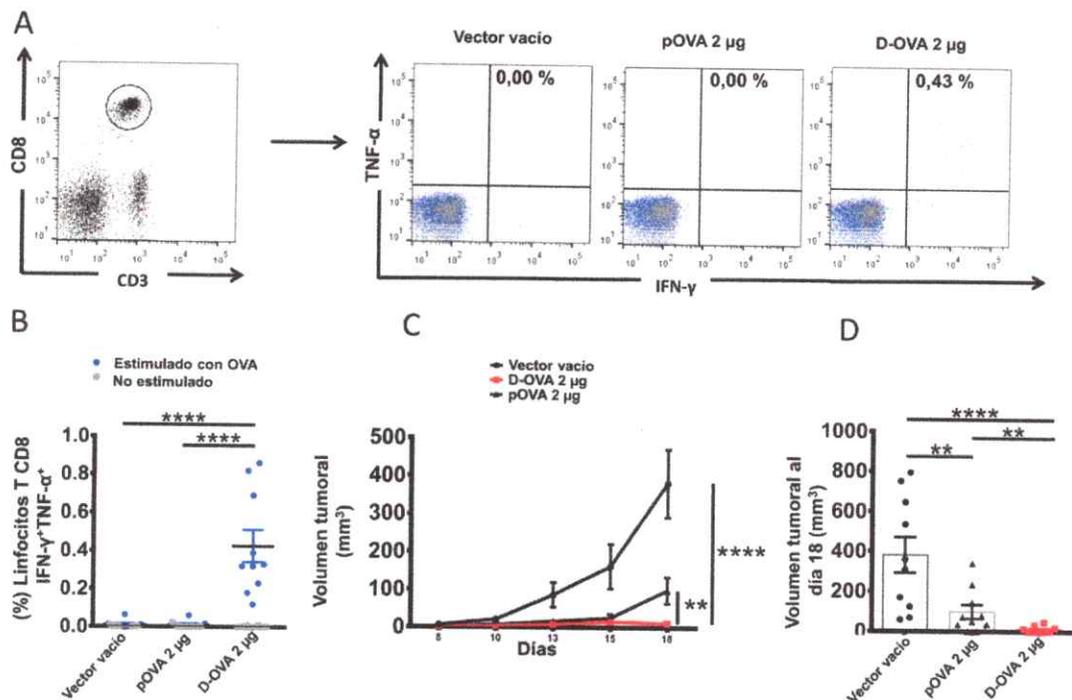


Figura 1. Frecuencia de LT CD8 citotóxicos específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ productores de IFN- γ y TNF- α en sangre y protección frente a un desafío tumoral con células de melanoma B16F10-OVA en ratones tratados con vacunas de ADN convencionales y DREP. Ratones hembras C57BL/6 fueron inyectadas de manera subcutánea en el costado del torso con la línea celular tumoral B16-OVA y dos días después los animales fueron inmunizados con los plásmidos indicados en las figuras. Doce días posteriores a la inmunización, se obtuvo sangre de la cola de cada animal y mediante reestimulación *in vitro* con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ se analizaron los LT CD8 citotóxicos específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ productores de IFN- γ y TNF- α por citometría de flujo. Se siguió el crecimiento tumoral hasta el día 18, donde fueron sacrificados los animales. **A.** Método de análisis que muestra para cada grupo inmunizado las figuras representativas de los porcentajes de LT CD8 citotóxicos específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ productores de IFN- γ y TNF- α en sangre analizados sobre la población de LT CD3 CD8 mediante citometría de flujo. La población estimulada con el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ se muestra en azul y la no estimulada, en gris. **B.** Frecuencia de LT CD8 citotóxicos específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ productores de IFN- γ y TNF- α estimulados con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ o sin estimular analizados mediante citometría de flujo. **C.** Crecimiento tumoral, medido en mm³. **D.** Volumen tumoral al día 18, medido en mm³. Resultados obtenidos de dos experimentos independientes, n=10. Cada valor está expresado como el promedio \pm EE. Se utilizó Test U de Mann Whitney para el análisis estadístico. **P<0,01;****P<0,0001.

Estudio de la generación de LT CD8 efectores y precursores de memoria en animales inmunizados con vacunas de ADN convencionales y DREP vía intradérmica

Luego de la expansión clonal, la respuesta efectora de LT CD8 se compone de distintas subpoblaciones según la capacidad de generar memoria: SLEC, DPEC, MPEC y EEC. Debido a que no se sabe sobre la composición de dichos subtipos luego de inmunizar con vacunas de ADN, es que se estudió su frecuencia luego de inmunizar con D-OVA y pOVA.

Cuatro grupos experimentales de ratones hembras C57BL/6 de 6-8 semanas fueron tratados con: 2 µg de D-OVA, 2 µg de pOVA o 2 µg del vector vacío. Además se incluyó un grupo tratado con pOVA pero a una dosis diez veces mayor (20 µg) para usar una dosis que nos asegure detectar la generación de LT CD8 específicos a niveles similares que D-OVA.

Los animales se inmunizaron dos veces con un intervalo de dos semanas, y doce días después de la última inmunización, se obtuvo sangre de cada animal. Los LT CD8 que poseen el TCR específico para el péptido inmunodominante de la proteína OVA fueron reconocidos en la sangre mediante la tinción con un multímero de MHC, el dextrámero H-2 Kb/SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) y análisis por citometría de flujo como muestra la figura 2 A. La figura 2 B muestra la frecuencia de LT CD8 efectores específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ en cada uno de los grupos experimentales, donde el porcentaje detectado es significativamente mayor al compararlo con la condición control ($P < 0,05$; datos no mostrados, analizados mediante test U de Mann Whitney).

Se observa que la inmunización con D-OVA a una dosis de 2 µg genera una mayor respuesta (6,32 %) comparado a la inmunización con la misma dosis (1,20 %,

$P < 0,05$) y con una dosis 10 veces mayor de pOVA (3,73%), aunque esta última comparación no es estadísticamente significativa.

En la figura 2 C se muestra la detección de las poblaciones efectoras analizadas dentro de la población de LT CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄, basado en la expresión de las moléculas KLRG1 y CD127. El porcentaje detectado de cada subtipo efector es significativamente mayor al compararlo con la condición control para cada uno de los grupos experimentales ($P < 0,05$; datos no mostrados, analizados mediante test U de Mann Whitney).

En la figura 2 D se muestra la frecuencia de cada subtipo efector analizado en la población de LT CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄. Para los grupos que recibieron D-OVA a una dosis de 2 μg y pOVA a una dosis de 20 μg la población que está presente en mayor porcentaje es la de LT CD8 citotóxicos precursores de memoria (MPEC), siendo un 49,06% para D-OVA y un 55,10 % para pOVA. Luego sigue la población de DPEC con un 42,49 % para D-OVA y un 30,09% para pOVA.

Finalmente se observa que las poblaciones efectoras menos representadas son SLEC, con un 7% para D-OVA y un 11,24 % para pOVA y EEC, con un 1,45% para D-OVA y un 3,57 % para pOVA.

Respecto a las poblaciones efectoras observadas en los animales inmunizados con pOVA 2 μg , dada la menor magnitud de la respuesta, se detectó alta variabilidad en los datos en comparación a las otras condiciones lo que dificultó la distinción de las distintas poblaciones efectoras, por lo tanto aun cuando se analizaron, estos datos no fueron considerados.

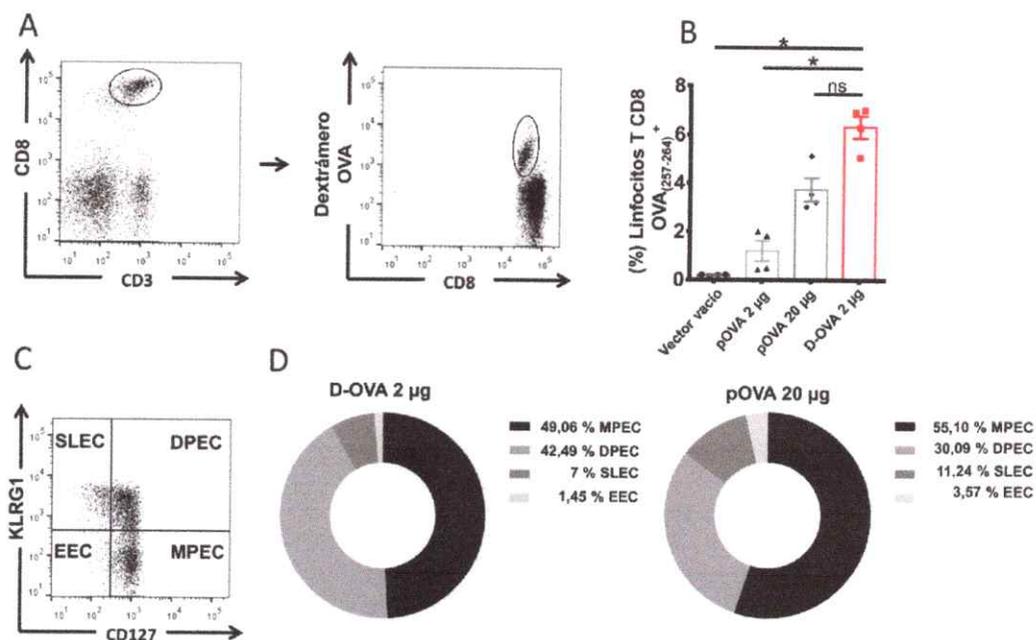


Figura 2. Frecuencia de poblaciones efectoras de LT CD8 específicos contra OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ en sangre de ratones inmunizados con vacunas de ADN convencionales y DREP. Ratones hembras C57BL/6 fueron inmunizados con los plásmidos y dosis indicados en las figuras dos veces con un intervalo de dos semanas. Doce días después de la última inmunización los ratones fueron sangrados para evaluar la frecuencia de poblaciones de LT CD8 citotóxicos mediante citometría de flujo. **A.** Método de análisis en sangre muestra la población de LT CD3 CD8 sobre la cual se detectaron los LT CD8 específicos contra OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ mediante tinción con el dextrámero H-2 Kb/SIINFEKL (OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴). **B.** Frecuencia de LT CD8 citotóxicos específicos contra OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴. **C.** Detección de poblaciones efectoras analizadas dentro de la población de LT CD8 citotóxicos OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ específicos, basado en la expresión de las moléculas KLRG1 y CD127: Short-lived effector cell (SLEC; CD127⁻ KLRG1⁺); double-positive effector cell (DPEC; CD127⁺ KLRG1⁺); memory-precursor effector cell (MPEC; CD127⁺ KLRG1⁻); early effector cell (EEC; CD127⁻ KLRG1⁻). **D.** Frecuencia de SLEC, DPEC, MPEC y EEC analizados sobre la población de LT CD8 específicos contra OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴. Resultados obtenidos de un experimento, n=4. Cada valor está expresado como el promedio ± EE. Se utilizó test U de Mann Whitney para el análisis estadístico. *P<0,05; ns>0,05.

Estudio de la generación de LT CD8 específicos de memoria central (T_{CM}), efectora (T_{EM}) y residente (T_{RM}) de la piel en animales inmunizados con vacunas de ADN convencionales y DREP.

Debido a que uno de los objetivos principales de la vacunación es generar memoria inmunológica es que se estudiaron las poblaciones de LT CD8 de memoria inducidas por vacunas de ADN convencionales y basadas en replicones de alfavirus mediante electroporación intradérmica.

Ratones C57BL/6 de 6-8 semanas fueron inmunizados dos veces con un intervalo de dos semanas. Los distintos grupos de ratones fueron vacunados con 2 μ g de D-OVA, 2 μ g de pOVA, 20 μ g de pOVA y 2 μ g del vector vacío. Seis semanas después de la última inmunización los animales fueron sacrificados para coleccionar sus bazo y piel. Los LT CD8 que poseen el TCR específico para el péptido inmunodominante de la proteína OVA fueron detectados en el bazo y piel, mediante tinción con el dextrámero H-2 Kb/SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) y análisis por citometría de flujo.

La figura 3 A muestra la detección de LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ en bazo. En la figura 3 B se muestra la frecuencia de LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄, para cada uno de los grupos, donde el porcentaje detectado es significativamente mayor al compararlo con la condición control ($p < 0,05$; datos no mostrados, analizados mediante test U de Mann Whitney). Además, se observa que el grupo inmunizado con D-OVA a una dosis de 2 μ g genera un mayor porcentaje de LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ (1%) comparado con el grupo inmunizado con 2 μ g de pOVA (0,15 %, **** $P < 0,0001$) o con 20 μ g de pOVA (0,43 %, ** $P < 0,01$).

En la figura 3C se muestra la detección de los subtipos de memoria analizados dentro de la población de LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄, basado en la expresión de las moléculas CD62L y CD44. El porcentaje detectado de cada población es significativamente mayor al compararlo con la condición control para cada uno de los grupos experimentales ($P < 0,05$; datos no mostrados, analizados mediante test U de Mann Whitney).

La figura 3 D muestra el porcentaje de las poblaciones de linfocitos de memoria T_{EM} y T_{CM} analizados dentro de la población de LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄. Se observa que el subtipo más representado es T_{EM} tanto para el grupo inmunizado con D-OVA a una dosis de 2 µg (91,90%) como para el grupo inmunizado con pOVA a una dosis de 20 µg (89,72%). El subtipo menos representado es T_{CM} tanto para el grupo inmunizado con D-OVA (8,10%) como para el grupo inmunizado con pOVA (10,28%).

Respecto a las poblaciones observadas en los animales inmunizados con 2 µg de pOVA, dada la menor magnitud de la respuesta, se detectó alta variabilidad en los datos en comparación a las otras condiciones lo que dificultó la distinción de las poblaciones efectoras, por lo tanto aun cuando se analizaron, estos datos no fueron considerados.

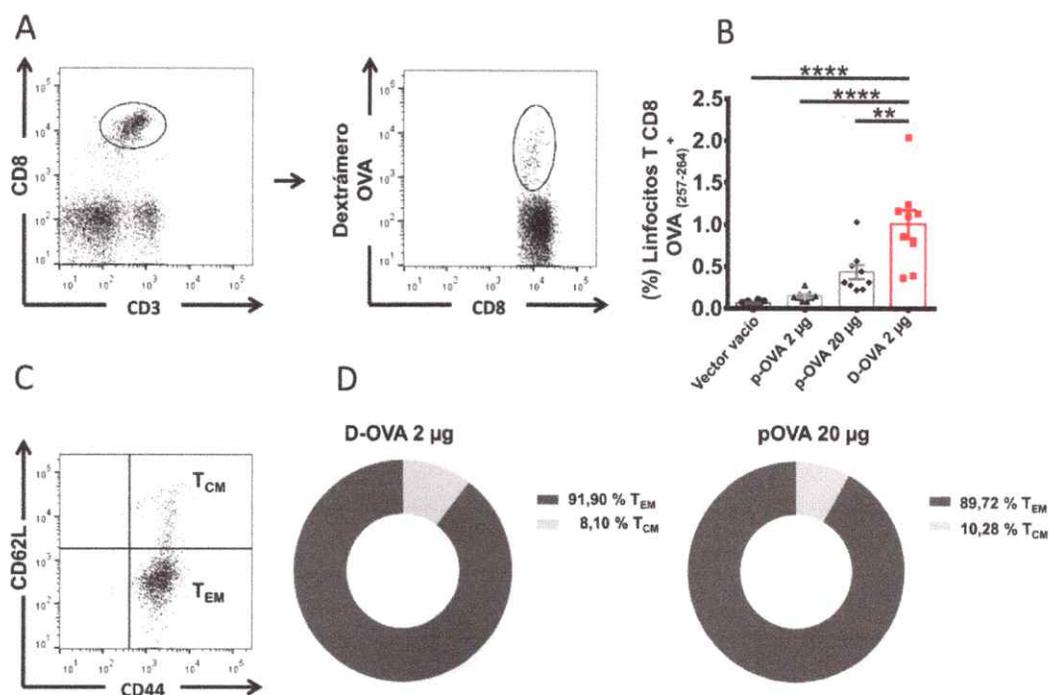


Figura 3. Frecuencia de poblaciones de LT CD8 de memoria (T_{EM} y T_{CM}) específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ en bazo de ratones inmunizados con vacunas de ADN convencionales y DREP. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con los plásmidos y dosis indicados en las figuras dos veces con un intervalo de dos semanas. Seis semanas después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados para evaluar la frecuencia de las poblaciones de linfocitos de memoria en bazo mediante citometría de flujo. **A.** Método de análisis en bazo muestra la población de LT CD3 CD8 sobre la cual se detectaron los LT CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ mediante tinción con el dextrómero H-2 Kb/SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄). **B.** Frecuencia de LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄. **C.** Detección de las poblaciones de memoria: LT de memoria central (T_{CM}; CD44⁺CD62L⁺) y LT de memoria efectores (T_{EM}; CD44⁺CD62L⁻) analizados dentro de la población de LT CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄. **D.** Frecuencia de T_{EM} y T_{CM} analizados sobre la población de los LT CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄. Resultados obtenidos de dos experimentos independientes, n=9. Cada valor está expresado como el promedio ± EE. Se utilizó test U de Mann Whitney para el análisis estadístico. **P<0,01;****P<0,0001.

La figura 4 A muestra que fue posible detectar LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ en piel. Estos linfocitos no sólo se acumulan en el sitio vacunado (zona dorsal cercana a la base de la cola) sino que también en una zona distante al sitio vacunado (zona dorsal superior cercana a la cabeza) (Figura 4 B).

Como muestra la figura 4 B, en el sitio vacunado se observa que el grupo que recibió D-OVA presenta un mayor porcentaje de LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ (45,7 %) comparado al grupo que recibió pOVA a una dosis de 2 µg (21,3 %) o pOVA a una dosis de 20 µg (30 %). En el sitio distante no se observan diferencias entre las vacunas y los porcentajes fueron: 20,1 % para el grupo inmunizado con D-OVA a una dosis de 2 µg, 6,6 % para pOVA a la misma dosis y 12,2% para el grupo que recibió pOVA a una dosis de 20 µg. Cabe destacar que el porcentaje detectado de LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ es menor en el sitio distante comparado al sitio vacunado para todas las condiciones estudiadas.

Debido a que los T_{RM} CD8 mantienen la memoria inmunológica en tejidos no linfoides o barreras epiteliales como la piel, es que se analizó si los LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ tienen un fenotipo de T_{RM} CD8, lo cual se evaluó con los marcadores CD62L, CD44, CD103 y CD69.

Se observó que todos los LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ presentan un fenotipo CD62L⁻ CD44⁺ CD69⁺. En cuanto a la expresión de CD103, detectamos dos poblaciones, una positiva y otra negativa para la expresión de CD103 como muestra la figura 4 C. Por lo tanto, fue posible detectar dos poblaciones con un fenotipo T_{RM} CD8: una CD103⁺ y otra CD103⁻.

En la figura 4 D se observa que en el sitio vacunado se identificaron ambas poblaciones de linfocitos T_{RM} CD8 y que para el grupo inmunizado con D-OVA se

observó una mayor proporción de T_{RM} CD8 CD103⁺ en el sitio vacunado. En el sitio distante (no vacunado) se aprecia que hay una mayor proporción de T_{RM} CD8 CD103⁺ para todas las condiciones estudiadas.

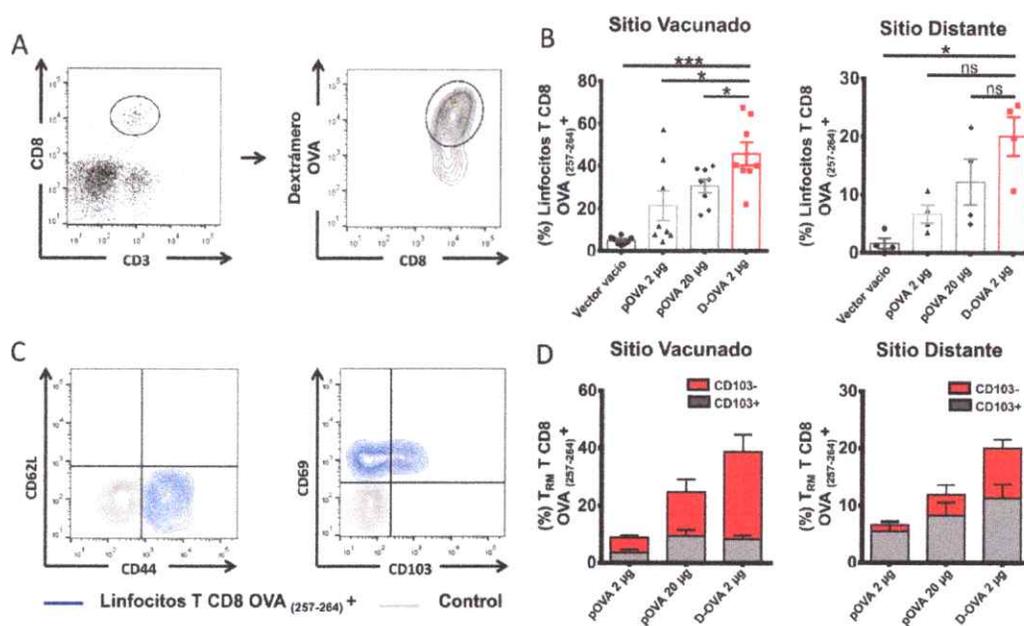


Figura 4. Detección de T_{RM} CD8, específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ en piel de ratones inmunizados con vacunas de ADN convencionales y DREP. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con los plásmidos y dosis indicados en las figuras dos veces con un intervalo de dos semanas. Seis semanas después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados para evaluar la frecuencia y fenotipo de los T_{RM} en piel mediante citometría de flujo. **A.** Método de análisis en piel que muestra la población de LT CD3 CD8 sobre la cual se detectaron los LT CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ mediante tinción con el dextrámero H-2 Kb/SlINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄). **B.** Frecuencia de LT CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ en el sitio vacunado y en un sitio distante de la zona vacunada. **C.** Caracterización del fenotipo de los LT CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ de piel con los marcadores CD62L CD44, CD69 y CD103. Como control para fijar la población negativa y positiva en los histogramas se seleccionó la población CD3 CD8 negativa. **D.** Frecuencia de LT CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ que son CD103⁺ o CD103⁻ en un sitio distante de la zona vacunada y en el sitio vacunado. Resultados obtenidos de dos experimentos independientes: n=8, para el análisis de linfocitos T CD8 OVA₂₅₇₋₂₆₄ específicos, y un experimento: n=4 para el análisis de T_{RM} CD8. Cada valor está expresado como el promedio ± EE. Se utilizó test U de Mann Whitney para el análisis estadístico. *P<0,05; ***P < 0,001, ns>0,05.

DISCUSIÓN

Los T_{RM} CD8 son una población de linfocitos que mantienen la memoria inmunológica en diversos órganos no linfoides como pulmón, cerebro, hígado, vagina, intestino y piel (Masopust y col., 2006; Wakim y col., 2010; Jiang y col., 2012; Tse y col., 2013; Wu y col., 2014). Estudios que han analizado la presencia de T_{RM} CD8 en tumores sólidos humanos han proporcionado pruebas de que los T_{RM} CD8 podrían mediar la inmunidad antitumoral (Webb y col., 2014; Djenidi y col., 2015). Por lo que existe gran interés en desarrollar vacunas que induzcan la generación de T_{RM} CD8.

En este trabajo fue posible determinar que la electroporación intradérmica con vacunas de ADN convencionales y basadas en replicones de alfavirus induce la generación de T_{RM} CD8 específicos en la piel. Se observó que los T_{RM} CD8 específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ se acumulan en el sitio de vacunación y también en zonas distantes en la piel. Se ha demostrado que los T_{RM} CD8 tienen la capacidad de migrar a través de la epidermis patrullando continuamente la piel (Ariotti y col., 2012). Debido a que su migración es lenta, esto promueve su persistencia en los sitios donde ocurrió la infección (Mueller y col., 2014; Zaid y col., 2014). En modelos donde infectan localmente la piel con el virus del herpes simple, se ha visto que se generan T_{RM} CD8 específicos contra el virus, predominando en el lugar de la infección, aunque es posible encontrarlos en toda la piel, lo que coincide con los resultados obtenidos ya que el porcentaje de T_{RM} CD8 específicos fue mayor en el sitio vacunado comparado al distante (Gebhardt y col., 2009; Jiang y col., 2012).

Los T_{RM} CD8 tienen un fenotipo $CD44^+CD62L^-$ y se caracterizan por expresar CD69 y CD103, marcadores característicos relacionados con su retención y diferenciación en tejidos como la piel (Mueller y col., 2013).

En este trabajo, el fenotipo de los LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ concuerda con el descrito en la literatura: expresan CD44, CD69 y no expresan CD62L. En cuanto al marcador CD103 se observó dos poblaciones, una $CD103^+$ y una $CD103^-$. Ambas poblaciones se han descrito en piel y en otros tejidos tales como cerebro, tracto reproductivo femenino entre otros (Wakim y col., 2010; Casey y col., 2012; Mackay y col., 2013; Mackay y col., 2015).

Se sabe que CD103 es requerido para que los T_{RM} puedan ser retenidos en los tejidos (Iijima & Iwasaki, 2015). En nuestro laboratorio se han realizado experimentos posteriores a este trabajo, donde se les ha transferido LT CD8 OTI CD45.1 a animales, los cuales son inmunizados posteriormente con pOVA y cuatro semanas posteriores a esto se realiza depleción in vivo de los LT CD8 circulantes. En estos experimentos se ha visto que en piel, la población T_{RM} CD8 $CD103^-$ específica también se depleta, mientras que la población T_{RM} CD8 $CD103^+$ no se ve afectada, por lo que esta última sería verdaderamente residente y no circulante, datos que concuerdan con lo previamente descrito en modelos de infección viral (Mackay y col., 2015). No obstante lo anterior, se han reportado T_{RM} CD8 $CD103^-$ que no recirculan (lámina propia y cerebro), pudiendo existir otro tipo de señal que permita la retención de esta población en los tejidos. Por ejemplo, en la lámina propia se ha visto que hay T_{RM} CD8 $CD103^-$ que se establecen en el sitio de infección original, donde se asocian con otras células del sistema inmune lo que podría proveer señales de retención necesarias para su residencia (Wakim y col., 2010; Bergsbaken & Bevan, 2015).

En este trabajo, en el sitio vacunado se detectó T_{RM} CD8 CD103⁻ y CD103⁺. En el caso particular de los animales inmunizados con D-OVA, se observó que en el sitio vacunado hay una población mayoritaria de linfocitos CD103⁻. En el sitio distante se detectó una población mayoritaria de linfocitos CD103⁺ para todas las condiciones estudiadas. En modelos de infección bacteriana intestinal, se ha visto que los T_{RM} CD8 CD103⁺ se encuentran distribuidos ampliamente en el intestino mientras que la población T_{RM} CD8 CD103⁻ se establece preferentemente en el sitio de infección, posiblemente mediante un mecanismo dependiente de la inflamación y donde deben cumplir un rol crítico en controlar la infección (Bergsbaken & Bevan, 2015). Nuestros resultados indican que algo similar ocurre en la piel luego de la vacunación intradérmica, lo cual no había sido descrito hasta ahora.

Se sabe que los T_{RM} CD8 CD103⁺ poseen mayor capacidad efectora y proliferan menos que los T_{RM} CD8 CD103⁻ y que la expresión de CD103 depende de la citoquina TGF- β que es secretada por células de la epidermis tales como queratinocitos y células de Langerhans (Piet y col., 2011; Wakim y col., 2012). Se debe mencionar que la expresión de CD103 se ha asociado con la localización de los T_{RM} CD8 en la piel, donde los CD103⁻ se ubican en la dermis, mientras que los CD103⁺ se ubican en la epidermis (Mackay y col., 2013; Watanabe y col., 2015). Sería interesante analizar las poblaciones de T_{RM} CD8 en ambas zonas de la piel así como evaluar el rol de cada población en el sitio vacunado y distante.

Como se mencionó previamente, los LT CD8 específicos analizados corresponden en su totalidad a T_{RM} . En cuanto a los T_{EM} y T_{CM} no fueron detectados. Los T_{CM} se encuentran en los órganos linfoides secundarios principalmente y los T_{EM} se encuentran en tejidos no linfoides (Sallusto y col., 2004). En la piel, se ha visto, que luego de una infección viral se detecta un bajo porcentaje de T_{EM} , y la mayoría de las células tienen un fenotipo T_{RM} . Además se ha establecido que tanto en humanos

como en ratones, una gran parte de los linfocitos de memoria presentes en piel corresponden a T_{RM} (Mackay y col., 2013; Clark, 2015).

Al observar la frecuencia de T_{RM} CD8 específicos en piel (6-45%), ésta es mayor a la frecuencia de LT CD8 de memoria específicos detectados en bazo (T_{EM} y T_{CM}) (0,15-1%). En los tejidos no linfoides, los T_{RM} CD8 se encuentran enriquecidos en linfocitos T que son específicos para antígenos con los que se ha tenido previo encuentro en dicha región (Purwar y col., 2011; Clark, 2015).

Estudios en modelos animales han demostrado que es posible inducir T_{RM} CD8 localmente al aplicar quimioquinas en el tracto reproductor femenino, ofreciendo protección contra el herpes genital (Shin & Iwasaki, 2012). Otros estudios han demostrado que la inmunización epicutánea es capaz de generar protección mediada por T_{RM} CD8 (Jiang y col., 2012). Aquí demostramos que las vacunas de ADN entregadas vía intradérmica mediante electroporación generan respuestas robustas de T_{RM} CD8 en la piel, que podrían mediar protección contra enfermedades infecciosas o cánceres que ocurran en la piel, tales como el melanoma.

Las vacunas de ADN han ofrecido protección en muchos modelos preclínicos contra enfermedades como el cáncer y han mostrado ser seguras y estables (Herrada y col., 2012; Khan, 2013).

En el presente trabajo también se comparó el potencial antitumoral de vacunas de ADN convencionales y vacunas de ADN basadas en replicones de alfavirus (DREP) en un modelo terapéutico. Se observó que el tamaño tumoral de los grupos tratados con pOVA y D-OVA fue significativamente menor comparado al grupo control. El grupo tratado con D-OVA presentó la mayor protección frente al desafío tumoral y fue el único en el que se detectaron LT CD8 citotóxicos específicos contra OVA₂₅₇.

264. Aunque no se detectó respuesta de LT CD8 específicos en el grupo que recibió 2 µg de pOVA (Figura 1 A y B), se observó que el crecimiento tumoral fue menor en el tiempo en comparación al grupo control. Probablemente los LT CD8 específicos están siendo reclutados en el tumor, lo que impide que sean detectados en sangre, ya que estudios de nuestro laboratorio así lo demuestran. De hecho en el experimento llevado a cabo sin desafío tumoral (Figura 2B), sí fue posible detectar respuestas de LT CD8 específicos en ratones vacunados con 2 µg de pOVA.

En este trabajo se usó la proteína OVA como antígeno modelo, sin embargo es importante validar lo observado con antígenos tumorales debido a la tolerancia central y periférica que existe frente a ellos (Bellone y col., 2000; Mellman y col., 2011). Además, sería bueno evaluar qué ocurre en un modelo profiláctico, donde se vacuna primero y luego se desafía con tumor.

Respecto a los resultados observados en el grupo inmunizado con D-OVA, se ha reportado que las vacunas DREP funcionan a dosis más bajas que las vacunas de ADN convencionales y generan una respuesta de LT CD8 citotóxicos específicos más potente, proveyendo inmunidad protectora en desafíos tumorales en modelos animales (Naslund y col., 2007). Esto es debido a que generan mayores niveles de expresión del antígeno y porque la replicasa viral genera intermediarios de ARN de doble hebra que estimulan receptores de la inmunidad innata, induciendo la producción de IFN I por parte de las DC lo que promueve la respuesta inmune adaptativa específica (Leitner y col., 2000; Knudsen y col., 2012).

El objetivo de las vacunas de ADN es inducir una respuesta efectora potente así como también establecer memoria inmunológica contra el antígeno que codifican frente a futuros reencuentros. En este trabajo se estudiaron las distintas

poblaciones de LT CD8 citotóxicos y de memoria en animales inmunizados con vacunas de ADN.

Los LT CD8 citotóxicos se caracterizan fenotípicamente con las moléculas KLRG1 y CD127, dividiéndose en cuatro poblaciones celulares: DPEC, SLEC, EEC Y MPEC (Marshall & Kaech, 2013). Fue posible detectar los cuatro subtipos en el máximo de la respuesta efectora de LT CD8 citotóxicos específicos. Los dos subtipos más representados fueron MPEC y DPEC; los menos representados fueron EEC y SLEC. Los MPEC tienen la capacidad de responder a señales de supervivencia y convertirse en LT de memoria (Obar & Lefrancois, 2010). En este estudio se observó que la inmunización con vacunas de ADN genera principalmente MPEC lo cual se corresponde con uno de los objetivos primordiales de la vacunación que es generar protección a largo plazo frente a un nuevo reencuentro con el antígeno (Castellino y col., 2009).

Respecto a los DPEC, se conoce poco acerca de su función. En modelos de infecciones virales en ratones se ha visto que frente a una exposición secundaria al antígeno se incrementan significativamente respecto de la primera exposición y que frente a repetidos encuentros con el antígeno, junto con los MPEC, son las dos poblaciones que más contribuyen a la respuesta efectora (Obar y col., 2011). Habrá que determinar si sucede lo mismo al inmunizar con vacunas de ADN y cuál es el rol de esta población. Los EEC son precursores de los MPEC y SLEC. Se encuentran tempranamente luego de una infección, predominando en los días anteriores a la mayor respuesta efectora de LT CD8 citotóxicos, aunque también se encuentran en esta fase menos representados (Obar y col., 2011; Plumlee y col., 2015). Probablemente los bajos porcentajes observados se deben a lo anterior, aunque esto debe ser confirmado observando la frecuencia de este subtipo los días previos al tiempo estudiado.

Se ha visto que la composición de las poblaciones efectoras cambia según el régimen de inmunización (Obar y col., 2011). En este estudio se realizó un régimen con una primera vacunación y un refuerzo dos semanas después. Debido a que solo se estudiaron las poblaciones efectoras luego del refuerzo, queda pendiente evaluar lo que sucede luego de inmunizar la primera vez. Así mismo, sería interesante realizar una cinética desde el momento de la vacunación hasta la generación y mantención de la memoria para analizar cómo varían las poblaciones efectoras en el tiempo.

La generación de las poblaciones efectoras está influenciada por diversos factores como la duración y potencia de la estimulación antigénica; factores de transcripción, señales coestimuladoras y un balance entre la presencia de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Marshall & Kaech, 2013). Se ha descrito que la presencia de un ambiente proinflamatorio mediado por IL-12, incrementa la expresión del factor de transcripción t-bet lo que induce la generación de SLEC. Por otra parte se ha visto que bajos niveles de t-bet y un ambiente rico en señales antiinflamatorias como IL-10, favorece la generación de MPEC (Joshi y col., 2007; Kaech & Cui, 2012).

En el caso de la electroporación intradérmica de ADN, ésta técnica promueve la producción de citoquinas proinflamatorias, y el ADN actúa como señal de peligro estimulando la inmunidad innata (Babiuk y col., 2004; Herrada y col., 2012). Debido a este ambiente proinflamatorio, se podría pensar que se generan SLEC principalmente, pero en este estudio se observó que predominan los MPEC. Deben realizarse experimentos adicionales para determinar qué factores influyen o participan en la composición de los subtipos efectoras observados.

Respecto a los grupos estudiados se observó que el porcentaje de LT CD8 citotóxicos específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ en sangre fue mayor en el grupo que recibió la vacuna D-OVA en una dosis de 2 µg comparado con el grupo que recibió el vector pOVA a una dosis de 2 µg y similar con el grupo que recibió el vector pOVA a una dosis de 20 µg. Estos resultados se condicen una vez más con el hecho de que las vacunas DREP funcionan a dosis más bajas que las vacunas de ADN convencionales y generan una respuesta de LT CD8 citotóxicos específicos más potente (Knudsen y col., 2012).

Respecto a los animales inmunizados con pOVA 2 µg los datos fueron muy variables debido a los bajos niveles de detección de LT CD8 citotóxicos OVA₂₅₇₋₂₆₄ en algunos de los ratones del grupo lo que dificultó la distinción de las distintas poblaciones efectoras.

Respecto a la magnitud de la respuesta de LT CD8 de memoria específicos contra OVA₂₅₇₋₂₆₄ en el bazo de animales inmunizados con pOVA y D-OVA, se observó que fue mayor en el grupo que recibió la vacuna D-OVA en una dosis de 2 µg comparado con el grupo que recibió el vector pOVA a una dosis de 2 µg o 20 µg. Algo similar a lo observado en piel en el sitio vacunado.

En relación a lo anterior, no se han evaluado diferencias entre vacunas de ADN convencionales y DREP con regímenes homólogos de inmunización en la literatura, pero se ha visto que en regímenes heterólogos se genera una mayor respuesta efectora con DREP comparando ambas vacunas en bazo (Knudsen y col., 2012).

La formación de la memoria inmunológica se ve influenciada por la magnitud de la respuesta inmune inicial y por la secreción de interferones de tipo I (Xiao y col., 2009; Huber & Farrar, 2011). Lo anterior podría verse favorecido al vacunar con DREP, porque la respuesta inmune inicial generada es mayor comparada a las

vacunas de ADN convencionales y debido a que los intermediarios de ARN que se producen estimulan receptores de la inmunidad innata, lo que resulta en una alta producción de interferones de tipo I (Leitner y col., 2006; Thompson y col., 2008; Naslund y col., 2011). Esto explicaría que se genere una respuesta más potente de LT CD8 de memoria con D-OVA, en comparación a pOVA.

En este estudio se vio que las vacunas de ADN convencionales y basadas en replicones de alfavirus generan más T_{EM} que T_{CM} . Aunque ambas vacunas no han sido comparadas en un mismo ensayo, se ha reportado lo mismo en la literatura para cada una por separado (Lladser y col., 2011; Knudsen y col., 2014). En general, se ha observado que frente a vacunaciones con refuerzo (como es el caso) o infecciones repetidas, se genera una población secundaria y terciaria de memoria de LT CD8 que se diferencia progresivamente hacia un fenotipo T_{EM} (Jabbari & Harty, 2006; Masopust y col., 2006). Existen distintos factores que pueden influir en la generación de un subtipo particular de memoria, por ejemplo, se ha visto que limitando la disponibilidad de antígeno durante la infección, se favorece la proporción de precursores de T_{CM} (Badovinac y col., 2004). También, el tipo de citoquina presente puede influenciar la diferenciación a un subtipo u otro, por ejemplo, se ha visto que la señalización mediante IL-2 está asociada con el desarrollo de T_{EM} mientras que la señalización por IL-15 favorece la diferenciación a T_{CM} (Obar & Lefrancois, 2010).

Se han desarrollado en el tiempo distintas estrategias para mejorar la potencia de las vacunas de ADN, tales como: regímenes de inmunizaciones con refuerzo, mejora en los métodos de administración (electroporación) y en la expresión del antígeno entre otras (Grunwald & Ulbert, 2015). El desarrollo de vacunas DREP ha sido un avance en relación a lo anterior debido a que han mostrado ser más inmunogénicas que las vacunas de ADN convencionales y se requieren en menores

dosis (Knudsen y col., 2012). No obstante, es necesario seguir investigando la relación entre las vacunas de ADN, el tipo de respuesta efectora y de memoria que generan. Esto permitirá el desarrollo de vacunas más eficaces contra patógenos o enfermedades. En este contexto, demostramos que las vacunas de ADN entregadas vía intradérmica generan T_{RM} CD8 en la piel, esta población podría eventualmente mediar protección contra patologías o cánceres que ocurran en la piel como el melanoma.

CONCLUSIONES

1. En un modelo terapéutico de melanoma murino B16F10, la vacunación con D-OVA genera mayor protección antitumoral que la vacunación con pOVA.
2. Las vacunas DREP generan un mayor porcentaje de LT CD8 efectores y de memoria que las vacunas de ADN convencionales.
3. Cuando se produce la mayor respuesta efectora de LT CD8, la población efectora más representada luego de la inmunización intradérmica con vacunas de ADN es MPEC.
4. En la fase de memoria las vacunas de ADN administradas vía intradérmica generan más T_{EM} que T_{CM} en el bazo.
5. La inmunización vía intradérmica con vacunas de ADN genera T_{RM} CD8 en la piel.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahlén G, Söderholm J, Tjelle T, Kjekken R, Frelin L, Höglund U, Blomberg P, Fons M, Mathiesen I, Sällberg M. 2007. *In vivo* electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. *J Immunol.* **179**: 4741-4753.
- Amsen D, Backer R.A, Helbig C. 2013. Decisions on the road to memory. *Adv Exp Med Biol.* **785**: 107-120.
- Ariotti S, Beltman J.B, Chodaczek G, Hoekstra M.E, van Beek A.E, Gomez-Eerland R, Ritsma L, van Rheenen J, Marée A.F, Zal T, de Boer R.J, Haanen J.B, Schumacher T.N. 2012. Tissue-resident memory CD8+ T cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**: 19739-19744.
- Ariotti S, Hogenbirk MA, Dijkgraaf FE, Visser LL, Hoekstra ME, Song JY, Jacobs H, Haanen JB, Schumacher TN. 2014. T cell memory. Skin-resident memory CD8(+) T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science* **346**: 101-105.
- Baaten BJ, Li C.R, Bradley L.M. 2010. Multifaceted regulation of T cells by CD44. *Commun Integr Biol.* **3**: 508-512.
- Baaten B.J, Tinoco R, Chen A.T, Bradley L.M. 2012. Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the Quintessential Memory Marker CD44. *Front Immunol.* **3**: 23.
- Babiuk S, Baca-Estrada M.E, Foldvari M, Middleton D.M, Rabussay D, Widera G, Babiuk L.A. 2004. Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines. *J Biotechnol.* **110**: 1-10.
- Vladimir P Badovinac, Brandon B Porter, John T.H. 2004. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol.* **5**: 809-817.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* **18**: 767-811.
- Bellone M, Cantarella D, Castiglioni P, Crosti M.C, Ronchetti A, Moro M, Garancini M.P, Casorati G, Dellabona P. 2000. Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J Immunol.* **165**: 2651-2656.
- Bergsbaken T, Bevan M.J. 2015. Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8(+) T cells responding to infection. *Nat Immunol.* **16**: 406-414.
- Bhatia S, Tykodi S, Thompson J.A. 2009. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)* **23**: 488-496.
- Blattman J. N, Antia R, Sourdive D.J, Wang X, Kaech S.M, Murali-Krishna K, Altman J.D, Ahmed R. 2002. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med.* **195**: 657-664.
- Casey K. A, Fraser K. A, Schenkel J.M, Moran A, Beura L.K, Lucas P.J, Artis D, Wherry E.J, Hogquist K, Vezyz V, Masopust D. 2012. Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J Immunol.* **188**: 4866-4875.
- Castellino F, Galli G, Del Giudice G, Rappuoli R. 2009. Generating memory with vaccination. *Eur J Immunol.* **39**: 2100-2105.

- Clark R. A. 2015. Resident memory T cells in human health and disease. *Sci Transl Med.* 7: 269rv1.
- Cyster J. G, Schwab S. R. 2012. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.* 30: 69-94.
- Chang J. T, Wherry E. J, Goldrath A.W. 2014. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol.* 15: 1104-1115.
- Diebold S. S, Schulz O, Alexopoulou L, Leitner W.W, Flavell R.A, Reis e Sousa C. 2009. Role of TLR3 in the immunogenicity of replicon plasmid-based vaccines. *Gene Ther.* 16: 359-366.
- Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpréville V, Validire P, Besse B, Mami-Chouaib F. 2015. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J Immunol.* 194: 3475-3486.
- Driver D. A, Latham E.M, Polo J.M, Belli B.A, Banks T.A, Chada S, Brumm D, Chang S.M, Mento S.J, Jolly D.J. 1995. Layered amplification of gene expression with a DNA gene delivery system. *Ann N Y Acad Sci.* 772: 261-264.
- Ferraro B, Morrow M.P, Hutnick N.A, Shin T.H, Lucke C.E, Weiner D.B. 2011. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin Infect Dis.* 53: 296-302.
- Gebhardt T, Wakim L.M, Eidsmo L, Reading P.C, Heath W.R, Carbone F.R. 2009. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol.* 10: 524-530.
- Grunwaldg T., Ulbert S. 2015. Improvement of DNA vaccination by adjuvants and sophisticated delivery devices: vaccine-platforms for the battle against infectious diseases. *Clin Exp Vaccine Res.* 4: 1-10.
- Harty J. T, Badovinac V.P. 2008. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol.* 8: 107-119.
- Herrada A. A, Rojas-Colonelli N, González-Figueroa P, Roco J, Oyarce C, Ligtenberg M.A, Lladser A. 2012. Harnessing DNA-induced immune responses for improving cancer vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 8: 1682-1693.
- Huber J. P, Farrar J. D. 2011. Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. *Immunology* 132: 466-474.
- Hussein M. R. 2008. Extracutaneous malignant melanomas. *Cancer Invest* 26: 516-534.
- Iijima N, Iwasaki A. 2015. Tissue instruction for migration and retention of TRM cells. *Trends Immunol.* 36: 556-564.
- Jabbari A, Harty J.T. 2006. Secondary memory CD8+ T cells are more protective but slower to acquire a central-memory phenotype. *J Exp Med* 203: 919-932.
- Jiang X, Clark R.A, Liu L, Wagers A.J, Fuhlbrigge R.C, Kupper T.S. 2012. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 483: 227-231.
- Joshi N. S, Cui W, Chandele A, Lee H.K, Urso D.R, Hagman J, Gapin L, Kaech S.M. 2007. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27: 281-295.
- Kaech S. M, Cui W. 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 12: 749-761.
- Kaech S. M, Tan J.T, Wherry E.J, Konieczny B.T, Surh C.D, Ahmed R. 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol.* 4: 1191-1198.

- Kaech S. M, Wherry E. J, Ahmed R. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol.* 2: 251-262.
- Khan K. H. 2013. DNA vaccines: roles against diseases. *Germs.* 3: 26-35.
- Knudsen M. L, Ljungberg K, Kakoulidou M, Kostic L, Hallengård D, García-Arriaza J, Merits A, Esteban M, Liljeström P. 2014. Kinetic and phenotypic analysis of CD8+ T cell responses after priming with alphavirus replicons and homologous or heterologous booster immunizations. *J Virol.* 88: 12438-12451.
- Knudsen M. L, Mbewe-Mvula A, Rosario M, Johansson D.X, Kakoulidou M, Bridgeman A, Reyes-Sandoval A, Nicosia A, Ljungberg K, Hanke T, Liljeström P. 2012. Superior induction of T cell responses to conserved HIV-1 regions by electroporated alphavirus replicon DNA compared to that with conventional plasmid DNA vaccine. *J Virol.* 86: 4082-4090.
- Kurtulus S, Tripathi P, Hildeman D.A. 2012. Protecting and rescuing the effectors: roles of differentiation and survival in the control of memory T cell development. *Front Immunol* 3: 404.
- Kutzler M. A, Weiner D.B 2008. DNA vaccines: ready for prime time?. *Nat Rev Genet.* 9: 776-788.7
- Leitner W. W, Bergmann-Leitner E.S, Hwang L.N, Restifo N.P. 2006. Type I Interferons are essential for the efficacy of replicase-based DNA vaccines. *Vaccine* 24: 5110-5118.
- Leitner W. W, Ying H, Ying H, Driver D.A, Dubensky T.W, Restifo N.P. 2000. Enhancement of tumor-specific immune response with plasmid DNA replicon vectors. *Cancer Res.* 60: 51-55.
- Liu L, Zhong Q, Tian T, Dubin K, Athale S.K, Kupper T.S. 2010. Epidermal injury and infection during poxvirus immunization is crucial for the generation of highly protective T cell-mediated immunity. *Nat Med.* 16: 224-227.
- Luckheeram R. V, Zhou R, Verma A, Xia B. 2012. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012: 925135.
- Lundstrom K. 2014. Alphavirus-based vaccines. *Viruses* 6: 2392-2415.
- Luxembourg A, Evans C.F, Hannaman D. 2007. Electroporation-based DNA immunisation: translation to the clinic. *Expert Opin Biol Ther.* 7: 1647-1664.
- Lladser A, Mouggiakakos D, Tufvesson H, Ligtenberg M.A, Quest A.F, Kiessling R, Ljungberg K. 2011. DAI (DLM-1/ZBP1) as a genetic adjuvant for DNA vaccines that promotes effective antitumor CTL immunity. *Mol Ther.* 19: 594-601.
- Mackay L. K, Braun A, Macleod B.L, Collins N, Tebartz C, Bedoui S, Carbone F.R, Gebhardt T. 2015. Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention. *J Immunol.* 194: 2059-2063.
- Mackay L. K, Rahimpour A, Ma J.Z, Collins N, Stock A.T, Hafon M.L, Vega-Ramos J, Lauzurica P, Mueller S.N, Stefanovic T, Tschärke D.C, Heath W.R, Inouye M, Carbone F.R, Gebhardt T. 2013. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol.* 14: 1294-1301.
- Mackay L. K, Stock A.T, Ma J.Z, Jones C.M, Kent S.J, Mueller S.N, Heath W.R, Carbone F.R, Gebhardt T. 2012. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 7037-7042.
- Mackay L. K, Wynne-Jones E, Freestone D, Pellicci D.G, Mielke L.A, Newman D.M, Braun A, Masson F, Kallies A, Belz G.T, Carbone F.R. 2015. T-box

- Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF-beta and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity* **43**: 1101-1111.
- Marshall H. D, Kaech S.M.** 2013. Generating CD8 T cell heterogeneity: attack of the clones. *Immunity* **39**: 203-205.
- Masopust, D, Ha S. J, Vezys V, Ahmed R.** 2006. Stimulation history dictates memory CD8 T cell phenotype: implications for prime-boost vaccination. *J Immunol* **177**: 831-839.
- Masopust D, Vezys V, Ha S.J, Ahmed R.** 2006. Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population. *J Immunol.* **176**: 2079-2083.
- McCully M. L, Ladell K, Hakobyan S, Mansel R.E, Price D.A, Moser B.** 2012. Epidermis instructs skin homing receptor expression in human T cells. *Blood* **120**: 4591-4598.
- Mellman I, Coukos G, Dranoff G.** 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**: 480-489.
- Mueller S. N, Gebhardt T, Carbone F.R, Heath W.R.** 2013. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol.* **31**: 137-161.
- Mueller S. N, Zaid A, Carbone F.R.** 2014. Tissue-resident T cells: dynamic players in skin immunity. *Front Immunol.* **5**: 332.
- Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H, Ohtani H.** Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* **61**: 5132-5136.
- Naslund T. I, Kostic L, Nordström E.K, Chen M, Liljeström P.** 2011. Role of innate signalling pathways in the immunogenicity of alphaviral replicon-based vaccines. *Virology* **438**: 36.
- Naslund T. I, Uyttenhove C, Nordström E.K, Colau D, Warnier G, Jondal M, Van den Eynde B.J, Liljeström P.** 2007. Comparative prime-boost vaccinations using Semliki Forest virus, adenovirus, and ALVAC vectors demonstrate differences in the generation of a protective central memory CTL response against the P815 tumor. *J Immunol.* **178**: 6761-6769.
- NCI.** 2012 . What Is Cancer? Journal of the National Cancer Institute.
- Obar J. J, Jellison E.R, Sheridan B.S, Blair D.A, Pham Q.M, Zickovich J.M, Lefrançois L.** 2011. Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation. *J Immunol.* **187**: 4967-4978.
- Obar J. J, Lefrançois L.** 2010. Early events governing memory CD8+ T-cell differentiation. *Int Immunol* **22**: 619-625.
- Obar J. J, Lefrançois L.** 2010. Early signals during CD8 T cell priming regulate the generation of central memory cells. *J Immunol.* **185**: 263-272.
- Park C. O, Kupper T. S.** 2015. The emerging role of resident memory T cells in protective immunity and inflammatory disease. *Nat Med.* **21**: 688-697.
- Pawlik T. M, Sondak V. K.** 2003. Malignant melanoma: current state of primary and adjuvant treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.* **45**: 245-264.
- Piet B, de Bree G, Smids-Dierdorp B.S, van der Loos C.M, Remmerswaal B.M, von der Thüsen J.H, van Haarst J.M.W, Eerenberg J.P, Brinke A.T, van der Bij W, Timens W, van Lier R.A.W, Jonkers R.E.** 2011. CD8(+) T cells with an intraepithelial phenotype upregulate cytotoxic function upon influenza infection in human lung. *J Clin Invest.* **121**: 2254-2263.
- Plumlee C. R, Obar J. J, Colpitts S.L, Jellison E.R, Haining W.N, Lefrançois L, Khanna K.M.** 2015. Early Effector CD8 T Cells Display Plasticity in Populating the Short-Lived Effector and Memory-Precursor Pools Following Bacterial or Viral Infection. *Sci Rep.* **5**: 12264.

- Plumlee C. R, Sheridan B. S, Cicek B.B, Lefrançois L. 2013. Environmental cues dictate the fate of individual CD8+ T cells responding to infection. *Immunity* 39: 347-356.
- Purwar R, Campbell J, Murphy G, Richards W.G, Clark R.A, Kupper T.S. 2011. Resident Memory T Cells (T_{RM}) Are Abundant in Human Lung: Diversity, Function, and Antigen Specificity. *PLoS One*. 6:e16245
- Quetglas J. I, Ruiz-Guillen M, Aranda A, Casales E, Bezunartea J, Smerdou C. 2010. Alphavirus vectors for cancer therapy. *Virus Res*. 153: 179-196.
- Rice J, Ottensmeier C.H, Stevenson F.K. 2008. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 108-120.
- Rosenberg S. A, Dudley M. E. 2009. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol*. 21: 233-240.
- Romani N, Flacher V, Tripp C.H, Sparber F, Ebner S, Stoitzner P. 2012. Targeting Skin Dendritic Cells to Improve Intradermal Vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol*. 351: 113-138.
- Sallusto F.J, Geginat J, Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 22: 745-763.
- Sardesai N. Y, Weiner D.B. 2011. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr Opin Immunol*. 23: 421-429.
- Schenkel J. M, Fraser K. A, Vezys V, Masopust D. 2013. Sensing and alarm function of resident memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol*. 14: 509-513.
- Schenkel J. M, Masopust D. 2014. Tissue-resident memory T cells. *Immunity* 41: 886-897.
- Schuster M, Nechansky A, Kircheis R. 2006. Cancer immunotherapy. *Biotechnol J*. 1: 138-147.
- Shin H, Iwasaki A. 2012. A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* 491: 463-467.
- Shin H, Iwasaki A. 2013. Tissue-resident memory T cells. *Immunol Rev*. 255: 165-181.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. 2014. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 64: 9-29.
- Steinman R. M. 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*. 30: 1-22.
- Stevenson F. K, Ottensmeier C. H, Rice J. 2010. DNA vaccines against cancer come of age. *Curr Opin Immunol*. 22: 264-270.
- Tacken P. J, Figdor C. G. 2011. Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines. *Semin Immunol* 23: 12-20.
- Thompson J. M, Whitmore A. C, Staats H.F, Johnston R. 2008. The contribution of type I interferon signaling to immunity induced by alphavirus replicon vaccines. *Vaccine* 26: 4998-5003.
- Tse S. W, Cockburn I. A, Zhang H, Scott A.L, Zavala F. 2013. Unique transcriptional profile of liver-resident memory CD8+ T cells induced by immunization with malaria sporozoites. *Genes Immun*. 14: 302-309.
- Vander Veen R. L, Harris D.L, Kamrud K.I. 2012. Alphavirus replicon vaccines. *Anim Health Res Rev*. 13: 1-9.
- Wakim L. M, Woodward-Davis A, Bevan M.J. 2010. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 17872-17879.
- Wakim L. M, Woodward-Davis A, Liu R, Hu Y, Villadangos J, Smyth G, Bevan M.J. 2012. The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain. *J Immunol*. 189: 3462-3471.

- Watanabe R, Gehad A, Yang C, Scott L.L, Teague J.E, Schlapbach C, Elco C.P, Huang V, Matos T.R, Kupper T.S, Clark R.A.** 2015. Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Sci Transl Med.* 7: 279ra239.
- Webb J.R, Milne K, Nelson B.H.** 2014. Location, location, location: CD103 demarcates intraepithelial, prognostically favorable CD8 tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Oncoimmunology* 3: e27668.
- Williams M. A, Bevan M. J.** 2007. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol.* 25: 171-192.
- Wu T, Hu Y, Lee Y.T, Bouchard K.R, Benechet A, Khanna K, Cauley L.S.** 2014. Lung-resident memory CD8 T cells (TRM) are indispensable for optimal cross-protection against pulmonary virus infection. *J Leukoc Biol.* 95: 215-224.
- Xiao Z, Casey K. A, Jameson SC, Curtsinger JM, Mescher MF.** 2009. Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. *J Immunol.* 182: 2786-2794.
- Yang B, Jeang J, Yang A, Wu T.C, Hung C.F.** 2014. DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother.* 10: 3153-3164.
- Yang S, Liu F, Wang Q.J, Rosenberg S.A, Morgan R.A.** 2011. The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PLoS One* 6: e22560.
- Zaid A, Mackay L.K, Rahimpour, Braun A, Veldhoen M, Carbone F.R, Manton J.H, Heath W.R, Mueller S.N.** 2014. Persistence of skin-resident memory T cells within an epidermal niche. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111: 5307-5312.
- Zhang N, Bevan M.J.** 2011. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 35: 161-168.