

## Influencia de las vías de inmunización mucosales sobre la protección contra herpes simple tipo 2 con el AFCo1 como adyuvante

Osmir Cabrera,<sup>1\*</sup> Maribel Cuello,<sup>1</sup> Karolina Thörn,<sup>2</sup> Madelene Lindqvist,<sup>2</sup> Miriam Lastre,<sup>1</sup> Elizabeth González,<sup>1</sup> Caridad Zayas,<sup>1</sup> Julio Balboa,<sup>1</sup> Belkis Romeo,<sup>1</sup> Ali M. Sarandi,<sup>2</sup> Oliver Pérez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Inmunología, Vicepresidencia de Investigaciones, Instituto Finlay. Calle 17 e/ 198 y 200, Reparto Atabey, Playa, A.P. 16017. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Gotemburgo, Suecia.

**email:** ocabrera@finlay.edu.cu

Las vacunas mucosales se han planteado como una estrategia prometedora para inducir protección mucosal. El virus herpes simple tipo 2 es uno de los patógenos más frecuentes en el humano transmitidos por vía sexual. Varios candidatos vacunales contra este patógeno se han evaluado, pero no han sido efectivos, por lo que aún no se cuenta con una vacuna profiláctica ni terapéutica. La gD2 es una glicoproteína recombinante y está reportada como uno de los antígenos de importancia vacunal contra este germen. Contamos con el cocleato derivado del proteoliposoma de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (AFCo1) que ha mostrado capacidades adyuvantes por varias vías de inmunización. El objetivo de este trabajo fue evaluar la protección inducida en ratones por el AFCo1-gD2, administrada por diferentes vías mucosales. Se utilizaron ratones hembras C57BL6, los cuales fueron inmunizados por vía intranasal (IN), intravaginal (IVag) o intrarrectal (IR) con AFCo1-gD2 o gD2 sola. Se determinó la IgG anti gD2, la proliferación celular específica, la replicación viral en lavado vaginal, los signos de la enfermedad y la protección frente al reto viral. Se obtuvo respuestas significativas de IgG anti gD2 por todas las vías, aunque la IN mostró los valores más elevados. Se observó proliferación celular en células de animales inmunizados IN e IVag, pero no por vía IR. Se observó la mayor protección (100%) en los animales inmunizados por vía IN. Se concluye que la vía nasal es la más prometedora en la inducción de protección contra este reto viral.

**Palabras clave:** Herpes, HSV, AFCo1, gD2, adyuvantes.

### Introducción

El virus herpes simple (VHS) tipo 1 y 2 causa infecciones orales, oculares y genitales que permanecen como un significativo problema de salud en el mundo (1, 2, 3). Como la incidencia de infecciones por herpes continúa en incremento, la aparición en la población de nuevas cepas del virus resistente a la quimioterapia ha hecho necesaria la búsqueda de una vacuna eficaz.

Se han desarrollado candidatos vacunales contra el VHS utilizando virus inactivados, virus atenuado, liberación de péptidos (4, 5) y proteínas, siendo las glicoproteínas de la envoltura viral B y D (gB, gD) las de resultados más promisorios (6). Sin embargo, los ensayos clínicos basados en inmunización intramuscular con gB o gD, en presencia de ASO4 o MF59, como adyuvantes, mostraron resultados con una protección limitada (5,6). No obstante, todas ellas han sido parenterales.

Los adyuvantes son sustancias que incrementan la respuesta inmune específica contra antígenos, estimulando la inmunidad innata. Ellos son decisivos en la formulación de vacunas ya que: disminuyen las dosis requeridas; polarizan el patrón de la respuesta inmune; incrementan la velocidad y memoria de

la respuesta inmune; aumentan la efectividad de las vacunas en edades extremas y en sujetos inmunocomprometidos y funcionan cuando son administrados por diferentes vías (7).

El uso de adyuvantes que permitan manipular la interacción de los antígenos con el sistema inmune constituye una alternativa para resolver el problema de las vacunas. Sin embargo, la poca disponibilidad de los mismos ha limitado considerablemente el desarrollo de nuevas vacunas efectivas.

Los conocimientos recientes acumulados sobre los mecanismos de activación del sistema inmune han revolucionado drásticamente las investigaciones en el campo de los adyuvantes. Estos mecanismos sugieren la utilización de activadores del sistema inmune, como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como una alternativa para el desarrollo de adyuvantes. Teniendo en cuenta que gran cantidad de PAMPs se encuentran principalmente en la superficie de los microorganismos patógenos, las membranas bacterianas pudieran constituir una fuente importante de productos con elevada capacidad adyuvante (8).

Por consiguiente, consideramos promisorios los resultados del proteoliposoma (PL) obtenido de la membrana externa

\* Lic. en Química. DrC Químicas. Investigador Auxiliar.

de *Neisseria meningitidis* serogrupo B. Adicionalmente, transformamos el PL en cocleato (AFCo1), manteniendo la composición del AFPL1, pero variando su tamaño de nanopartícula a micropartícula. Estos también inducen *in vivo* respuesta T-citotóxica (CTL) (7).

Por ello, nos propusimos comparar la acción del adyuvante AFCo1 sobre la gD2 por diferentes vías de inmunización: intranasal (IN), intravaginal (IVag) o intrarrectal (IR), en ratones C57BL/6, mediante la evaluación de la respuesta inmunológica con pruebas *in vitro* y *ex vivo* y su acción protectora frente al reto viral.

## Materiales y Métodos

**Obtención del AFCo1 con la gD2 incorporada.** Los procesos de obtención del AFCo1 y la incorporación de gD2 como antígeno no relacionado, fueron llevados a cabo en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Gotemburgo, Suecia, según del Campo y col. (9).

El PL (1 mg/mL) fue resuspendido en amortiguador de Tris-EDTA-deoxicolato de sodio a 30 mM, 10 mM y 1,5%, respectivamente. El AFCo1 se obtuvo por medio de un proceso de diálisis, donde se intercambió deoxicolato de sodio por  $\text{Ca}^{2+}$ ; se utilizó como amortiguador una solución que contenía Tris-NaCl- $\text{CaCl}_2$  a 30 mM, 100 mM y 5 mM, respectivamente, y un pH 7,4. Para la incorporación del antígeno en la estructura del AFCo1, la gD2 fue adicionada a una concentración de 0,5 mg/mL a la solución inicial de PL y la mezcla fue procesada igual que para la obtención del AFCo1. La incorporación de gD2 en el AFCo1 fue verificada por SDS-PAGE con la presencia de la banda proteica característica de esta proteína y la eficiencia de incorporación fue determinada calculando la concentración de gD2 en el sobrenadante y en el cocleato por el método de determinación de proteínas de Lowry.

**Inmunización.** Se inmunizaron grupos de 7 ratones hembras C57BL/6, de 6 a 8 semanas de nacidos (Taconic M&B, Denmark), con tres dosis de AFCo1-gD2, por vía IN de 5  $\mu\text{g}$  de gD2 contenidas en 15  $\mu\text{g}$  de AFCo1, IVag e IR con 10  $\mu\text{g}$  de gD2 en 30  $\mu\text{g}$  de AFCo1, con siete días de intervalo.

**Detección de IgG anti gD2 por ELISA.** Los anticuerpos se midieron en un ELISA de captura en placas de 96 pocillos (Maxisorp Nunc Immuno plate, Nunc, Roskilde, Denmark) usando kits de BD (Pharmingen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se adicionó a cada pocillo de la placa 100  $\mu\text{L}$  de gD2 (3 mg/mL) en 0,05 M de tampón carbonato a pH 9,6 y se incubó 4 h a temperatura ambiente; posteriormente, se dejó a 4 °C toda la noche. Al día siguiente las placas fueron bloqueadas con BSA al 2% en solución salina tamponada con fosfato (SSTF) 30 min a 37 °C. Diluciones seriadas de las muestras, comenzando con una dilución de 1/100, se adicionaron e incubaron por 1 h a 37 °C.

Después de lavar con 0,05% de Tween 20 en SSTF; se adicionó 100  $\mu\text{L}$  del conjugado anti IgG en cada pocillo y se incubó la placa 1 h a 37 °C. Posteriormente, las placas fueron lavadas con 0,05% de Tween 20 en SSTF y se adicionó a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de 1 mg/mL de 1,2 fenilendiamina en tampón citrato a 0,1 M pH 4,5 en presencia de 0,04% de peróxido de hidrógeno. La absorbancia fue leída a 450 nm y los títulos de IgG fueron definidos como la mayor dilución de la muestra, con la que se obtuvo una densidad óptica superior a 0,4 sobre el valor del fondo de la placa.

**Proliferación.** Se purificaron las células de bazo de ganglios linfáticos genitales (LN<sub>g</sub>), cervicales (LN<sub>c</sub>) y mediastínico (LM<sub>e</sub>) de dos animales por cada grupo inmunizado, tres semanas después de la última inmunización. Se maceraron los órganos con SSTF sobre un filtro y se centrifugó a 1600 g, luego se lavaron tres veces con SSTF frío y se resuspendieron en medio completo de Iscove. Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad mediante tinción de exclusión con Tripán azul. Las células aisladas se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células/mL. En una placa estéril de 96 pocillos (Nunc) se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular ( $2 \times 10^6$  células), más 2 mg/mL de gD2 por pozo y se completó el pozo hasta 250  $\mu\text{L}$  con SSTF. Para medir la proliferación de los linfocitos, después de las 96 h se adicionó a cada pozo de las placas 1 mCi de timidina tritiada [ $^3\text{H}$ ] (Amersham, Pharmacia) diluida en medio completo de Iscove y las mismas se incubaron por 6 h. Las células se cosecharon sobre filtro de fibras de cristal y se evaluaron por conteo con líquido de centelleo en un equipo cosechador de células con lector acoplado (Harvester 96<sup>®</sup> Mach III, TOMTEC). Los resultados se expresaron en conteo por min (CPM) (10).

**Virus.** La Cepa 333 del VHS-2 (11, 12) se sembró y tituló en monocapas con células de riñón de monos verdes (GMK-AH1); se preparó por ciclos de congelación y descongelación, seguido de una centrifugación, y se desechó el precipitado celular.

**Reto vaginal con VHS-2.** Cinco de los siete ratones hembras C57BL/6 se inyectaron subcutáneamente 24 días después de la última dosis con 3 mg de Depo-Provera (DP) (Pharmacia) en SSTF, para sincronizar el ciclo menstrual, y 6 días después los ratones se anestesiaron con isoflourano (Baxter Medical AB) y retaron por administración IVag con  $9 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias del virus en 10  $\mu\text{L}$  de solución de medio Hanks balanceado.

**Replicación viral vaginal.** Tres días posteriores al reto vaginal con el virus, los fluidos vaginales se colectaron por pipeteo de 40  $\mu\text{L}$  de medio Hank's balanceado, dentro y fuera de la vagina, hasta que se obtuvo una discreta masa del mucus. Los lavados se centrifugaron para clarificarlos y guardarlos a -70 °C hasta su utilización. Los títulos de VHS-2 se determinaron por cultivos en placas con células GMK-AH1.

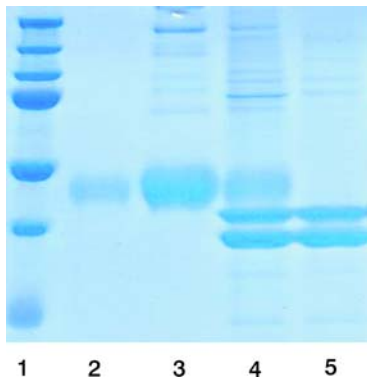
**Inflamación y enfermedad.** Los ratones se examinaron diariamente después de la infección con el virus y se observó inflamación vaginal, enfermedad neurológica y muerte. La severidad de la enfermedad fue clasificada como: sanos: 0, eritema genital: 1, inflamación genital moderada: 2, lesión genital severa y purulenta: 3, y necesidad de sacrificio debido a parálisis de la extremidades traseras: 4. Los ratones se mantuvieron bajo supervisión por 15 días después del reto viral.

**Análisis estadístico.** La significación estadística de la varianza entre los grupos en estudio se realizó aplicando un ANOVA de un factor seguido de un estudio de comparaciones múltiples de Tukey, mediante el programa GraphPad Prism 4 (CA, USA). Se consideró que había diferencia significativa para una  $p < 0,05$ . Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos realizados en días diferentes.

## Resultados

### Determinación del por ciento de incorporación de gD2 en el AFCo1

Se muestra el SDS PAGE (Fig. 1), donde se pudo detectar la presencia de la gD2 en la estructura coclear (columna 4), la cual fue corroborada con una inmunotransferencia con anticuerpos específicos. Se determinó por Lowry un 85% de incorporación de gD2 en el AFCo1.

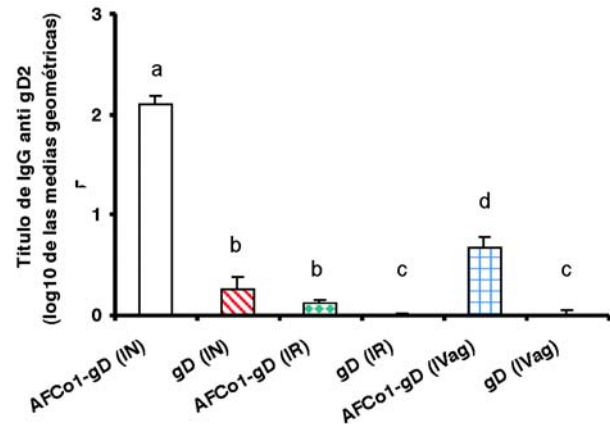


**Figura 1.** SDS PAGE que muestra la incorporación de la gD2 dentro de la estructura coclear: 1, Patrón de peso molecular; 2, gD2 en el sobrenadante del AFCo1-gD2; 3, gD2 nativa; 4, AFCo1-gD2 y 5, AFCo1.

### IgG inducido por AFCo1-gD2 administrada por diferentes vías

Se obtuvo respuestas significativas de IgG anti gD2 por todas las vías 21 días después de la última dosis, aunque la IN mostró valores significativamente más elevados ( $p < 0,05$ ) que el resto de las vías empleadas. La administración de la gD2 con el adyuvante (AFCo1-gD2) indujo títulos significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a los inducidos por la

gD2 sola o con el grupo control negativo en todas las vías utilizadas (IN, IR e IVag). Por consiguiente, podemos plantear que el AFCo1 mostró un fuerte efecto adyuvante sobre la respuesta inducida contra la gD2 (Fig. 2).



**Figura 2.** Títulos de IgG anti gD2 determinados por ELISA 21 días después de la última dosis (día 35) en suero de ratones C57BL/6 inoculados por diferentes vías mucosales. La IgG fue determinada en el suero de los 7 animales de cada grupo en estudio. Letras diferentes significan que hay diferencias significativas entre los grupos: IN: intranasal; IR: intrarrectal e IVag: intravaginal.

### Proliferación celular

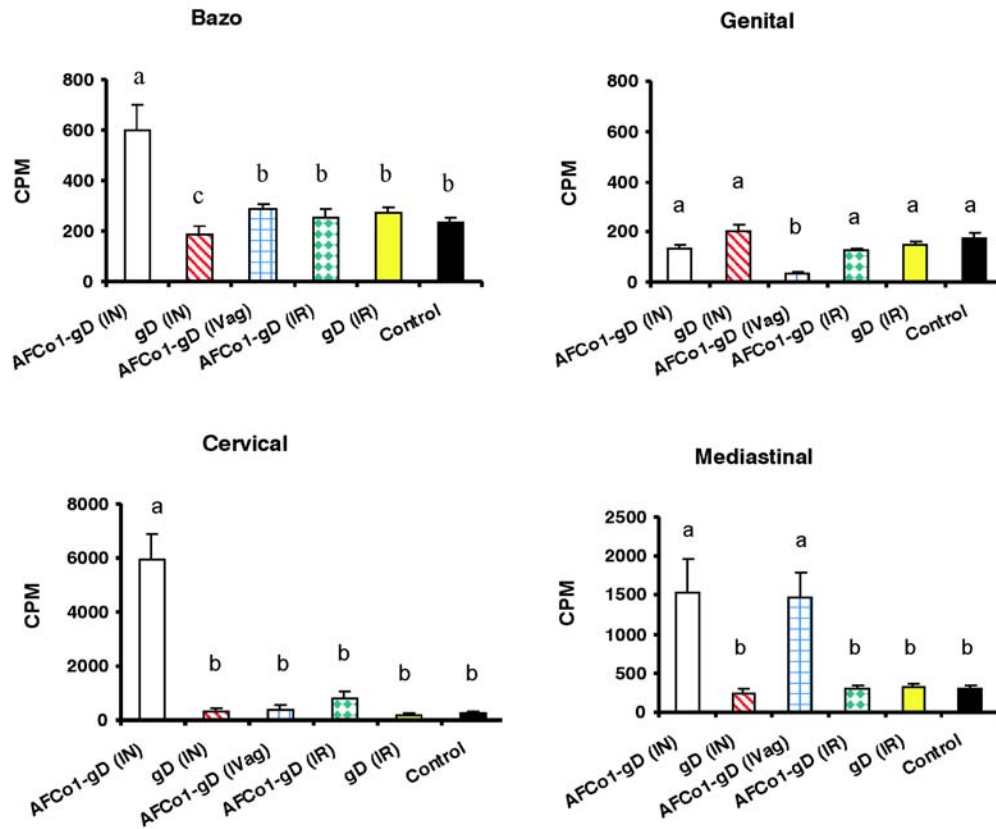
Se observó proliferación celular anti gD2, tanto en células de bazo como en células de ganglios cervicales, solo en ratones inmunizados por vía IN con AFCo1-gD2. También se observó valores significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) en las células de ganglios del mediastino en ratones inmunizados por vía IN o IVag con AFCo1-gD2, sin diferencias significativas entre estos dos grupos (Fig. 3).

### Replicación viral

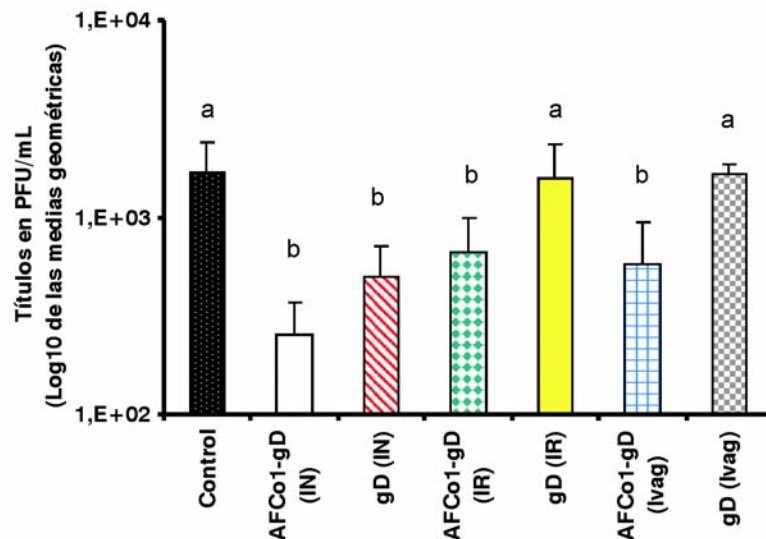
En los grupos inmunizados con AFCo1-gD2 independiente de la vía, la replicación viral fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que en el grupo control. El menor valor de replicación viral se obtuvo en los grupos inmunizados con AFCo1-gD2 por vía IN. En los grupos inmunizados con la gD2 sola por vía IN se obtuvieron valores significativamente menores que el control ( $p < 0,05$ ) y no ocurrió de la misma manera cuando se aplicó por las otras vías (Fig. 4).

### Signos de la enfermedad viral después del reto

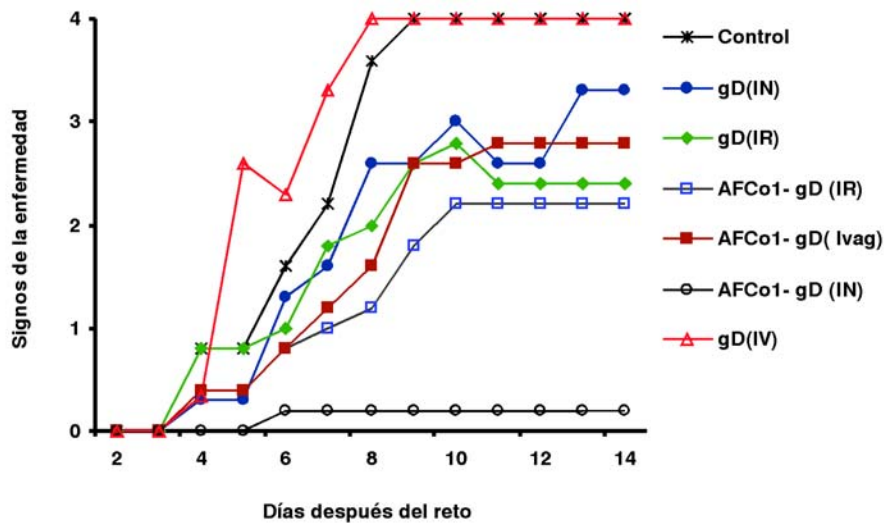
En los grupos donde se utilizó la vía IN, los animales inmunizados con AFCo1-gD2 no manifestaron signos de la enfermedad. Todos los demás grupos inoculados con AFCo1-gD2 o con gD2 sola, se comportaron similares al grupo control y desarrollaron signos severos de la enfermedad viral (Fig. 5).



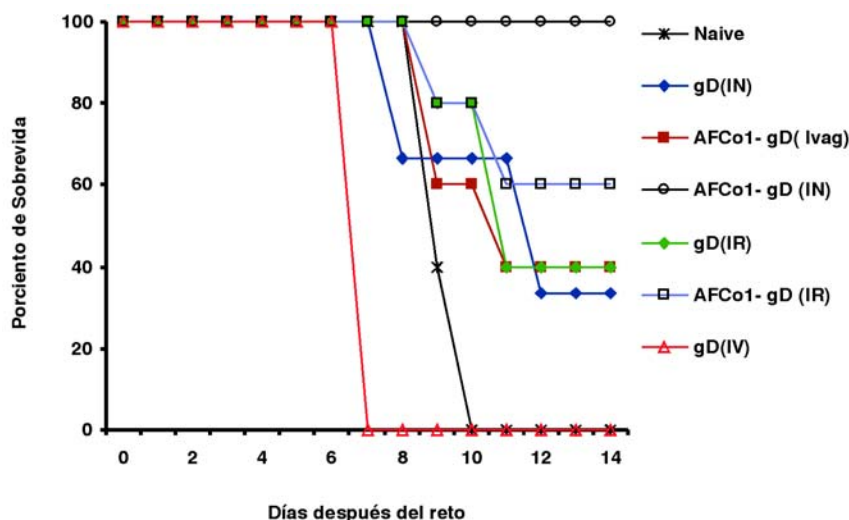
**Figura 3.** Proliferación celular en células obtenidas de bazo, ganglio genital, ganglio cervical o ganglio mediastinal de ratones hembras C57BL/6, inoculados por diferentes vías mucosales con gD2 o AFCo1-gD2 o de animales controles no inoculados. Las células se obtuvieron del bazo y los ganglios de dos animales de cada grupo en estudio y fueron estimuladas in vitro con gD2. Letras diferentes significan que hay diferencias significativas entre los grupos. IN: intranasal; IR: intrarrectal e IVag: intravaginal.



**Figura 4.** Cuantificación de la replicación viral en lavados vaginales tres días después del reto con la cepa 333 del virus herpes simple tipo dos en ratones C57BL/6 inoculados por diferentes vías mucosales con gD2 o AFCo1-gD2. Para este estudio fueron utilizados cinco animales de cada grupo. Letras diferentes significan que hay diferencias significativas entre los grupos. IN: intranasal; IR: intrarrectal e IVag: intravaginal.



**Figura 5.** Signos de la enfermedad en los cinco animales retados con la cepa 333 de VHS-2 e inoculados previamente con gD2 o AFCo1-gD2 por diferentes vías mucosales: 0, sanos; 1, eritema genital; 2, inflamación genital moderada; 3, lesión genital severa y purulenta y 4, parálisis de las extremidades traseras.



**Figura 6.** Protección de los cinco animales retados con la cepa 333 de VHS-2 e inoculados previamente con gD2 o AFCo1-gD2 por diferentes vías mucosales.

**Protección frente al reto vaginal con HSV-2.** Se observó protección en el 60% de los animales inmunizados por vía IR, 40% en los inmunizados IVag y del 100% por vía IN con AFCo1-gD2 y solo un 20% con la gD2 (Fig. 6).

## Discusión

La transformación del AFPL1 en AFCo1 se realizó por dos motivos fundamentales: incrementar la estabilidad del PL y poder ser utilizado en inmunizaciones mucosales, manteniendo la misma composición de proteínas y PAMPs.

Este AFCo1 se utilizó en trabajos previos (7,13,14) por vía IM o IN induciendo alta respuesta de IgG anti PL comparables a la obtenida con el AFPL1; aunque por vía IN la respuesta de

IgA anti PL en saliva obtenida con el AFCo1 fue superior a la obtenida con el AFPL1; además de observarse un patrón de respuesta inmune, preferencialmente tipo Th1, con presencia de INF $\gamma$ , IL12 y respuesta CTL inducida por el AFCo1 contra OVA (7).

En este trabajo quedó demostrado que la vía nasal confirió protección total en comparación con las IVag que solo protegió en un 60% y la IR que fue de 40%.

Estos resultados son comparables con los obtenidos por del Campo J y cols. (9), quienes inocularon AFCo1-gD2 y AFPL1-gD2 por vía IN y obtuvieron un 100% de protección con el AFCo1-gD2. También estos resultados en su conjunto confirmaron la capacidad adyuvante del AFCo1 para

antígenos no relacionados con el PL, así como la protección que es capaz de inducir la inmunización por vía nasal contra el HSV-2.

Belyakov IM y cols. (15) publicaron una revisión, donde analizaron la importancia de la ruta de inmunización en la generación de inmunidad protectora contra patógenos mucosales. En esta revisión los autores plantean que diferentes vías de inmunización mucosales pueden inducir respuesta inmune mucosal no solamente en el portal de entrada de agentes infecciosos, sino también en sitios efectores de la mucosa distante, aunque restricciones adicionales en la compartimentalización de la mucosa son dependientes del adyuvante y del sistema de liberación del antígeno. Esto pudiera explicar por qué obtuvimos un 100% de protección cuando administramos el AFCo1-gD2 por vía IN contra un patógeno cuya puerta de entrada es la vagina.

Recientemente, Mohammad J y cols. (16) administraron vacunas de DNA por rutas IM o subcutánea (SC) y demostraron que por la vía SC indujo una potente respuesta celular, producción de IL-2 y una fuerte actividad CTL, mientras que por vía IM se observó la inducción de mayores títulos de anticuerpos neutralizantes que por la SC.

Por otra parte, Stanberry LR (5) publicó en el 2004 una revisión sobre los ensayos clínicos con candidatos vacunales profilácticos y terapéuticos contra VHS-2 y dentro de estos analizó los resultados obtenidos por la Chiron y Glaxo Smith Kline en estudios clínicos con candidatos vacunales conteniendo las glicoproteínas B y D de VHS-2 con MF59 como adyuvante y gD2 con ASO4 como adyuvante, respectivamente. Ambos candidatos vacunales (gB2-gD2-MF59 y gD2-ASO4) fueron administrados intramuscularmente a voluntarios y los resultados obtenidos mostraron una eficacia parcial del candidato de Glaxo Smith Kline (gD2-ASO4), mientras que el candidato vacunal de la Chiron (gB2-gD2-MF59) no fue efectiva.

Se sugiere que los resultados alcanzados con esos candidatos vacunales pudieran depender del adyuvante utilizado y del tipo de respuesta que se logre y sugiere que debe investigarse más sobre la respuesta celular y mucosal de candidatos vacunales contra este patógeno.

Se ha reportado que para las bacterias y algunos virus que tienen como puerta de entrada las mucosas, la mejor ruta de administración para vacunas es la mucosal y de acuerdo con las características del antígeno serían necesarios procedimientos de unión o recubrimiento con ligandos específicos que envíen el antígeno a las células M. La eficacia para antígenos mucosales se logra mediante estrategias que ayuden a que el antígeno pueda cruzar las barreras que la propia ruta impone (15, 17).

Este estudio demostró la eficacia del AFCo1 como adyuvante de la proteína gD2 para la vía nasal contra el HSV-2. Los

grupos vacunados con AFCo1-gD2 mostraron un 100% de inmunidad protectora contra el reto con el herpes genital en ratones.

## Referencias

1. Cooper D, Mester JC, Guo M, Nasar F, SouzaV, Dispoto S, et al. Epitope mapping of full-length glycoprotein D from HSV-2 reveals a novel CD4+ CTL epitope located at the transmembrane-cytoplasmic junction. *Cell Immunol* 2006;239:113-20.
2. Whitley RJ. Herpes simplex virus infection. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002;13(1):6-11.
3. Hagan DO, Goldbeck C, Ugozzoli M, Ott G, Burke RL. Intranasal immunization with recombinant gD2 reduces disease severity and mortality following genital challenge with herpes simplex type 2 in guinea pigs. *Vaccine* 1999;17:2229-36.
4. Roizman B, Knipe DM. Herpes simplex viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001. p. 2399-459.
5. Stanberry LR. Clinical trials of prophylactic and therapeutic Herpes Simplex Virus vaccine. *HERPES* 2004;11(Suppl 3):161A-169A.
6. Koelle DM, Corey L. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(1):96-113.
7. Pérez O, Lastre M, Cabrera O, del Campo J, Bracho G, Cuello M. New Vaccines Require Potent Adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scandinavian Journal of Immunology* 2007;66:271-7.
8. O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev* 2003;2:727-35.
9. Del Campo J, Lindqvist M, Cuello M, Bäckström M, Cabrera O, Persson J. Intranasal immunization with a proteoliposome-derived cochleate containing recombinant gD protein confers protective immunity against genital herpes in mice. *Vaccine* 2010;28:1193-200.
10. Harandi AM, Eriksson K, Holmgren J. A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in a mouse model of genital herpes infection. *J Virol* 2003;77: 953-62.
11. Tengvall S, Josefsson A, Holmgren J, Harandi A M. CpG oligodeoxynucleotide augments HSV-2 glycoprotein D DNA vaccine efficacy to generate T helper 1 response and subsequent protection against primary genital herpes infection in mice. *Journal of Reproductive Immunology* 2005;68:53-69.
12. Tengvall S, Lundqvist A, Eisenberg RJ, Cohen GH, and Harandi AM. Mucosal Administration of CpG Oligodeoxynucleotide Elicits Strong CC and CXC Chemokine Responses in the Vagina and Serves as a Potent Th1-Tilting Adjuvant for Recombinant gD2 Protein Vaccination against Genital Herpes. *Journal of Virology* 2006;80:5283-91.
13. Cuello M, Cabrera O, Acevedo R, Núñez N, del Campo J, Lastre M. Nasal immunization with AFCo1 induces immune response to *N. gonorrhoea* in mice. *Vacimonitor* 2009;18(2):78-80.

14. Del Campo J, Zayas C, Romeu B, Acevedo R, González E, Bracho G. Mucosal immunization using proteoliposome and cochleate structures from *Neisseria meningitidis* serogroup B induce mucosal and systemic responses. *Methods* 2009;49(4):301-8.
15. Belyakov IM and Ahlers JD. What Role Does the Route of Immunization Play in the Generation of Protective Immunity against Mucosal? *J Immunol* 2009;183:6883-92.
16. Mohammad J, Hoorieh S, Fatemeh F, Pakravan N. Comparison of intramuscular and footpad subcutaneous Immunization with DNA vaccine encoding HSV-gD2 in mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2009; 32(5):453-61.
17. Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR. *Immunology Mucosal*. 2da ed. London: Academia Press; 1999.

---

## **Influence of mucosal immunization routes on herpes simplex virus type 2 protection with AFCo1 as adjuvant**

### **Abstract**

Mucosal vaccines are a promising strategy to induce mucosal protection. Herpes simplex virus type 2 is the commonest pathogens in the human transmitted by exposure at the genital mucosal surfaces. Many vaccine candidates against this pathogen have been evaluated; but they have not been effective, and neither a prophylactic nor a therapeutic vaccine has been yet obtained. The gD2 is a recombinant glycoprotein and it is reported as one of the antigens of importance for vaccine against this virus. There is the cochleate (AFCo1) derived from proteoliposome of *Neisseria meningitidis* serogroup B. This cochleate has shown potentialities as adjuvant for several immunization routes. The objective of this study was to evaluate the protection induced in mice by the AFCo1-gD2 administered by different mucosal routes. Female mice C57BL/6 were used and immunized by: intranasal (IN), intravaginal (IVag), or intrarectal (IR) routes with AFCo1-gD2 or gD2 alone. The anti-gD2 IgG and specific cellular proliferation were determined and the viral replication in vaginal wash, the signs of disease and the protection against the viral challenge, were measured too. A significant anti-gD2 IgG response was obtained by all routes, although the IN route showed the highest values. Cellular proliferation was observed in cells of animals immunized IN and IVag route; but not by IR route. In addition, a higher protection (100%) in the animals immunized with AFCo1-gD2 by IN route was observed. In conclusion the intranasal is the most promising route in the protection induction against this viral challenge.

**Keywords:** Herpes, HSV, AFCo1, gD2, adjuvants.

---

*Recibido: Abril de 2011*

*Aceptado: Mayo de 2011*