



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,  
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

FACULTAD DE BIOCIENCIAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
BARCELONA

# **PAPEL DE LAS CÉLULAS INMUNES RESIDENTES EN LA MUCOSA CERVICOVAGINAL ANTE LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL**

Tesis doctoral presentada por Jon Cantero Pérez para optar al título  
de Doctor en Inmunología por la Universidad Autónoma de Barcelona

Meritxell Genescà Ferrer

Directora

Francesc E. Borràs

Tutor

Jon Cantero Pérez

Doctorando

Barcelona, Agosto de 2019





*Nunca olvides quién te ayudó,  
quién estuvo contigo,  
quién te enseñó.*

*No dejes que nadie, al pasar,  
te mire a los ojos,  
tú debes mandar.*

*Pop, La Oreja de Van Gogh*



# ÍNDICE

---

Listado de abreviaturas más utilizadas en el texto .....	11
Introducción .....	14
1. La inmunología de la mucosa genital femenina .....	16
1.1. Inmunidad innata .....	16
1.1.1. Células mieloides.....	16
1.1.1.a) Células dendríticas (DCs).....	16
1.1.1.b) Macrófagos .....	17
1.1.2. Células <i>natural killer</i> (NK).....	17
1.1.3. Células T no convencionales .....	18
1.1.3.a) Linfocitos T- $\gamma\delta$ .....	18
1.1.3.b) Células T invariantes asociadas a mucosa (MAIT).....	18
1.1.3.c) Células T <i>natural killer</i> (NKT) .....	18
1.2. Inmunidad adaptativa .....	19
1.2.1. Linfocitos B y respuesta humoral .....	19
1.2.2. Linfocitos T .....	19
1.2.2.a) Linfocitos T de memoria residente ( $T_{RM}$ ).....	20
2. Las infecciones de transmisión sexual .....	21
2.1. Clamidia .....	22
2.1.1. Biología de la bacteria .....	23
2.1.2. Papel del sistema inmune en la infección por clamidia .....	24
2.1.3. La infección por clamidia en el tracto genital femenino .....	26
2.2. Virus de la inmunodeficiencia humana .....	27
2.2.1. Biología del virus .....	27
2.2.2. Un ejemplo del doble papel del sistema inmune en la infección por VIH: las células dendríticas.....	28
2.2.3. Respuesta del sistema inmune a la infección por VIH .....	29

2.2.3.a) Inmunidad innata .....	29
2.2.3.b) Inmunidad adaptativa .....	30
2.2.4. Reservorios virales .....	31
2.2.5. La infección por VIH en el tracto genital femenino.....	32
2.2.5.a) Endocérvix y tracto genital femenino (TGF) superior .....	33
2.2.5.b) Ectocérvix y TGF inferior .....	33
3. Vacunas contra ITS y adyuvantes .....	34
3.1. Peculiaridades de la inmunidad en la mucosa y necesidad de adyuvantes.....	34
3.2. Antígenos lipídicos y células iNKT .....	35
3.3. $\alpha$ GC como adyuvante, necesidad de nuevos glicolípidos .....	36
4. El modelo de explante cervical para el estudio de las ITS: pros, contras y otras consideraciones.....	37
Hipótesis y objetivos .....	40
Materiales y métodos .....	44
1. <i>Screening</i> inicial de compuestos .....	46
1.1. ELISA en líneas celulares (iNKT).....	46
1.2. ELISPOT .....	46
1.3. Co-cultivo iNKT – HeLa + ELISA.....	46
1.3.1. Aislamiento de iNKT primarias .....	47
1.3.1.a) Ficoll a partir de residuo leucocitario.....	47
1.3.1.b) Contaje de los PBMC obtenidos.....	47
1.3.1.c) Determinación de la frecuencia de iNKT del donante .....	48
1.3.1.d) Purificación de las iNKT mediante <i>microbeads</i> magnéticas .....	48
1.3.1.e) Determinación de la pureza y número de iNKTs aisladas.....	49
1.3.2. Co-cultivo de células HeLa e iNKTs.....	49
1.3.3. Cultivo de células HeLa.....	50
1.3.3.a) Siembra de células HeLa a partir de un vial congelado.....	50
1.3.3.b) Tripsinización .....	51

1.3.3.c) Congelación de las células .....	51
1.3.4. ELISA del sobrenadante.....	51
2. Circuito de recogida de muestras y consentimiento informado.....	52
3. Puesta a punto del cultivo del tejido.....	52
3.1. Tipo de placa, tiempo de cultivo, necesidad de una matriz externa de colágeno.....	52
4. Adición de diferentes glicolípidos: estrategias de <i>delivery</i> .....	53
5. Digestión del tejido .....	53
6. Citometría de flujo .....	54
6.1. Marcaje de superficie.....	54
6.2. Marcaje intracelular .....	54
7. Medida de citocinas en el sobrenadante .....	55
7.1. ELISA.....	55
7.2. Luminex.....	55
8. Generación de un <i>stock</i> infeccioso de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	55
8.1. Infección de células HeLa .....	56
8.2. Purificación de los EBs.....	56
8.3. Titulación del <i>stock</i> por inmunofluorescencia .....	56
9. Infección del tejido con <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	57
9.1. Pruebas iniciales ( <i>shaker/esponja/eppendorf</i> ) .....	57
9.2. Protocolo estandarizado .....	58
10. Inmunofluorescencia del tejido infectado .....	58
10.1. Inmunofluorescencia convencional .....	58
10.2. <i>Cytospin</i> .....	59
11. Infección del tejido con VIH .....	59
12. Migración de células infectadas fuera del tejido ( <i>transwell</i> ).....	60
13. Cuantificación del ADN viral asociado a célula mediante PCR cuantitativa (qPCR).....	60
14. Ensayo de ADN proviral intacto (IPDA) .....	60

15. Hibridación <i>in situ</i> de ARN viral e inmunohistoquímica del tejido cervical .....	61
16. Recetas de los <i>buffers</i> y medios de cultivo .....	62
Resultados .....	64
Capítulo 0: Puesta a punto del modelo de explante cervicovaginal .....	66
1. Antecedentes y objetivo .....	68
2. Modelo de cultivo .....	68
3. Digestión del tejido y citometría .....	69
Capítulo 1: Efecto de los derivados de la $\alpha$ GC frente a las infecciones de transmisión sexual .....	74
1. Antecedentes y objetivo .....	76
2. <i>Screening</i> inicial de los compuestos .....	76
2.1. ELISA en líneas celulares de iNKT .....	76
2.2. ELISPOT en donantes sanos.....	76
2.3. Co-cultivo de células HeLa-CD1d <sup>high</sup> y células iNKT primarias: ELISA y Luminex .....	77
3. Efecto de los glicolípidos en el tejido cervicovaginal .....	81
3.a) Estrategias de distribución ( <i>delivery</i> ) .....	81
3.b) Secreción de citocinas al medio (ELISA sensible) .....	83
3.c) Fenotipo adyuvante .....	85
3.d) Tinción intracelular de citocinas (ICS) .....	89
4. Infección del tejido con <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	90
4.1. Generación de un stock infeccioso de <i>Chlamydia trachomatis</i> y titulación .....	90
4.2. Detección de la infección .....	91
4.3. Efecto de los glicolípidos en la infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	95
5. Infección del tejido con VIH .....	97
5.1. Efecto de los glicolípidos en la infección del tejido con VIH .....	98
Capítulo 2: Células T de memoria residentes (T <sub>RM</sub> ) en el tejido cervical como reservorios del VIH .....	102
1. Antecedentes y objetivos .....	104

2. Caracterización y fenotipado .....	104
3. Infección <i>ex vivo</i> .....	109
4. Efecto del virus sobre las células T <sub>RM</sub> de mujeres VIH <sup>+</sup> .....	114
5. Reservorio en cérvix vs sangre: contribución de cada subpoblación.....	116
6. Las células CD4 <sup>+</sup> /- T <sub>RM</sub> contienen genomas intactos del VIH.....	119
7. Localización de células ARN-VIH <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> en la mucosa cervicovaginal ( <i>RNA scope</i> ).....	119
Discusión .....	124
1. Infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	126
1.1. Efecto de los glicolípidos sobre las células inmunitarias del tracto genital femenino .....	127
1.2. Efecto de los glicolípidos en la infección por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	130
1.3. Efecto de los glicolípidos en la infección por VIH.....	132
2. Células T de memoria residentes (T <sub>RM</sub> ) en el tejido cervical como reservorios del VIH ...	132
Conclusiones .....	138
Anexos.....	144
Tabla anexa 1: Datos clínicos de las pacientes VIH <sup>+</sup> incluidas en este estudio .....	145
Tabla anexa 2: Anticuerpos utilizados.....	147
Tabla anexa 3: Número de células recuperadas en los experimentos de <i>sorting</i> .....	151
Agradecimientos .....	154
Bibliografía .....	162

## Listado de abreviaturas más utilizadas en el texto

Tracto genital femenino .....	TGF
Célula presentadora de antígeno .....	<i>del inglés</i> APC
Virus de la inmunodeficiencia humana .....	VIH
Célula dendrítica .....	<i>del inglés</i> DC
Lipopolisacárido .....	LPS
Interleuquina.....	IL
<i>Tumor necrosis factor</i> .....	TNF
Interferón .....	IFN
Células <i>natural killer</i> .....	<i>del inglés</i> NK
Receptor de célula T.....	<i>del inglés</i> TCR
Células T de memoria residentes .....	<i>del inglés</i> T <sub>RM</sub>
Infecciones de transmisión sexual .....	ITS
Virus del papiloma humano .....	VPH
Tratamiento antirretroviral.....	TAR
<i>Toll-like receptors</i> .....	TLR
Virus de la inmunodeficiencia simia.....	<i>del inglés</i> SIV
<i>Invariant Natural Killer T cells</i> .....	<i>del inglés</i> iNKT
$\alpha$ -GalactosilCeramida .....	$\alpha$ GC
Células de sangre periférica .....	<i>del inglés</i> PBMC
Temperatura ambiente .....	<i>del inglés</i> RT





## **Introducción**



## 1. La inmunología de la mucosa genital femenina

La mucosa supone la primera barrera defensiva frente a la entrada de patógenos, ya que la integridad de su epitelio asegura una impermeabilidad contra los microorganismos externos. Por su parte, el sistema inmune también cuenta con emisarios en este tejido, responsables de la vigilancia y de una rápida respuesta frente a los agentes infecciosos que logran adentrarse en él. En el siguiente apartado se describen las diversas poblaciones inmunes presentes en la mucosa del tracto genital femenino, divididas en base a su pertenencia a la respuesta inmune innata o adaptativa.

### 1.1. Inmunidad innata

#### 1.1.1. Células mieloides

Gran parte de las células hematopoyéticas presentes en la mucosa del tracto genital femenino (TGF) son CD14<sup>+</sup>, lo que las identifica como células de linaje mieloides<sup>1</sup>. Dentro de ellas distinguimos fundamentalmente las CD11c<sup>+</sup> (asociadas a un fenotipo de célula dendrítica intersticial o derivada de monocito) y las CD11c<sup>dim/-</sup> (que podrían asociarse a un fenotipo de macrófago). A su vez, en este tejido también se localizan células mieloides CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup>, que generalmente se identifican como células dendríticas clásicas<sup>1</sup>. Estas tres poblaciones se encargan de la vigilancia de la mucosa, procesando constantemente los antígenos externos que llegan para poder emitir señales de alarma al resto de células inmunes<sup>2</sup>. Todas ellas fagocitan y destruyen patógenos mediante una digestión ácida y enzimática, presentando posteriormente sus antígenos en superficie para *educar* al resto de células inmunitarias, lo que les ha valido el título de *células presentadoras de antígeno* (APC)<sup>3</sup>. Dentro de estos tres grupos también podemos identificar varias subpoblaciones mieloides que llevan a cabo funciones más específicas en la mucosa cervical, tales como las células dendríticas plasmacitoides (pDC, productoras de grandes cantidades de interferones de tipo I frente a las infecciones virales) o las células de Langerhans (quienes se encargan de hacer una vigilancia antigénica en la mucosa gracias a sus prolongaciones)<sup>4</sup>.

##### 1.1.1.a) Células dendríticas (DCs)

Las DCs están consideradas uno de los puentes que conectan la respuesta inmune adaptativa e innata. Dentro del TGF, se localizan tanto en el epitelio cervicovaginal (células de Langerhans) como en el estroma sub-epitelial del endometrio<sup>3, 5</sup>. La exposición a diferentes patógenos y estímulos inflamatorios, tales como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), provoca una maduración de estas células, aumentando su expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase II y de moléculas coestimuladoras en superficie. Una vez maduras, las DCs viajan hacia los linfonodos drenantes para inducir allí la respuesta específica de los linfocitos T frente al antígeno en cuestión<sup>6, 7</sup>. Estas DCs maduras se caracterizan por la secreción de interleuquina (IL)-12 y la expresión de CD40, CD80 o CD86, y favorecen la generación de células T con diferentes perfiles Th en base al patógeno al que haya que hacer frente<sup>5, 8</sup>. Así, su papel principal consiste en eliminar las potenciales amenazas y en dar la voz de alarma, pero

deben también generar una serie de respuestas tolerogénicas a ciertos elementos extraños, como sucede durante el desarrollo embrionario<sup>9</sup>. Todas estas funciones se encuentran reguladas por el microambiente que proporcionan las citocinas, quimiocinas y hormonas sexuales presentes en el TGF<sup>9</sup>.

#### 1.1.1.b) Macrófagos

Por su parte, los macrófagos son los fagocitos profesionales, encargados de la eliminación de *debris* tisular, del reconocimiento de patógenos y de la estimulación del sistema inmune mediante su actividad inflamatoria<sup>5</sup>. Dentro del TGF, se encuentran concentrados en su mayoría en el endometrio<sup>10</sup>, aunque también se localizan en la mucosa cervicovaginal<sup>11</sup>. Su presencia está fuertemente influenciada por las hormonas sexuales (estradiol, progesterona y estrógenos), ya que los cambios en la distribución de esta población en el TGF se han correlacionado con el ciclo menstrual<sup>12</sup>. De hecho, los macrófagos se han postulado como uno de los agentes más importantes durante la ovulación: como reguladores de la inflamación, los macrófagos ováricos secretan *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$ , interferón (IFN)- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-10, e IL-12; y facilitan la luteólisis (degeneración del cuerpo lúteo que tiene lugar cuando no se produce la implantación y que finaliza con la descamación del endometrio o menstruación) al eliminar las células apoptóticas y necróticas mediante fagocitosis. Del mismo modo, la disolución de la matriz extracelular y la activación de la cascada de proteasas gracias a las metaloproteínas de matriz provenientes de los macrófagos ováricos ayudan a la regulación de la foliculogénesis (proceso de maduración del folículo ovárico)<sup>13</sup>.

#### 1.1.2. Células natural killer (NK)

Las células *natural killer* son linfocitos de la respuesta innata con un papel esencial en la defensa contra patógenos microbianos debido a que secretan grandes cantidades de IFN- $\gamma$  y son capaces de reconocer y lisar células infectadas por virus o bacterias por diferentes vías, incluyendo la citotoxicidad mediada por anticuerpo<sup>14</sup>. Dentro del TGF, su fenotipo varía de una localización a otra. Así, en el endometrio, estas células expresan CD9, CD69 y CD94<sup>15</sup>, y su número varía a medida que avanzan tanto el ciclo menstrual como el embarazo<sup>16</sup>. Por su parte, las células NK residentes en la vagina son CD94<sup>-</sup> y CD16<sup>+</sup>, también son capaces de producir citocinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  y tienen potencial citotóxico<sup>17</sup>. Por último, cabe destacar que las células NK uterinas son, a su vez, diferentes de las que encontramos en sangre, ya que expresan CD56, CD9 y CD69 pero poco CD16. Sin embargo, como éstas, presentan actividad citolítica y son capaces de producir citocinas como IFN- $\gamma$ , factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), IL-10, IL-8 y TGF- $\beta$ <sup>12, 15</sup>. Además, también son capaces de secretar citocinas esenciales para la implantación del cigoto (factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento placentario (PLGF), angiopoyetina-2 y factor inhibidor de leucemia (LIF)), de lo que se deduce que estas células tienen también un importante papel durante el embarazo<sup>18</sup>.

### 1.1.3. Células T no convencionales

En el TGF también encontramos otras poblaciones de células T diferentes de los linfocitos T- $\alpha\beta$  clásicos que pueden agruparse bajo el *paraguas* de células T no convencionales. De forma breve, en este apartado se detalla el papel de las células T- $\gamma\delta$ , las células T invariantes asociadas a mucosa (MAIT) y las células T *natural killer*, o NKT, dentro del TGF.

#### 1.1.3.a) Linfocitos T- $\gamma\delta$

Las células T- $\gamma\delta$  son el prototipo de células T no convencionales. Se caracterizan por la expresión de las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  en su receptor de célula T (TCR), a diferencia de las clásicas  $\alpha$  y  $\beta$  de la mayoría de linfocitos T. En base al tipo de cadena delta que expresen, podemos diferenciar las T- $\gamma\delta$  1 (cadena V delta 1, son las que se encuentran fundamentalmente en las mucosas) y las T- $\gamma\delta$  2 (cadena V delta 2, son la mayoría de las T- $\gamma\delta$  que encontramos en sangre<sup>19</sup>). Estas células se asocian con una respuesta frente a virus, bacterias y protozoos, pero también tienen un papel importante en la orquestación de la respuesta inmune durante la inflamación, la vigilancia tumoral y las enfermedades autoinmunes<sup>20</sup>. Sus principales funciones son la actividad citotóxica y la secreción de sustancias antimicrobianas y factores de crecimiento<sup>21</sup>, y se ha visto que su frecuencia dentro del TGF disminuye en mujeres infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), de lo que se deduce que también tienen un rol importante en el control de esta infección<sup>22, 23</sup>.

#### 1.1.3.b) Células T invariantes asociadas a mucosa (MAIT)

Esta población de células T de naturaleza innata se caracteriza por la expresión de un TCR semi-invariante que presenta una cadena V $\alpha$ 7.2 asociada a diferentes segmentos J $\alpha$  (J $\alpha$ 33, J $\alpha$ 12 o J $\alpha$ 20), y a un repertorio limitado de cadenas V $\beta$ . Además, también expresan elevados niveles de CD161 y de la subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-18 (IL-18R $\alpha$ ), así como varios factores de transcripción clásicamente asociados a un fenotipo efector de célula T (T-bet, Eomesodermina, (Eomes))<sup>24</sup>. Las células MAIT reconocen metabolitos microbianos derivados de la vitamina B2 a través de la molécula MR1, relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I<sup>25</sup>. Una vez activadas, son capaces de secretar diferentes citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17 e IL-22, lo que denota una actividad eminentemente antimicrobiana y protectora de la integridad de la mucosa<sup>26</sup>. Su actividad dentro del TGF no se ha estudiado en detalle, pero se ha descrito que son capaces de producir IL-17 e IL-22 en respuesta a estímulos bacterianos, lo que pone de manifiesto su importancia en el mantenimiento de la barrera mucosa tanto en este compartimento<sup>24</sup> como en otras mucosas<sup>27</sup>.

#### 1.1.3.c) Células T *natural killer* (NKT)

Por último, las células NKT comparten características de los linfocitos T (como la presencia de un TCR en su superficie, capaz de reconocer antígenos, en este caso lipídicos, presentados por la molécula de clase I no clásica del MHC conocida como CD1d) y las células NK

(expresan ciertas proteínas de superficie características de este tipo celular como NK1.1 o CD161)<sup>28</sup>. Más adelante se dedica un apartado entero a estas células, por lo que aquí solamente se comentará su relevancia dentro de la inmunidad del TGF. Esta población destaca por su gran capacidad inmunomoduladora y por su rápida activación y producción de citoquinas a las pocas horas de ser activadas<sup>29</sup>. Además, estas células constituyen un puente natural entre la inmunidad innata y adaptativa, influyendo y activando otras poblaciones inmunitarias como las células dendríticas, células NK, neutrófilos, macrófagos, linfocitos B y T y células T- $\gamma\delta$ . Pese a que el papel de estas células en la inmunidad del tracto genital femenino no se conoce en detalle, diversos estudios han aportado pinceladas de conocimiento a este ámbito. Por un lado, en modelos de ratón, se ha visto que la estimulación de estas células mediante ligandos específicos confiere protección frente a diferentes infecciones de transmisión sexual<sup>30, 31</sup>. Por otro lado, también se ha indicado que esta población puede tener efectos inmunosupresores, lo que podría favorecer la tolerancia al desarrollo fetal<sup>32</sup> o tener efectos perjudiciales en el caso de infecciones persistentes como la del virus del papiloma humano<sup>33</sup>.

## **1.2. Inmunidad adaptativa**

### ***1.2.1. Linfocitos B y respuesta humoral***

La respuesta humoral está caracterizada por la secreción de anticuerpos específicos contra un antígeno concreto, cuya unión al mismo permite que tengan lugar mecanismos de fagocitosis, de opsonización mediante el sistema del complemento o de citotoxicidad dependiente de anticuerpo, dirigidos a eliminar todos aquellos antígenos que puedan suponer una amenaza para el organismo. A diferencia del resto de mucosas, en el tracto genital femenino la inmunoglobulina dominante es la IgG en vez de la IgA, aunque es posible encontrar tanto IgA1 como IgA2 en este tejido<sup>34</sup>. De hecho, se han localizado células plasmáticas secretoras de IgA e IgG residentes en el TGF<sup>35, 36</sup>. Como el resto de poblaciones inmunitarias, la secreción de inmunoglobulinas se encuentra fuertemente regulada por las hormonas, con lo que varía durante el ciclo menstrual. De hecho, Shrier et al<sup>37</sup> observaron que los niveles de IgA e IgG alcanzan su valor mínimo durante la ovulación, lo que podría facilitar la supervivencia del espermatozoide en la mucosa genital y favorecer la fecundación. El transporte de estas inmunoglobulinas hasta la luz del TGF se lleva a cabo mediante proteínas transportadoras específicas para cada una de ellas, y su expresión por parte de las células epiteliales de la mucosa genital también se encuentra afectada por los niveles de las hormonas sexuales: el estradiol aumenta la expresión de estos transportadores en el epitelio uterino, mientras que la progesterona causa el efecto contrario<sup>38</sup>.

### ***1.2.2. Linfocitos T***

A lo largo del TGF podemos encontrar tanto linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, siendo los T CD8<sup>+</sup> los predominantes<sup>39, 40</sup>. En el cérvix y en la vagina, estas células se localizan en una banda inmediatamente inferior al epitelio<sup>41</sup>, y tanto en estos compartimentos como en el endometrio, estas poblaciones también pueden formar agregados linfoides similares a folículos<sup>10, 41</sup>. Estos agregados están compuestos por un núcleo de células B rodeado fundamentalmente de

linfocitos T CD8<sup>+</sup> que a su vez están rodeados por varios macrófagos, y presentan características propias del tejido linfoide inductivo asociado a mucosa tales como la presencia de vénulas de endotelio alto o una invasión del epitelio adyacente<sup>41</sup>. Estas estructuras están influenciadas por los ciclos hormonales, ya que su número disminuye durante la fase proliferativa y aumenta durante la fase secretora<sup>42, 43</sup>. Además, la ausencia de estos agregados en mujeres postmenopáusicas refuerza la idea de que su formación y regulación dependen de la acumulación de estradiol y progesterona<sup>44</sup>. En cuanto a su función, se cree que estos agregados pueden estar formados por células T CD4<sup>+</sup> de memoria residentes en la mucosa, generadas tras una infección con patógenos como clamidia o el virus del herpes, por lo que se encargarían de proteger al organismo de manera eficaz ante un nuevo encuentro con estos microorganismos<sup>45, 46</sup>.

En cuanto al fenotipo de estos linfocitos, la mayoría de los linfocitos T del cérvix son CCR7<sup>-</sup> y presentan receptores de quimiocinas clásicamente asociados a una mayor susceptibilidad al VIH, como el CCR5 y CXCR4. Divididos en los dos grandes subgrupos de linfocitos T, los CD4<sup>+</sup> del cérvix presentan marcadores de memoria efectora (CD27<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup>) o de células efectoras (CD27<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup>), mientras que los CD8<sup>+</sup> presentan un fenotipo de célula efectora (CD27<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup>)<sup>1</sup>. Así, vemos que las células que se localizan en la mucosa genital femenina son células preparadas para responder de manera rápida ante amenazas externas, actuando como una eficaz barrera de contención.

#### 1.2.2.a) Linfocitos T de memoria residente (T<sub>RM</sub>)

Por último, cabe destacar que la gran mayoría de las células CD3<sup>+</sup> del TGF expresan CD69 en su superficie<sup>47</sup>. En sangre, esta molécula determina el nivel de activación de diferentes poblaciones inmunes pero en los últimos años se ha descrito que, en tejido, identifica a una población de linfocitos T conocida como células T de memoria residentes en el tejido, o T<sub>RM</sub>. Más concretamente, se ha descrito que, en las T<sub>RM</sub>, CD69 puede estar relacionado con la retención de estas células en el tejido, ya que regula la presencia en superficie del receptor de esfingosina-1 fosfato (S1PR1), que a su vez participa en la salida de los linfocitos hacia los tejidos<sup>48, 49</sup>. Hasta la presente tesis, estas células no habían sido caracterizadas en detalle en el TGF, pero su presencia ya había sido descrita en diversos tejidos (intestino, pulmón, piel, riñón, páncreas y cerebro)<sup>50</sup>, incluyendo el tejido linfático<sup>51</sup>. Dichos análisis pusieron de manifiesto que la gran mayoría de T<sub>RM</sub> CD8<sup>+</sup> expresan también CD103, mientras que en las T<sub>RM</sub> CD4<sup>+</sup> la expresión de este marcador es mucho menor. Más recientemente, se ha descrito un perfil de expresión de diferentes marcadores que identifica las T<sub>RM</sub> en humanos, a saber: *downregulación* de S1PR1, factor 2 *Kruppel-like* (KLF2) y CD62L; *upregulación* de ciertas moléculas de adhesión (CD49a, CRTAM); modulación de ciertos receptores de quimiocinas (expresión elevada de CXCR6 y disminuida de CX3CR1) y *upregulación* de moléculas inhibitorias o reguladoras tales como el ligando 1 de muerte programada (PD-1), la fosfatasa dual específica 6 (DUSP6) o la IL-10<sup>51</sup>. Además de este perfil fenotípico, las células T<sub>RM</sub> también se caracterizan por su longevidad, su capacidad de proliferación frente a estímulos como la IL-7 y su permanencia en un estado de quiescencia que evita una activación inadecuada en los tejidos<sup>51</sup>.

La presencia mayoritaria de estas células en diferentes tejidos, incluyendo los tejidos linfoides, sugiere que pueden tener un papel protector *in situ*. De hecho, diversos estudios ya

han analizado dicho papel protector frente a infecciones de transmisión sexual tales como el herpesvirus<sup>48</sup> o la clamidia<sup>46</sup>, por lo que no es de extrañar que también ejerzan una vigilancia frente a otros tantos patógenos, sobre todo teniendo en cuenta que esta población se encuentra en gran número en la mucosa genital, una de sus principales vías de entrada.

## 2. Las infecciones de transmisión sexual

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son un conjunto de patologías de alta prevalencia. Se estima que existen unas 35 infecciones que pueden ser transmitidas por vía sexual, entre las que destacan la gonorrea, la sífilis, la clamidia, el virus del papiloma humano (VPH, causante de las verrugas genitales y el cáncer de cuello de útero) o el VIH. Todas estas patologías afectan por igual a hombres y a mujeres, y pueden ser causa de trastornos del aparato genitourinario, problemas de fertilidad, esterilidad, malformaciones en los recién nacidos o incluso muerte perinatal<sup>52</sup>. Además, no hay que olvidar que estas infecciones también son causa frecuente de estigma social, estereotipación, vulnerabilidad y vergüenza para la persona enferma, e incluso se han llegado a asociar con la violencia de género<sup>53</sup>.

Pese a que existen tratamientos capaces de acabar con la gran mayoría de estas infecciones, en los últimos años se ha visto un repunte de su prevalencia<sup>54</sup>, especialmente entre los hombres que mantienen sexo con hombres<sup>55-57</sup>. En esta población, este hecho puede deberse, en parte, a la pérdida del miedo a la adquisición del VIH, ya que la eficacia del tratamiento antirretroviral (TAR) hoy día lo ha relegado a ser una enfermedad crónica en vez de mortal. Esto, sumado al sentimiento de protección que confiere la profilaxis pre-exposición (PreP), explica que muchos individuos prescindan del uso de condón durante sus relaciones sexuales, incrementando el riesgo de contraer otras enfermedades de transmisión sexual.

No obstante, a nivel mundial existen otros motivos que explican este repunte de las ITS en los últimos años, entre los que destacan<sup>58</sup>:

- La aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a antibióticos y su rápida diseminación.
- El aumento en el número de parejas sexuales gracias a internet y a las aplicaciones que facilitan este tipo de encuentros, que muchas veces se encuentran asociadas al uso de drogas recreativas (*chemsex*).
- El incremento de los casos de violencia sexual y sexo comercial, debido generalmente a guerras, migraciones, refugiados, viajes y turismo sexual.

Esta problemática afecta especialmente a las mujeres, quienes suponen más del 50% de las nuevas infecciones a nivel mundial. Se estima que las ITS son la segunda causa de morbilidad de las mujeres de los países en desarrollo<sup>59</sup>, representando una gran carga social, económica y de salud pública. Además, las serias complicaciones derivadas de las mismas (embarazos ectópicos, abortos, partos prematuros...) tienen una gran relevancia tanto a nivel social como sanitario, sin olvidar el impacto económico que conllevan.

Las cuatro ITS curables más prevalentes hoy día son la clamidia (*Chlamydia trachomatis*), la gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*), la tricomoniasis (*Trichomonas vaginalis*), y la sífilis (*Treponema pallidum subspecies pallidum*)<sup>58</sup>. Esta prevalencia se puede explicar por diferentes motivos: por ejemplo, las infecciones por clamidia y tricomoniasis tienen lugar de manera asintomática en muchos casos, mientras que *Neisseria gonorrhoeae* ha desarrollado de forma progresiva resistencias frente a los antibióticos más comúnmente utilizados para erradicar esta infección.

Sin embargo, no hay que olvidar que la infección por VIH es una de las grandes pandemias actuales. Pese a que el tratamiento antirretroviral es capaz de controlar esta infección, la cura definitiva aún no ha sido encontrada salvo en muy contadas excepciones<sup>60, 61</sup>. Además, el número de personas infectadas a nivel mundial asciende diariamente (1,8 millones de personas contrajeron el virus a lo largo de 2017, lo que supone casi unas 5000 nuevas infecciones diarias<sup>62</sup>), por lo que resulta imperioso encontrar nuevas estrategias que frenen su expansión.

Por todo ello, y considerando que la mayoría de estas infecciones se concentran en países en desarrollo con recursos limitados, las vacunas específicas frente a estos patógenos se presentan como la opción más atractiva para limitar el número de nuevos contagios. Sin embargo, la incapacidad de inducir y medir la respuesta inmune en el tracto genital ha dificultado el desarrollo de estas vacunas, las cuales deberían generar potentes respuestas inmunes en la puerta de entrada del patógeno para proporcionar un control rápido y eficaz de la infección.

## 2.1. Clamidia

La palabra *clamidia* deriva del griego *chlamys*, que significa *capa que rodea los hombros*. Esta bacteria se denominó así por las inclusiones intracitoplasmáticas que genera cuando *rodea* el núcleo de las células infectadas<sup>63</sup>. Su descubrimiento comenzó en 1903, cuando Albert Neisser viajó a la isla de Java junto con otros dos científicos (Ludwig Halberstaedter y Stanislaus von Prowazek) para estudiar la infección por sífilis. En 1907, Halberstaedter y von Prowazek inocularon los ojos de orangutanes con secreciones de pacientes infectados por tracoma y observaron que los monos también desarrollaban inclusiones conjuntivales. Dichas inclusiones fueron también encontradas en la conjuntiva de niños, en el cérvix de madres y en la uretra de hombres.<sup>64</sup>

A nivel global, la infección por *Chlamydia trachomatis* representa la infección de transmisión sexual más habitual, con más de 131 millones de personas infectadas cada año en todo el mundo, según estimaciones de la OMS<sup>65</sup>. Además, en zonas endémicas como África y Oriente Medio, esta bacteria origina también el tracoma, una infección ocular que constituye la primera causa de ceguera evitable en dichas regiones. Pese a que esta infección afecta por igual a hombres y a mujeres, puede tener complicaciones graves para las segundas, ya que en ellas el 80% de las infecciones se desarrollan de manera asintomática, permitiendo que el patógeno ascienda hasta el tracto genital superior, donde puede causar problemas como endometritis, salpingitis o enfermedad inflamatoria pélvica (PID), lo que puede conllevar problemas de

fertilidad posteriores o incluso esterilidad<sup>66</sup>. Además, como sucede con el resto de ITS, la infección por clamidia se ha asociado a una mayor susceptibilidad al VIH<sup>67</sup>, mientras que una infección cervical crónica por este patógeno podría facilitar la progresión hacia un cáncer cervical en mujeres infectadas de forma persistente por el virus del papiloma humano<sup>68</sup>. A pesar de que el tratamiento con antibióticos es bastante eficaz a día de hoy, se han descrito algunos casos aislados de terapias fallidas, debido probablemente a una resistencia bacteriana frente a estos fármacos<sup>69</sup>, lo que da pie a pensar que en un futuro estas resistencias puedan extenderse como ya ha ocurrido con otros patógenos (*Neisseria gonorrhoeae*<sup>70</sup>). Por todo ello, el desarrollo de vacunas eficaces contra esta bacteria es un tema de gran interés para la salud pública, puesto que ahorraría millones de euros que actualmente se destinan tanto al tratamiento y erradicación de la infección, como a los problemas derivados de la misma.

### 2.1.1. Biología de la bacteria

*Chlamydia trachomatis* es una bacteria gram-negativa obligada a parasitar células eucariotas para poder llevar a cabo su ciclo reproductivo. Existen diferentes serotipos o serovares de clamidia, cada uno de los cuales presenta tropismo por diferentes tejidos mucosos, a saber: el ocular, el genital y el respiratorio. Basados en la variación antigénica de su *major outer membrane protein* (MOMP), se pueden distinguir 15 serotipos de *C. trachomatis*<sup>65</sup>:

- Los serotipos A - C se asocian con el tracoma.
- Los serotipos D - K infectan habitualmente el tracto urogenital.
- Los serotipos L1 - L3 son causa de linfogranuloma venéreo (LGV) invasivo.

En el epitelio del aparato genitourinario, la infección por clamidia se propaga a través del epitelio columnar simple de la uretra de los hombres y del endocérvix de las mujeres. Las bacterias penetran en estas células epiteliales y comienzan un ciclo de desarrollo en dos fases. Una vez dentro de la célula diana, durante la primera etapa, las partículas infecciosas, es decir, los cuerpos elementales (EBs), se transforman en los cuerpos reticulares (RBs), unidades no infecciosas pero metabólicamente activas. Estos RBs crecen y se multiplican en el interior de inclusiones citoplasmáticas en las células infectadas formando los llamados cuerpos de inclusión, hasta que terminan convirtiéndose en EBs de nuevo, los cuales son metabólicamente inactivos pero infecciosos. Finalmente, el tamaño de la inclusión es tal que termina lisando la célula y liberando los EBs que contiene al exterior, iniciando un nuevo ciclo en las células vecinas que conlleva una diseminación y amplificación de la infección (figura 1)<sup>71</sup>.

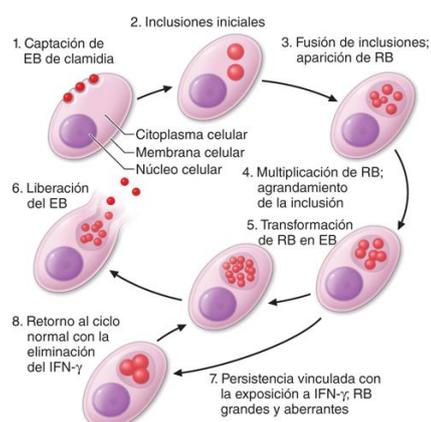


Figura 1. Ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis*. Fuente: Harrison. Principios de medicina interna, 19e. Dennis L. Kasper, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo.

Gracias a los modelos de cultivos celulares, sabemos cómo este patógeno es capaz de infectar a las células epiteliales y de establecer en ellas un nicho protegido, pero aún desconocemos el mecanismo mediante el cual la bacteria es capaz de ascender por el tracto genital y desencadenar procesos inmunopatológicos tan graves en humanos. Por ello, además de la investigación hacia la obtención de una vacuna eficaz y universal, la identificación de marcadores de virulencia de clamidia o de biomarcadores predictivos del riesgo de secuelas reproductivas graves deberían ser temas prioritarios.

### **2.1.2. Papel del sistema inmune en la infección por clamidia**

Al tratarse de una bacteria intracelular, la respuesta protectora predominante del sistema inmune frente a una infección por *Chlamydia trachomatis* es un perfil Th1<sup>72</sup>. Este perfil se caracteriza por una elevada secreción de IFN- $\gamma$ , el cual presenta acción antimicrobiana al activar numerosas vías: indolamina 2,3-dioxygenasa (IDO), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), privación de hierro y GTPasas p47. En humanos, la vía protectora principal es la catalización del triptófano mediante IDO, lo que impide que las inclusiones de clamidia en las células tengan acceso a este aminoácido esencial<sup>73</sup>. Sin embargo, los serotipos genitales de *C. trachomatis* se han adaptado a este mecanismo y han desarrollado una sintasa de triptófano que les permite sintetizar este metabolito a partir del indol extracelular, con lo que evitan esta primera vía de defensa del organismo<sup>74</sup>.

Mientras que la presencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos no es imprescindible para un aclaramiento de la infección<sup>75-77</sup>, las células T CD4<sup>+</sup> Th1 son las principales responsables del establecimiento de una respuesta eficaz y protectora tipo Th1. Sin embargo, se ha descrito un *paradigma inmunológico* en esta infección, basado en la premisa de que estas respuestas protectoras también pueden ser origen de un daño colateral en los tejidos infectados<sup>78</sup>. Esto se explica porque las células de esas regiones secretan una serie de citocinas proinflamatorias (tales como CXCL1, CXCL8 (IL-8), CXCL16, GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-6 o TNF) necesarias para estimular la función inmune efectora y eliminar la infección, pero que también pueden causar daños en el tejido circundante debido a este carácter proinflamatorio<sup>78</sup>. Además, un estudio publicado en el año 2002 sugirió que la expresión de varias quimiocinas asociadas al perfil Th1 (CXCL9, CXCL10 y CCL5) es más elevada en el tracto genital femenino superior que en el tracto inferior en ratones infectados con *C. trachomatis*, indicando que la respuesta frente a la infección en estos dos compartimentos es diferente<sup>79</sup>.

Por su parte, las células Th17 también parecen tener un papel importante en esta respuesta protectora. Experimentos en ratones demostraron que los animales inmunizados contra clamidia presentaban una mayor expresión de citocinas y receptores de la familia Th17 (IL-17A, C, D, F, IL-17RC, D y E) que los no vacunados<sup>80</sup>. Aunque se ha visto que, por sí sola, la IL-17A no tiene un efecto directo contra clamidia (al menos, *in vitro*)<sup>81</sup>, en combinación con la IL-17F participa en el reclutamiento de neutrófilos y en el desarrollo de respuestas protectoras de tipo Th1<sup>82</sup>. Además, Yu y colaboradores<sup>83</sup> describieron una correlación entre la expansión de células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> tras la inmunización y un aclaramiento de la infección por clamidia

en el tracto genital de ratón. No obstante, la presencia de células Th17 también se ha asociado con ciertas patologías autoinmunes como la enfermedad de Crohn o la encefalomiелitis experimental autoinmune. De hecho, se ha descrito que la estimulación de las células epiteliales con IL-17 induce una liberación de factores pro-inflamatorios que puede amplificar y potenciar la propia respuesta Th17<sup>84</sup>, a la vez que estimula la respuesta pro-inflamatoria que causa daño en el tejido<sup>85</sup>. Así, vemos como una respuesta de carácter inicialmente protector puede causar también un daño colateral en el propio tejido.

Otro de los protagonistas en la respuesta frente a este patógeno son los *toll-like receptors* (TLR), quienes tienen un papel esencial en la inducción de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa. Estos receptores se encuentran en la superficie de las células epiteliales y células dendríticas, y su activación es capaz de dirigir la respuesta inmune hacia los diferentes perfiles Th que se conocen<sup>86</sup>. Pese a que no se sabe con certeza qué TLR están asociados a la respuesta frente a clamidia, se ha propuesto que el TLR2 podría tener un papel importante en la activación de las DCs por *Chlamydophila pneumoniae*<sup>87</sup>.

Debido a su importancia en la orquestación de la respuesta inmune, las DCs se han estudiado ampliamente en el contexto de la infección por clamidia. Se sabe que esta subpoblación es reclutada a los sitios iniciales de infección, donde puede recolectar antígeno para presentarlo en los linfonodos a las células *naïve*, desarrollando así eficaces respuestas protectoras<sup>88</sup>. La transferencia adoptiva de DCs pulsadas con EBs de *C. muridarum* protege en ratones de las infecciones posteriores<sup>89</sup>, siendo las transferencias de células pulsadas con *C. muridarum* vivas más efectivas que las transferencias de DCs con bacterias inactivadas<sup>90</sup>. Estos experimentos ayudan a entender por qué la vacunación con *C. trachomatis* inactivada solamente tiene un efecto protector parcial en los ensayos llevados a cabo en humanos<sup>91</sup>.

Por otro lado, los macrófagos y monocitos también juegan un importante papel en esta infección, ya que una fagocitosis eficiente permitirá la destrucción de esta bacteria y la presentación antigénica de epítopos que activarán a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, originando una respuesta inmunitaria tipo Th1<sup>92</sup>. Sin embargo, algunas cepas de *Chlamydia trachomatis* son capaces de esquivar esta digestión intracelular y desarrollarse dentro de estas dos poblaciones<sup>93, 94</sup>, lo que convertiría a estas células en caballos de Troya que ayudarían a diseminar la infección mediante su migración a otros tejidos.

Por último, el papel de las inmunoglobulinas parece ser bastante limitado en las infecciones primarias por esta bacteria, mientras que son clave para el desarrollo de resistencias frente a las infecciones secundarias<sup>78</sup>. Los mecanismos propuestos para estas resistencias incluyen la neutralización y opsonización mediada por anticuerpos, así como una presentación más eficaz a las células T, probablemente debida a una captura de complejos antígeno-anticuerpo mediada por receptores Fc<sup>77, 95, 96</sup>.

En conjunto, estos datos demuestran la importancia de diferentes elementos inmunitarios en el control de esta infección, los cuales están fundamentalmente centrados en la respuesta T CD4<sup>+</sup>. De hecho, se ha relacionado la susceptibilidad a la re-infección con la desaparición de estas células en el tracto genital una vez superada la infección<sup>97</sup>. Pese a la movilización de todas estas poblaciones, la infección por *C. trachomatis* puede ser recurrente y prolongada, lo que pone de manifiesto la eficacia de este patógeno para evadir el sistema inmunitario. Son precisamente estos mecanismos de evasión los causantes de la patogénesis y de las infecciones persistentes que conducen a un daño tisular, lo que a su vez aumenta el riesgo de re-infección y la susceptibilidad a otras ITS.

### **2.1.3. La infección por clamidia en el tracto genital femenino**

El reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) es uno de los mecanismos tempranos de activación de la inmunidad innata. Pese a que no está del todo claro el papel de estos PAMPs en la infección por clamidia en el tracto genital femenino, se sabe que ciertos elementos bacterianos como el LPS y la *heat shock protein* 60 de clamidia son reconocidos por el TLR4, mientras que la bacteria entera es reconocida por el TLR2. Todas estas vías confluyen en la molécula MyD88, que resulta clave para la generación de respuestas eficaces frente a la infección por clamidia<sup>98</sup>.

Las células epiteliales del TGF también juegan un papel protagonista en la patogenia de esta enfermedad. Una vez infectadas, estas células son capaces de expresar ciertas citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1 $\alpha$  y GM-CSF<sup>99</sup>; a la vez que reclutan otras células inmunes capaces de generar más citocinas pro-inflamatorias. Pese a que estas citocinas son necesarias para el control de la infección, se ha visto que existe una correlación entre su expresión y un mayor riesgo de desarrollar secuelas graves como la destrucción de las trompas de Falopio<sup>100</sup>.

Las células epiteliales también secretan diversas quimiocinas que atraen a diferentes poblaciones inmunes al foco de infección (fundamentalmente linfocitos T<sup>97</sup>), creando agregados de células del sistema inmunitario en el TGF conocidos como *sitios inductivos*. En las mujeres infectadas por *C. trachomatis*, estas zonas, similares a las placas de Peyer de la mucosa intestinal, originan unos folículos linfoides que terminan dando lugar a centros germinales, donde los linfocitos B *naïve* y las células T son clonalmente seleccionados y expandidos<sup>101</sup>. Una vez superada la infección, estos agregados se mantienen y cuentan con la presencia de células T CD4<sup>+</sup> de memoria residentes, las cuales permiten una respuesta más rápida y eficaz frente a futuras reinfecciones<sup>46</sup>. Por otro lado, las moléculas de adhesión MADCAM1 (*mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1*) y VCAM-1 (*vascular cell-adhesion molecule 1*), necesarias para el *homing* de los linfocitos hacia las zonas de inflamación en la mucosa, se expresan en gran medida en el epitelio de las trompas de Falopio infectadas con *C. trachomatis*, lo que resalta una vez más el papel protagonista de esta población en el curso de la infección<sup>102</sup>.

Por último, los neutrófilos se reclutan en grandes cantidades al TGF durante la fase de inflamación aguda ya que son importantes para controlar la infección en las primeras etapas<sup>103</sup>,<sup>104</sup>. Estas células son la principal fuente de péptidos antimicrobianos con acción anti-clamidia como las defensinas<sup>105</sup>, aunque también se ha visto que contribuyen al desarrollo de patología

en el TGF superior debido a los productos de su degranulación (*matrix metalloproteinase 9* y especies reactivas del oxígeno)<sup>106, 107</sup>. Por todo ello, esta población también puede incluirse en el *paradigma inmunológico* que postula que las células que confieren protección frente a *C. trachomatis* son también las responsables de la patología asociada.

## 2.2. Virus de la inmunodeficiencia humana

A día de hoy, la infección por VIH constituye un problema de salud global, con un total de 36,9 millones de personas infectadas alrededor del mundo según las últimas estimaciones<sup>62</sup>. Dicha cifra continúa aumentando pese a las campañas de educación y concienciación: en 2017, alrededor de 1,8 millones de personas contrajeron esta infección<sup>62</sup>. La principal vía de transmisión del virus continúa siendo el contagio por vía sexual, con una tasa de infección superior en mujeres que en hombres. En el África sub-Sahariana, tres de cada cuatro nuevas infecciones registradas en la población joven (15-24 años) se producen en mujeres<sup>62</sup>. Por este motivo, el desarrollo de una vacuna ampliamente eficaz frente al virus es uno de los retos actuales de la investigación en este campo, lo que permitiría frenar el avance de la pandemia.

Pese a la eficacia de los tratamientos antirretrovirales, los cuales pueden mantener los niveles de carga viral en sangre por debajo del límite de detección de las técnicas actuales (pacientes *indetectables*), la infección por VIH tiene un considerable impacto en la salud del individuo, ya que estos pacientes suelen presentar, a menudo, un riesgo elevado de padecer enfermedades cardiovasculares, hepáticas, nefríticas, óseas o neurológicas<sup>108, 109</sup>. Además, los individuos infectados presentan altos niveles de numerosos marcadores de inflamación, lo que supone un factor de riesgo para el desarrollo de comorbilidades y aumenta la mortalidad. Se ha postulado que la destrucción de la mucosa intestinal que sigue a la entrada del virus conduce a una translocación de productos microbianos que desencadena este estado de inflamación, tanto local como sistémica. Esta inflamación, mantenida en el tiempo, es a su vez causa de enfermedad para diferentes órganos, conllevando un peor funcionamiento del organismo en su totalidad<sup>110</sup>. Por todo ello, pese a que en los últimos años se ha conseguido cronificar la enfermedad, aún resulta necesario desarrollar terapias capaces de eliminar en su totalidad la presencia del virus en los pacientes infectados para mejorar su calidad de vida.

### 2.2.1. Biología del virus

El virus de la inmunodeficiencia humana es un lentivirus de la familia *Retroviridae*. Está formado por una cápsida proteica compuesta por la proteína p24, dentro de la cual se encuentra el material genético del virus (dos hebras simples de RNA) y sus proteínas accesorias. Alrededor de esta cápsida encontramos la envuelta viral, una bicapa lipídica que contiene también glicoproteínas virales tales como gp120, que dirige el tropismo viral a través de la interacción con receptores de superficie de la célula diana; y gp41, que promueve la fusión de la membrana celular y la envuelta viral (figura 2)<sup>111</sup>.

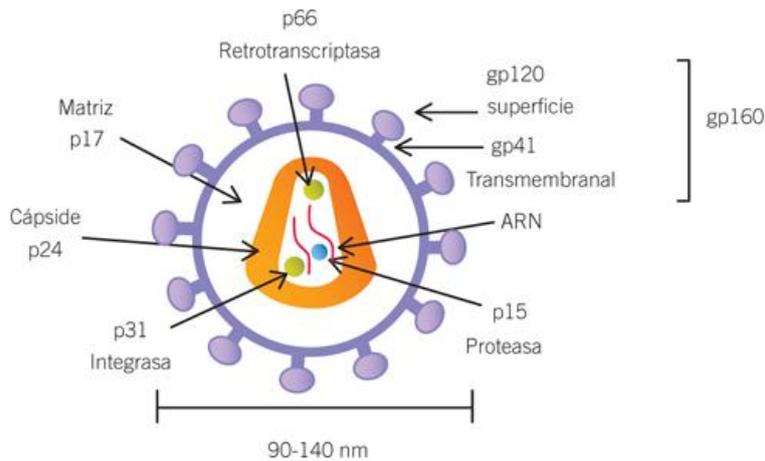


Figura 2. Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana. Fuente: *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Adriana María Salazar Montes, Ana Soledad Sandoval Rodríguez, Juan Socorro Armendáriz Borunda.

Existen dos tipos de virus: el VIH-1, que presenta una mayor distribución global y una tasa de mutación extraordinariamente elevada, siendo el responsable mayoritario de la pandemia; y el VIH-2, cuya distribución es más limitada, ya que se encuentra prácticamente recluido en el África occidental y en los estados no africanos que mantuvieron relaciones coloniales con esta región<sup>112, 113</sup>. Ambos tipos derivan de múltiples cruzamientos y transmisiones del virus de la deficiencia simia (SIV), el cual sufrió un proceso de transmisión zoonótica en algún momento de la historia reciente y saltó a los humanos, dando origen al virus de la inmunodeficiencia humana. Debido a su amplia distribución y a su papel en la epidemia global por VIH, a partir de ahora se hará referencia exclusivamente al VIH-1 cuando se mencione el VIH.

Los primeros casos de síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida o sida datan de 1981, cuando se detectaron diversos casos de neumonía y sarcomas de Kaposi en varones homosexuales de Nueva York y Los Ángeles. En poco tiempo, comenzaron a notificarse también casos de varones heterosexuales, mujeres, usuarios de drogas de vía intravenosa y receptores de transfusiones sanguíneas y productos derivados de la sangre que manifestaban una sintomatología similar. Así, comenzó a sospecharse que el agente etiológico responsable de dicha enfermedad había de ser un microorganismo transmisible por vía sexual y sanguínea. Finalmente, Françoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier identificaron en París en 1983 el virus de la inmunodeficiencia humana. En 1985 estuvieron disponibles las primeras pruebas diagnósticas para la detección del virus, y en 1987 se licenció el primer fármaco con acción eficaz contra el VIH, el primer antirretroviral<sup>114</sup>.

### 2.2.2. Un ejemplo del doble papel del sistema inmune en la infección por VIH: las células dendríticas

La principal diana del virus de la inmunodeficiencia humana son los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, las células dendríticas y los macrófagos. En este sentido, las DCs juegan un doble papel en el curso de esta infección. Por un lado, debido a su gran capacidad endocítica, estas células son capaces de capturar el virus cuando éste entra por vía mucosa. Este proceso está mediado por una serie de receptores presentes en la superficie de las DCs, como los receptores de lectinas (Siglec-1,

DC-SIGN, langerina) o los *toll-like receptors*<sup>115</sup>. Gracias a la endocitosis, las DCs pueden procesar el virus a través de la vía exógena de procesamiento antigénico para posteriormente exhibir en su superficie péptidos virales asociados al MHC de clase II, que serán presentados a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

De forma paralela, parte de este virus endocitado vía Siglec-1 o DC-SIGN evadirá la vía de procesamiento antigénico y quedará resguardado en un compartimento endosómico no degradativo<sup>116</sup>. Más tarde, estas células dendríticas cargadas de virus entrarán en íntimo contacto con las células T en la denominada *sinapsis infecciosa*, lo que puede suceder tanto en el foco inicial de la infección como en los ganglios linfáticos. En ese momento, el virus puede ser transmitido a las células T CD4<sup>+</sup> activadas gracias a los correceptores virales presentes en su superficie (CCR5 y CXCR4), los cuales pueden ser inducidos por la propia DC<sup>117</sup>. A su vez, estas células CD4<sup>+</sup> infectadas podrán transmitir el virus a otros linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante una estructura similar, conocida como *sinapsis virológica*<sup>118</sup>. La diferencia entre estos dos procesos radica en que la sinapsis virológica requiere de la interacción de la glicoproteína de la cubierta viral, presente en la superficie de las células infectadas, con el receptor CD4 de las células diana; mientras que en la sinapsis infecciosa de las DCs, las responsables de la transmisión del virus son moléculas de adhesión que se utilizan de manera habitual durante las interacciones inmunes<sup>118-120</sup>. Este proceso de diseminación viral por parte de las células dendríticas se conoce con el nombre de *trans*-infección, y tradicionalmente se había postulado a DC-SIGN como el responsable mayoritario de la captura del virus y del inicio de este proceso<sup>116, 121</sup>. No obstante, recientemente se ha demostrado que gran parte de este mecanismo es debido a la expresión de Siglec-1 en las células dendríticas<sup>122-124</sup> ya que diferentes estudios han demostrado que el virus capturado vía DC-SIGN es rápidamente degradado<sup>125</sup> y que los anticuerpos neutralizantes contra DC-SIGN no impiden la transmisión<sup>126, 127</sup>.

Así, las DCs juegan un papel crucial en la diseminación del virus desde su entrada por vía mucosa, a la vez que representan una de las primeras respuestas del sistema inmune para hacer frente a esta infección. Del mismo modo, este mecanismo podría estar detrás de la persistencia viral observada en macrófagos y recientemente descrita por Ganor y colaboradores, quienes han observado que, en la uretra de individuos VIH<sup>+</sup>, esta población presenta viriones intactos en compartimentos intracelulares, los cuales podrían generarse a través de una captura del virus mediada por Siglec-1<sup>128</sup>.

### **2.2.3. Respuesta del sistema inmune a la infección por VIH**

Tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa originan una contundente respuesta dirigida a detener la infección por este patógeno.

#### **2.2.3.a) Inmunidad innata**

En cuanto a la inmunidad innata, cabe destacar la secreción de interferones de tipo I (como el IFN- $\alpha$ ) por parte de las células dendríticas plasmacitoides, las cuales se activan vía TLR7 en respuesta al RNA viral de cadena única (ssRNA) y comienzan a producir esta citocina a través

de la vía de señalización de MyD88-IRF7<sup>129</sup>. Estas células se encuentran principalmente en los tejidos, con frecuencias que oscilan entre el 0,001 y el 0,1% del total de células CD45<sup>+</sup> allí presentes<sup>130</sup>.

El IFN- $\alpha$  induce la expresión de multitud de genes interferón-dependientes, muchos de ellos con acción antiviral, por lo que es considerado la primera vía de inhibición del VIH. A modo de ejemplo, la señalización vía IFN- $\alpha$  conlleva una *up*-regulación del factor de restricción APOBEC3G<sup>131</sup>, el cual puede editar los transcritos inversos del VIH para provocar su degradación e impedir así su integración en el genoma celular<sup>132</sup>.

Otro de los efectos del IFN- $\alpha$  es la activación y expansión de las células NK, incrementando así su capacidad citotóxica y de secreción de IFN- $\gamma$ , citocina que también interviene en el control de la infección<sup>133</sup>. De este modo, la activación de las células NK conlleva una destrucción de las células infectadas mediante mecanismos de citotoxicidad, desencadenados por la interacción de los receptores KIR (*killer immunoglobulin receptors*) presentes en su superficie con las MHC de clase I de las células infectadas. Se ha visto que ciertas combinaciones de receptores KIR y MHC-I son más eficaces que otras a la hora de controlar la infección por VIH. En concreto, ciertos estudios han demostrado que el alelo HLA-B\*57 del MHC-I tiene un efecto protector frente al VIH<sup>134, 135</sup>, ya que los individuos que presentan esta variante son capaces de generar una respuesta citotóxica NK mucho más potente que los que carecen de ella, limitando de esta forma la diseminación viral. Sin embargo, este alelo también se ha asociado a una hipersensibilidad al abacavir, uno de los medicamentos ampliamente utilizados en la terapia antirretroviral<sup>136</sup>.

### 2.2.3.b) Inmunidad adaptativa

A pesar de que la principal diana del virus son los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, cuyo recuento total en sangre decae a medida que avanza la infección, los primeros agentes de la inmunidad adaptativa que entran en juego para intentar controlar la diseminación de la infección son los linfocitos T CD8<sup>+</sup><sup>137</sup>, los cuales son capaces de eliminar las células infectadas mediante mecanismos de citotoxicidad. Sin embargo, la respuesta de estas células se centra en unos pocos epítomos inmunodominantes, lo que facilita que el virus desarrolle mutaciones de escape frente a la actividad de los CD8<sup>138</sup>. Además, la activación crónica del sistema inmune que provoca la persistencia del virus conduce a un agotamiento de estas poblaciones<sup>139</sup>, comprometiendo la respuesta CD8 durante la fase crónica de la infección, con lo que ya no resulta eficaz para limitar la replicación viral.

Por su parte, los CD4 también tienen un importante papel en la defensa del organismo frente al virus, ya que colaboran con los CD8 para establecer una respuesta T eficaz. La depleción de los CD4 en macacos infectados con el SIV empeora el progreso de la enfermedad, lo que indica que estos T CD4<sup>+</sup> son realmente necesarios para controlar el avance del virus<sup>140</sup>. Entre las diferentes poblaciones que componen estas T CD4<sup>+</sup>, cabe destacar las T reguladoras (T reg) y las Th17. A día de hoy, no existe un consenso acerca del papel de las T reg en el transcurso de la

infección (revisado en Chevalier and Weiss, 2013<sup>141</sup>). Por un lado, existen datos que apoyan la teoría de que las T reg contribuyen a ralentizar el avance de la enfermedad al disminuir los niveles de activación inmunitaria. Por otro lado, también existen datos que apoyan la teoría de que su actividad interfiere en la correcta interacción entre CD4 y CD8, necesaria para mantener una respuesta antiviral<sup>142</sup>. Así, nos encontramos de nuevo ante un caso en el que determinados componentes del sistema inmune tienen un doble efecto a la hora de hacer frente a esta infección, ya que muestran efectos antagónicos.

Por último, las células Th17, localizadas fundamentalmente en las superficies mucosas y encargadas del mantenimiento de su integridad (su depleción en la mucosa intestinal tiene un importante efecto en la translocación bacteriana<sup>143</sup>), parecen tener también cierta importancia en esta infección, ya que presentan correceptores para el virus, son permisivas a la infección y contienen elevados niveles de DNA viral integrado<sup>144</sup>. No obstante, en la infección por SIV, los macacos con mayores números de Th17 antes de la infección presentan picos y cargas virales menores, lo que indica que esta población contribuye de forma activa a la defensa frente al virus<sup>143</sup>.

Así, vemos que multitud de elementos del sistema inmunitario, tanto innato como adaptativo, entran en juego para hacer frente a la infección por VIH. Pese a que todos estos mecanismos tienen como objetivo limitar la infección viral, éste ha sabido aprovecharse de ellos para su propio beneficio. Incluso, ha llegado un paso más allá para asegurar su persistencia en el organismo infectado: el establecimiento de reservorios virales en las células del huésped.

#### **2.2.4. Reservorios virales**

A día de hoy, el principal obstáculo para la cura del VIH radica en el establecimiento de reservorios virales en diferentes células del organismo. Debido a la naturaleza del virus, una vez que este penetra en una célula diana, debe retrotranscribir su material genético (ARN) a ADN, para lo cual utiliza su propia polimerasa. Tras ello, este ADN se integra en el genoma de la célula huésped, de forma que será procesado por la maquinaria celular para producir nuevas partículas víricas, las cuales se liberarán para infectar a nuevas células, contribuyendo así a la diseminación del virus. Este ADN viral integrado conforma los reservorios virales, y se localiza fundamentalmente en los linfocitos T CD4<sup>+</sup><sup>145</sup>.

Pese a que la terapia antirretroviral es capaz de limitar la dispersión viral y reducir el tamaño de los reservorios establecidos, es incapaz de eliminar dichos reservorios o de impedir que se establezcan. En la mayoría de los casos, esta terapia mantiene los niveles de carga viral en sangre por debajo del límite de detección, con lo que se considera que el paciente se encuentra con una carga viral indetectable. No obstante, cuando se interrumpe el tratamiento, los niveles de carga viral tienden a aumentar nuevamente, lo que puede explicarse por la presencia de estas células latentemente infectadas, las cuales pueden dar lugar a nuevas partículas víricas al activarse, pero no pueden ser eliminadas mediante el tratamiento

antirretroviral<sup>146</sup>. Así, las investigaciones a día de hoy se centran en tratar de eliminar los reservorios para suprimir por completo la presencia del virus en el organismo.

Se han propuesto como candidatos para albergar los reservorios a varios subtipos celulares: macrófagos<sup>147</sup>, células dendríticas<sup>148</sup> y linfocitos T CD4<sup>+</sup><sup>149</sup>. Entre ellos, cabe destacar los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, los cuales son una de las primeras dianas del virus. Aunque se sabe que la mayoría de estas células mueren durante las primeras etapas de la infección, también se sabe que una pequeña parte de ellas es capaz de sobrevivir durante largos períodos, albergando en su interior el material genético del virus<sup>149</sup>. Dentro del total de poblaciones T CD4<sup>+</sup>, las que sostienen los reservorios virales son las denominadas CD4 de memoria, ya que presentan ciertas características que las hacen ideales para este fin<sup>150</sup>:

- Una larga vida, ya que en ocasiones pueden llegar a ser igual de longevas que el propio individuo.
- La capacidad de proliferar frente a estímulos exógenos como la IL-2.
- La entrada en un estado de reposo o quiescencia que les permite pasar inadvertidas ante las células vigilantes del sistema inmunitario.

Cabe pensar que, de entre todas las células T CD4<sup>+</sup> de memoria presentes en el organismo, aquellas que se localizan en las puertas de entrada del virus serán las candidatas más firmes a albergar estos reservorios, puesto que serán las primeras en entrar en contacto con el virus. Por ello, en la presente tesis, nos hemos centrado en el estudio de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria residentes en el tejido cervicovaginal.

### ***2.2.5. La infección por VIH en el tracto genital femenino***

Actualmente, la mayor parte de las nuevas infecciones por VIH registradas a nivel global se producen por vía heterosexual (coito vaginal). Pese a que el epitelio de la mucosa genital constituye una barrera física que impide la entrada del virus, la presencia de pequeñas lesiones en dicho tejido (debidas a la actividad sexual habitual, la higiene u otras causas), compromete su impermeabilidad, abriendo pequeñas puertas de entrada que el patógeno aprovecha para penetrar en el organismo<sup>151</sup>. Por otro lado, la inflamación local del tracto genital también está asociada a una mayor susceptibilidad al virus<sup>152</sup>. Esta inflamación, que también puede deberse a la actividad sexual o a la presencia de infecciones locales como candidiasis o vaginosis bacteriana, provoca un reclutamiento y una activación de diversas células del sistema inmune que pueden ser utilizadas por el virus para penetrar en el organismo (como por ejemplo, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> intraepiteliales o las células de Langerhans<sup>153</sup>). Ambos mecanismos de patogenia se ven potenciados por la existencia de infecciones de transmisión sexual previas al contacto con el VIH, puesto que conllevan una inflamación local y, en ocasiones, lesiones ulcerativas que facilitan la entrada del virus<sup>3</sup>.

Dentro del tracto genital femenino se distinguen dos compartimentos: el tracto superior (compuesto por las trompas de Falopio, los ovarios y el útero) y el tracto inferior (que comprende el cérvix, la vagina y la vulva, figura 3). Ambas regiones se distinguen por el epitelio que las recubre: en el caso del tracto superior se trata de un epitelio columnar simple, mientras

que en el tracto inferior el epitelio que encontramos es estratificado o escamoso. Así, en base a este epitelio, podemos dividir el cérvix en dos segmentos: la parte más próxima al útero, o endocérvix; y la parte más próxima a la vagina, o ectocérvix.

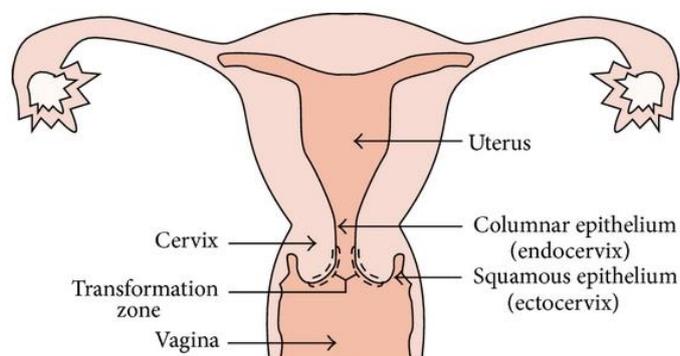


Figura 3. Estructura del aparato reproductor femenino.

### 2.2.5.a) Endocérvix y tracto genital femenino (TGF) superior

Comparado con el del tracto inferior, el epitelio simple de esta región puede parecer más susceptible a la infección por el virus. Sin embargo, el TGF superior se encuentra protegido por una densa capa de mucus que atrapa las partículas virales y dificulta su avance hacia las células diana, lo que unido a las mucinas secretadas por las células allí presentes, constituye una extraordinaria combinación defensiva frente a partículas extrañas<sup>154</sup>. Por último, también cabe destacar que el epitelio columnar del TGF superior constituye únicamente una pequeña zona de la superficie total expuesta al eyaculado infeccioso, lo que también reduce las posibilidades de infección en esta zona<sup>154</sup>.

### 2.2.5.b) Ectocérvix y TGF inferior

Por su parte, el epitelio estratificado del TGF inferior supone una barrera más difícil de atravesar para el VIH al contar con más capas de células epiteliales. Pese a que esta zona comprende la mayor parte del epitelio expuesto al eyaculado infeccioso, las uniones íntimas que se establecen entre las células que lo conforman (a saber, desmosomas, *tight junctions* y *adherent junctions*, las mismas que se encuentran en el epitelio del TGF superior) reducen la permeabilidad del epitelio, dificultando enormemente el trasiego hacia las capas inferiores de cualquier pequeña macromolécula, incluidos los viriones<sup>154</sup>. Tampoco hay que olvidar el papel de las bacterias de la flora vaginal, cuya producción de ácido láctico y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) ayuda a mantener un pH ácido y un ambiente antimicrobiano, constituyendo asimismo otra fuente de protección<sup>155</sup>.

Pese a todos estos mecanismos de defensa, ciertas células inmunes se encuentran infiltradas entre las células epiteliales, como son las células de Langerhans y los linfocitos intraepiteliales<sup>3</sup>. Este hecho facilita su contacto con el virus, lo que supone una vía de entrada para iniciar su diseminación.

### 3. Vacunas contra ITS y adyuvantes

Como ya se ha comentado, el desarrollo de vacunas eficaces contra las enfermedades de transmisión sexual supone un reto que puede aportar grandes beneficios a varios niveles, puesto que permitiría disminuir el número de nuevos contagios a nivel mundial, mejorando la calidad de vida de millones de individuos, y ahorrando miles de millones a los sistemas sanitarios. No obstante, a día de hoy, existen muy pocas vacunas eficaces contra las ITS: solo las hepatitis A y B, y el virus del papiloma humano pueden ser prevenidos por este método.

#### 3.1. Peculiaridades de la inmunidad en la mucosa y necesidad de adyuvantes

La mucosa del tracto genital femenino presenta ciertas características inmunológicas que la diferencian de otras mucosas tales como la de los pulmones o el intestino:

- Las hormonas sexuales regulan el funcionamiento del TGF, estableciendo un balance entre tolerancia y respuesta inmune frente a los microorganismos allí presentes. Así, el ciclo menstrual tiene un notable efecto sobre la inmunidad del TGF a través de dichas hormonas<sup>156</sup>.
- El TGF presenta dos zonas inmunológicamente diferenciadas: el TGF superior (trompas de Falopio, ovarios y útero), fundamentalmente estéril; y el TGF inferior (cérvix, vagina y vulva), no-estéril<sup>34</sup>.
- A diferencia del resto de mucosas, la inmunoglobulina predominante en este tejido es la IgG en lugar de la IgA<sup>34</sup>.
- Por su parte, la IgA que se encuentra en esta región es sustancialmente diferente de la encontrada en otras mucosas, ya que aquí encontramos proporciones similares de IgA1 e IgA2, mientras que en la mucosa respiratoria o digestiva encontramos fundamentalmente IgA1<sup>157</sup>. Dado que la IgA1 es susceptible a proteasas secretadas por patógenos como *Neisseria gonorrhoeae*, la presencia de IgA2 en este tejido asegura la eficacia de este sistema defensivo.
- La mucosa del TGF carece de estructuras linfopiteliales organizadas tales como las placas de Peyer, pero presenta pequeños agregados linfoides<sup>43</sup>.

Una de las estrategias más racionales a la hora de diseñar vacunas frente a las ITS sería una vacunación vía mucosa, ya que esto permite actuar frente al patógeno directamente en la puerta de entrada. Este tipo de vacunas presenta además otras ventajas con respecto a la vacunación clásica: elimina la necesidad de manipular agujas, facilita el proceso de aplicación, reduce los efectos adversos de la vacunación y genera respuestas eficaces tanto a nivel sistémico (producción de IgG sérica y respuestas celulares en órganos distales), como en la mucosa (secreción de IgA mucosa, opsonizadora y neutralizante de patógenos) debido a la rapidez con que el antígeno alcanza esta superficie<sup>158</sup>.

Las vacunas más tradicionales utilizan patógenos vivos atenuados para inducir una inmunidad adaptativa. Sin embargo, la posible reactivación de estos organismos y la posible generación de tumores por parte de virus oncogénicos inactivados disminuyen su seguridad y espectro de administración, ya que sólo los individuos inmunológicamente sanos podrán

beneficiarse de ellas<sup>159</sup>. Por ello, el diseño actual de vacunas se centra en la utilización de elementos no patogénicos como proteínas recombinantes, toxinas inactivadas o péptidos sintéticos<sup>160</sup>; pese a que estos elementos no son tan inmunogénicos como los organismos atenuados. Por este motivo, es necesario potenciar la actividad del sistema inmune mediante la incorporación de adyuvantes.

En la mucosa, los adyuvantes se pueden dividir en dos categorías: vehículos de administración y moléculas inmunoestimuladoras, siendo ambas importantes en la defensa contra agentes infecciosos, tanto a nivel local como distal<sup>161</sup>. Por ejemplo, los oligodesoxinucleótidos CpG actúan como potentes adyuvantes mucosos en vacunas nasales contra infecciones transmitidas vía transfusión sanguínea y vía sexual<sup>162</sup>. Teniendo en cuenta que la mucosa supone una barrera física a la entrada de elementos externos como vacunas y adyuvantes, la utilización de moléculas de bajo peso molecular puede favorecer el transporte de estos elementos hasta las células epiteliales o a través de células con potencial para transportar antígenos desde la mucosa (células de goblet, macrófagos, células M y células dendríticas intraepiteliales)<sup>161</sup>.

### 3.2. Antígenos lipídicos y células iNKT

Como ya se ha comentado anteriormente, las células NKT presentan características de las células T y de las NK. Dentro de esta familia, podemos encontrar diferentes subpoblaciones, a saber: invariantes (iNKT) y diversas (NKT de tipo II). Mientras que las primeras están caracterizadas por la expresión de la cadena  $V\alpha 24J\alpha 18$  en humanos, unida a un repertorio limitado de cadenas  $V\beta$  para formar su TCR (siendo la más habitual la  $V\beta 11$ ); las segundas poseen una diversidad de TCRs que generalmente no son reactivos a la  $\alpha$ -GalactosilCeramida ( $\alpha$ GC), un glicolípido aislado por primera vez en esponjas marinas<sup>29</sup>. Ambas subpoblaciones reconocen antígenos lipídicos presentados a través de CD1d, una molécula del MHC altamente conservada entre individuos, lo que la convierte en una diana terapéutica interesante. Debido a la alta reactividad de las iNKT frente a la  $\alpha$ GC, esta población se ha estudiado más en detalle que la de las NKT de tipo II, y es en ella en la que se ha centrado un capítulo de la presente tesis.

CD1d interviene en la vía clásica de activación de las iNKT presentando antígenos lipídicos, tanto endógenos como exógenos, de alta afinidad. Así, se ha visto que diversos agentes infecciosos generan lípidos microbianos que pueden ser reconocidos por esta vía<sup>163</sup>, entre ellos, *Chlamydia trachomatis*<sup>164</sup>, por lo que esta población puede ser clave para iniciar una respuesta eficaz frente a este y otros patógenos.

Tras su activación, las células iNKT son capaces de secretar una gran cantidad de citocinas de perfiles tanto Th1 (IFN- $\gamma$ ) como Th2 (IL-4, IL-9, IL-10, IL-13) o Th17 (IL-17A, IL-21, IL-22)<sup>29</sup>. Esta secreción de citocinas conlleva la activación de diversas poblaciones inmunitarias, tanto innatas como adaptativas, de manera que desencadena una respuesta inmune generalizada frente al patógeno en cuestión. El tipo de perfil iNKT que se activará dependerá de varios factores, tales como la naturaleza del antígeno en cuestión, la APC que lo presente (puesto que aportará unas señales coestimuladoras diferentes en su superficie o en forma de citocinas) o el clon de TCR que responda. De esta forma, diversos antígenos lipídicos pueden

inducir multitud de respuestas diferentes en cuanto a su perfil, magnitud y calidad<sup>29</sup>. En este sentido, variantes estructurales de la  $\alpha$ GC podrían ser capaces de dirigir la respuesta inmunitaria que se genere hacia el perfil Th más adecuado para hacer frente a la infección que se presente, aumentando la eficacia del sistema inmune.

Si bien es cierto que no se tiene mucha información acerca de la frecuencia de las iNKT en el tejido cervicovaginal, el hecho de que varios patógenos asociados a ITS hayan desarrollado estrategias que les permiten impedir la activación de estas células denota su relevancia en la inmunidad de esta mucosa. Entre estas estrategias se encuentran la depleción o deterioro funcional de las iNKT, y la *downregulación* de CD1d en las células presentadoras de antígeno. Encontramos ejemplos de estas estrategias tanto en el VIH, que utiliza dos proteínas accesorias para inhibir la expresión de CD1d en células dendríticas, reduciendo la activación de las iNKT y la producción de IFN- $\gamma$  tras la estimulación *in vitro* con  $\alpha$ GC<sup>165</sup>; como en *Chlamydia trachomatis*, quien también es capaz de reducir la expresión en superficie de CD1d<sup>166</sup>. No obstante, en general, el papel de las iNKT durante la infección no es claro y depende, en gran medida, de la enfermedad y el modelo estudiado<sup>167</sup>.

### 3.3. $\alpha$ GC como adyuvante, necesidad de nuevos glicolípidos

La activación de las iNKT mediante el ligando sintético  $\alpha$ GC se ha estudiado en diferentes modelos, llegando incluso a ensayos clínicos de éxito limitado<sup>163</sup>. El principal problema que presenta esta molécula es que, al tratarse de un agonista tan potente, induce una secreción masiva de citocinas por parte de las iNKT, lo que las conduce finalmente a un estado de anergia. Por ello, se están destinando esfuerzos al desarrollo de nuevas variantes de la  $\alpha$ GC que superen esta limitación, a la vez que orienten la respuesta inmune hacia un perfil Th particular<sup>168, 169</sup>. Estas moléculas podrían tener un gran interés como adyuvantes para vacunas ya que actúan vía CD1d, una proteína codificada por un gen no polimórfico, por lo que podrían suponer un modelo de adyuvante universal.

Pese a que la mayor parte de los estudios con  $\alpha$ GC se han centrado en el papel protector de este compuesto frente a diferentes tipos de cáncer<sup>170-172</sup>, también se han llevado a cabo diversos estudios sobre el efecto adyuvante de esta molécula en diferentes vacunas<sup>173, 174</sup>, demostrando su capacidad para estimular la respuesta CD8 protectora. De hecho, algunos estudios han documentado la importancia de la utilización de  $\alpha$ GC como adyuvante vaginal para hacer frente a ciertas ITS<sup>30, 31</sup>.

El objetivo principal de los adyuvantes es estimular la respuesta inmune para potenciar su efecto. Si, además, conseguimos que esta estimulación esté dirigida hacia un perfil Th concreto, estaremos facilitando el camino para generar una respuesta protectora más eficaz. La utilización de ligandos de las células iNKT como adyuvantes permite que, a su vez, estas células recluten, mediante la secreción de citocinas inflamatorias y quimiocinas, a las poblaciones más adecuadas para hacer frente al patógeno en cuestión. Así, el reclutamiento de células efectoras en la mucosa de entrada será clave para el desarrollo de vacunas efectivas contra ITS, ya que permitirá el establecimiento de una población de células de memoria ( $T_{RM}$ ) en dicho tejido<sup>45</sup>. Este hecho resalta el atractivo de la activación de las iNKTs como método adyuvante, por lo que

el diseño de nuevos glicolípidos capaces de activar esta población supone una estrategia innovadora en el campo de las vacunas<sup>168</sup>.

#### **4. El modelo de explante cervical para el estudio de las ITS: pros, contras y otras consideraciones**

Gran parte de los experimentos que se detallan en la presente tesis se han llevado a cabo utilizando el modelo de explante cervicovaginal descrito por Grivel y Margolis<sup>175</sup>, consistente en el cultivo de este tejido de forma *ex vivo*, aislando la mucosa para poder analizar en detalle las células inmunitarias asociadas. Algunas de las ventajas que supone trabajar con este tipo de muestras biológicas se detallan a continuación:

- El modelo de explante cervicovaginal resulta un modelo ideal para el estudio de las ITS en humanos, puesto que permite estudiar *in situ* la respuesta de los principales agentes que intervienen en las primeras etapas de la infección.
- También permite observar los efectos de estas infecciones sobre las células residentes en el propio tejido, tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa.
- Este modelo aporta una información más relevante y completa que la que podemos obtener al estudiar sangre, lo que supone un complemento muy enriquecedor para cualquier estudio.
- Al trabajar con bloques de tejido se mantiene la arquitectura del mismo y todos los estímulos que eso conlleva (interacciones celulares, factores de crecimiento, citocinas, etc.), lo que ayuda a prolongar la vida de las células que lo componen.
- Esta arquitectura también permite que las diferentes células que lo integran interactúen entre sí de manera similar a como lo harían frente a cualquier estímulo externo o agente infeccioso, por lo que es un modelo adecuado para estudiar respuestas *in situ*.

Por otro lado, trabajar con muestras de tejido cervicovaginal también implica ciertos inconvenientes:

- El trabajo con este tipo de muestras está limitado a la disponibilidad de tejido: mientras que la obtención de muestras de sangre es un proceso relativamente sencillo y accesible que se puede planificar, la recogida de tejidos está asociada a operaciones quirúrgicas e implica a todo un equipo de profesionales (médicos, cirujanos, enfermeras, personal de anatomía patológica, celadores, etc.), por lo que es necesario establecer un circuito de recogida de muestras que funcione de manera eficaz.
- El tejido cervicovaginal está fuertemente influenciado por el ciclo menstrual y las hormonas asociadas, por lo que la variabilidad entre muestras es francamente elevada y debe tenerse en consideración. Además, entran en juego factores como el estado del ciclo de la paciente (ausencia de menstruación por razones biológicas o

médicas, donantes menopáusicas, donantes en edad fértil pero en diferentes etapas del ciclo...), y su historial de infecciones pasadas o incluso actuales, así como otros factores que afectan de forma individual a la inmunología local.

- Ciertas poblaciones inmunitarias son muy susceptibles a este tipo de cultivo. Los macrófagos, por ejemplo, se adhieren a la placa de cultivo, por lo que es necesario un tratamiento con acutasa para poder incluirlos en los análisis. Sin embargo, desde mi experiencia, gran parte de esta población (CD3<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD11c<sup>dim</sup> y la mayoría de las CD163<sup>+</sup>) desaparece pasadas las primeras 24 horas de cultivo, lo que dificulta su análisis<sup>176</sup>.
- La disgregación enzimática del tejido para la obtención de una suspensión celular puede afectar a la estabilidad de ciertos marcadores de membrana y dificultar su estudio. Por ello, es aconsejable analizar previamente la susceptibilidad de las moléculas de interés frente a los enzimas digestivos que se vayan a utilizar. Este proceso también puede reducir la viabilidad de ciertas poblaciones, especialmente las mieloides<sup>176</sup>, por lo que es necesario incluir algún marcador de viabilidad en los análisis que se realicen.
- Mantener la arquitectura del tejido puede dificultar que los estímulos o agentes infecciosos que se estén estudiando penetren en el mismo y lleguen a las células diana, por lo que en ocasiones es necesario idear estrategias con quimiocinas para atraer a las células de interés fuera del tejido y asegurar que entran en contacto con estos elementos. De hecho, esta arquitectura no cuenta con un sistema circulatorio que favorezca la distribución de los estímulos a través del tejido, lo que también impide la infiltración de otras poblaciones inmunitarias en respuesta al estímulo añadido (neutrófilos, células plasmacitoides, etc).

Por último, existen otros aspectos que deben considerarse a la hora de trabajar con este sistema:

- El cultivo del tejido puede hacer que el fenotipo y los perfiles de expresión de ciertas poblaciones varíen a lo largo del tiempo, por lo que es necesario analizar los niveles basales de expresión de las moléculas de interés para poder compararlos con los niveles obtenidos tras el cultivo.
- Los análisis de citometría de flujo del tejido digerido pueden verse dificultados por la presencia de células epiteliales, musculares y conjuntivas, así como de *debris* tisular y restos de células. Por ello, es necesario incluir marcadores como el CD45 para el estudio de células hematopoyéticas, ya que ayuda a reducir el *background* que aporta el tejido. También es recomendable incluir controles rutinarios como los FMO (*fluorescence minus one*) de cada marcador a analizar.



## **Hipótesis y objetivos**



El papel fundamental del sistema inmunitario consiste en la protección del organismo frente a todo tipo de amenazas para el correcto funcionamiento del mismo, desde agentes infecciosos externos hasta células tumorales del propio individuo, a la vez que debe tolerar la existencia de ciertos elementos ajenos al mismo, a saber: antígenos presentes en los alimentos, flora bacteriana (intestinal, epitelial y vaginal), órganos trasplantados o individuos en desarrollo (gestación).

La mayoría de patógenos externos han evolucionado para sacar provecho del funcionamiento del sistema inmunitario, aprovechando o redirigiendo diferentes elementos del mismo para facilitar su colonización. Así, es habitual encontrar bacterias o virus capaces de crecer y reproducirse utilizando las células del huésped, a la vez que atenúan la actividad del sistema inmunitario bloqueando ciertos mecanismos de defensa. El ejemplo más claro de este fenómeno es la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, el cual consigue disminuir enormemente la cantidad de células del sistema inmune necesarias para hacerle frente (linfocitos T CD4<sup>+</sup>), a la vez que se oculta en ellas para asegurar su persistencia en el organismo (establecimiento de reservorios virales). Por su parte, *Chlamydia trachomatis* también es capaz de evadir la inmunidad del individuo infectado para garantizar su supervivencia, mientras que su persistencia desencadena una respuesta inmunitaria que puede llegar a ser perjudicial para el propio individuo.

Por todo ello, la hipótesis de la presente tesis se basa en este doble papel que presenta la inmunidad de la mucosa cervical frente a las ITS: la protección frente a la susceptibilidad ante dichos patógenos. Por un lado, hipotetizamos que la activación de ciertas poblaciones inmunes residentes en este tejido mediante estímulos externos (glicolípidos) podría suponer una defensa eficaz contra estas infecciones, por lo que debería tenerse en cuenta este mecanismo a la hora de diseñar nuevas estrategias de prevención y eliminación de dichas infecciones. Por otro lado, también hipotetizamos que algunas de las células residentes en estos tejidos podrían contribuir a la patología y persistencia de las ITS, por ejemplo, albergando los reservorios virales del VIH.

Así, el objetivo de la presente tesis doctoral se centra en estudiar el papel de las poblaciones inmunitarias de células T residentes en la mucosa cervical frente a las infecciones persistentes de dicha mucosa. De esta forma, el objetivo final de estas investigaciones es mejorar y potenciar la respuesta efectiva del sistema inmune frente a diferentes infecciones de transmisión sexual mediante la modulación de estas poblaciones inmunitarias.

Los objetivos específicos para alcanzar esta meta son los siguientes:

1. Analizar las diferentes poblaciones inmunitarias de células T (tanto convencionales como no convencionales) localizadas en el cérvix.
2. Establecer modelos de infección por VIH y por *Chlamydia trachomatis* de la mucosa cervical.
3. Evaluar el efecto de la activación de las células iNKT en el modelo *ex vivo* de infección por *Chlamydia trachomatis* o VIH.
4. Determinar el papel de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria residentes en el cérvix como reservorios del VIH.



## **Materiales y métodos**



## 1. *Screening* inicial de compuestos

Para estudiar la activación de las células iNKT en el tejido cervicovaginal utilizamos una batería de compuestos lipídicos derivados de la  $\alpha$ GC y estructuralmente similares a ella, generados en el laboratorio del Dr. Amadeu Llebaría, del Instituto de Química Avanzada de Cataluña.

### 1.1. ELISA en líneas celulares (iNKT)

Un primer *screening* de los compuestos fue llevado a cabo por colaboradores de la Universidad Autónoma de Barcelona, utilizando para ello líneas celulares obtenidas a partir de iNKTs primarias (Dra. Lorena Usero, Dra. Carme Roura). Dichas líneas fueron incubadas con los glicolípidos de estudio y la secreción de citocinas al medio se cuantificó mediante un ELISA comercial para la detección de diferentes citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12.

### 1.2. ELISPOT

Parte del *screening* inicial de los compuestos se realizó mediante experimentos de ELISPOT llevados a cabo por colaboradores del Instituto de Investigación del SIDA IrsiCaixa (Esther Jiménez, Dra. Julia García-Prado). De forma breve, para estos experimentos se incubaron  $10^5$  PBMCs de donantes sanos deplecionados para CD14 junto con  $10^4$  iDCs (células dendríticas inmaduras) obtenidas a partir de las células CD14<sup>+</sup> de esos mismos pacientes en presencia de diferentes concentraciones de glicolípido (10 ng/ml, 100 ng/ml y 1  $\mu$ g/ml) en medio RPMI, y se cuantificó la cantidad de células secretoras de IFN- $\gamma$  en respuesta a estos estímulos mediante un ensayo colorimétrico. Se realizaron también los correspondientes controles positivos y negativos: PBMCs (-CD14) solos en presencia de fitohemaglutinina (PHA), PBMCs (-CD14) solos en medio RPMI, PBMCs (-CD14) solos en presencia de glicolípido, iDCs solas en presencia de glicolípido, co-cultivo de ambos tipos celulares en ausencia de glicolípido.

### 1.3. Co-cultivo iNKT – HeLa + ELISA

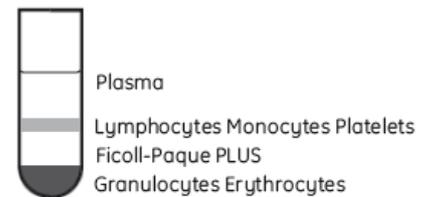
De forma paralela a los otros dos, en nuestro laboratorio realizamos otro *screening* de los compuestos atendiendo a la secreción de IFN- $\gamma$  que generaban en células iNKT primarias. Para ello, en primer lugar se aislaron dichas iNKT del residuo leucocitario de donantes sanos, y posteriormente se cultivaron *overnight* junto con una variante de células HeLa transfectadas de forma estable con un plásmido que aumenta su expresión de CD1d (generosamente donadas por el profesor Derek Doherty del Trinity College de Dublín). De esta forma, las células HeLa actúan como células presentadoras de antígeno para que las iNKT puedan interactuar con el glicolípido en cuestión.

### 1.3.1. Aislamiento de *iNKT* primarias

#### 1.3.1.a) Ficoll a partir de residuo leucocitario

En primer lugar, las células inmunes de los donantes (células de sangre periférica, PBMC) fueron aisladas del resto de poblaciones celulares presentes en el residuo leucocitario mediante un gradiente de densidad Ficoll. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Tras haber masajeado la bolsa que contiene el residuo leucocitario para mezclar bien sus componentes, verter su contenido en un tubo falcon de 50 ml.
2. Añadir 5 ml de PBS estéril a la bolsa para recolectar las células que hayan podido quedar atrapadas y añadir ese volumen al falcon de 50.
3. Añadir PBS estéril al falcon hasta alcanzar un volumen final de 50 ml.
4. Invertir la botella de Ficoll-Paque varias veces para asegurar que está correctamente mezclada antes de abrirla por primera vez.
5. Añadir 15 ml de Ficoll a dos tubos falcon de 50, por separado.
6. Añadir 25 ml del residuo leucocitario diluido a cada uno de ellos de forma lenta para que queden depositados encima del Ficoll y no mezclados con el mismo.
7. Centrifugar a  $720 \times g$  durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT), con aceleración máxima de la centrífuga y sin freno.
8. En un nuevo falcon de 50, añadir 10 ml de PBS y recolectar las dos bandas leucocitarias del donante en ese mismo tubo, con ayuda de una pipeta Pasteur.
9. Añadir PBS hasta alcanzar los 50 ml de volumen final para lavar las células. Centrifugar 5 minutos a  $400 \times g$ .
10. Lavar de nuevo con 20 ml de PBS.
11. Resuspender las células en 40 ml de PBS con 1% FBS.



#### 1.3.1.b) Contaje de los PBMC obtenidos

##### A) Contaje mediante *Perfect Count Beads*

1. Sacar las *beads* de la nevera y dejarlas a RT durante 5 minutos.
2. Agitar con la mano el vial para mezclarlas correctamente.
3. Coger 30  $\mu\text{l}$  de PBMC mediante pipeteo reverso y depositarlas en un tubo FACs.
4. Añadir el mismo volumen de *beads* de contaje mediante pipeteo reverso.
5. Añadir 100  $\mu\text{l}$  de PBS a la mezcla.
6. Adquirir en el citómetro. La concentración de células se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células} / \mu\text{l} = \frac{\text{Número de células en el citómetro}}{\text{Número de beads (High or low)}} \times \text{Concentración de beads} \left( \frac{\text{beads}}{\mu\text{l}} \right)$$

##### B) Contaje mediante cámara de contaje

1. Añadir 90  $\mu\text{l}$  de azul tripán atemperado a un pocillo de una placa de 96.
2. Añadir 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular. Mezclar bien.
3. Traspasar 18  $\mu\text{l}$  de la mezcla a una cámara de contaje.

4. Contar las células presentes en 5 cuadrículas de 3 × 3 campos cada una y hacer la media.
5. Multiplicar por el factor de dilución de las células (1:10) y el volumen de la región contada de la cámara de conteo (generalmente, 100 nl).

$$N^{\circ} \text{ de células}/_{ml} = \text{Células en } 100 \text{ nl} \times \text{Factor dilución (1: } 10) \times 1.000.000 \text{ nl/ml}$$

#### 1.3.1.c) Determinación de la frecuencia de iNKT del donante

1. Centrifugar  $10^6$  células del donante (7 minutos,  $400 \times g$ , RT) y resuspender en 75  $\mu$ l de *staining buffer* (ver *Recetas 1.*).
2. Añadir 5  $\mu$ l de anti-iNKT APC (APC anti-human TCR V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 (iNKT cell) Antibody, BioLegend, cat. no. 342908) y 5  $\mu$ l de CD3 PerCP (CD3 PerCP clone SK7, BD Biosciences, cat. no. 345766).
3. Mezclar e incubar durante 15 minutos a RT en oscuridad.
4. Añadir 1 ml de *staining buffer* y lavar dos veces ( $400 \times g$ , 7 minutos, RT).
5. Resuspender en 100  $\mu$ l y adquirir en el citómetro.

#### 1.3.1.d) Purificación de las iNKT mediante *microbeads* magnéticas

Se utilizó el protocolo que proporciona la casa comercial de las *beads* (Miltenyi, cat. no. 130-094-842) para un total de  $2 \times 10^8$  células, escalando los volúmenes cuando el número de células fuera superior al mismo. Se trabajó con todos los *buffers* fríos y se mantuvieron las células en frío durante el proceso (entre 2 y 8°C) para evitar un marcaje no específico de la población de interés. Previamente, en base a la frecuencia de iNKTs de cada donante, se calculó el volumen de células que debía pasar por la columna para obtener el número de iNKTs deseado, asumiendo un rendimiento de la columna del 70 %.

1. Filtrar la suspensión de PBMC con un filtro de nylon de 30-40  $\mu$ m (Labclinics, cat. no. PLC93070) previamente humedecido con 500  $\mu$ l de PBS, a fin de eliminar agregados celulares que pudieran obturar la columna.
2. Centrifugar la suspensión a  $300 \times g$  durante 10 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante.
3. Resuspender el *pellet* en 800  $\mu$ l de *buffer* de separación (ver *Recetas 2.*).
4. Añadir 200  $\mu$ l de Anti-iNKT *MicroBeads*. Mezclar bien e incubar durante 15 minutos en la nevera (entre 2 y 8°C). En paralelo, tripsinizar una monocapa de células HeLa y resuspenderlas a  $5 \times 10^5$  cells/ml (ver *protocolo de tripsinización más adelante*).
5. Lavar los PBMC marcados con las *beads* añadiendo 3 ml de *buffer* y centrifugando a  $300 \times g$  durante 10 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante.
6. Resuspender en 1 ml de *buffer*.
7. Colocar una columna de separación (LS Column, Miltenyi, cat. no. 130-042-401) en el campo magnético adecuado de un Separador MACS.
8. Añadir 3 ml de *buffer* a la columna para equilibrarla. Esperar siempre a que el reservorio esté completamente vacío antes de proceder con el siguiente paso.
9. Aplicar la suspensión celular en la parte superior. Recoger las células eluidas no marcadas (fracción negativa) en un tubo de 15 ml.

10. Lavar la columna 3 veces con 3 ml de *buffer* y recoger dicho volumen junto con la fracción negativa.
11. Extraer la columna del campo magnético y colocarla en un nuevo tubo de 15 ml.
12. Añadir 5 ml de *buffer* y extraer inmediatamente las células marcadas (fracción positiva) insertando el émbolo de la columna en la parte superior y apretando con fuerza.

#### 1.3.1.e) Determinación de la pureza y número de iNKTs aisladas

1. Centrifugar la fracción positiva durante 7 minutos a  $400 \times g$  y RT.
2. Retirar 3 ml del sobrenadante, sin decantar, y resuspender el remanente.
3. En un tubo FACS, añadir 75  $\mu\text{l}$  de *staining buffer* y 30  $\mu\text{l}$  de la fracción positiva.
4. Añadir 5  $\mu\text{l}$  de anti-iNKT APC (APC anti-human TCR  $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$  (iNKT cell) Antibody, BioLegend, cat. no. 342908) y 5  $\mu\text{l}$  de CD3 PerCP (CD3 PerCP clone SK7, BD Biosciences, cat. no. 345766).
5. Mezclar e incubar durante 15 minutos a RT en oscuridad. Mientras tanto, sembrar 50.000 células HeLa CD1d por pocillo en una placa de 96 y sacar de la nevera las *beads* de conteo para que se vayan atemperando.
6. Pasados los 15 minutos, añadir, sin lavar, 30  $\mu\text{l}$  de *beads* a la suspensión de iNKTs marcadas.
7. Adquirir en el citómetro.

#### 1.3.2. Co-cultivo de células HeLa e iNKTs

Una vez sembradas las HeLa CD1d, las iNKTs se añadieron en una ratio 1:1, dejando un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  por cada pocillo. En este momento, se añadió también el glicolípido correspondiente a cada pocillo, a la concentración deseada. Además, se establecieron los controles necesarios de células solas; co-cultivo de ambos tipos celulares sin glicolípido; co-cultivo con glicolípido y anticuerpo bloqueante del CD1d, etc. Con todo, las condiciones que se estudiaron en estos experimentos quedan resumidas en la siguiente tabla:

<b>Tipos celulares</b>	<b>Estímulos</b>
HeLa CD1d	-
HeLa empty vector (EV)	-
THP-1	-
iNKT – HeLa CD1d	-
iNKT – HeLa EV	-
iNKT – THP-1	-
iNKT – HeLa EV	$\alpha$ -GC 100 ng/ml
iNKT – THP-1	$\alpha$ -GC 100 ng/ml
iNKT – HeLa CD1d	PMA/Ionomicina (10 ng/ml / 1 $\mu$ M)
iNKT – HeLa CD1d	$\alpha$ -GC (10 ng/ml - 100 ng/ml - 1 $\mu$ g/ml)
iNKT – HeLa CD1d	$\alpha$ -GC 100 ng/ml + anti CD1d (20 $\mu$ g/ml)
iNKT – HeLa CD1d	$\alpha$ -GC 100 ng/ml + control isotipo (20 $\mu$ g/ml)
iNKT – HeLa CD1d	HS22 (10 ng/ml - 100 ng/ml - 1 $\mu$ g/ml)
iNKT – HeLa CD1d	HS138 (10 ng/ml - 100 ng/ml - 1 $\mu$ g/ml)
iNKT – HeLa CD1d	HS161 (10 ng/ml - 100 ng/ml - 1 $\mu$ g/ml)
iNKT – HeLa CD1d	HS176 (10 ng/ml - 100 ng/ml - 1 $\mu$ g/ml)
iNKT – HeLa CD1d	28d (10 ng/ml - 100 ng/ml - 1 $\mu$ g/ml)
iNKT – HeLa CD1d	YHS-01-45 (10 ng/ml - 100 ng/ml - 1 $\mu$ g/ml)
iNKT – HeLa CD1d	YHS-01-46 (10 ng/ml - 100 ng/ml - 1 $\mu$ g/ml)
iNKT – HeLa CD1d	YHS-01-60 (10 ng/ml - 100 ng/ml - 1 $\mu$ g/ml)

*Tabla 1. Resumen de las condiciones de cultivo y controles en los experimentos de co-cultivo de células iNKT y HeLa CD1d.*

Las células THP-1 (células de leucemia monocítica aguda) se utilizaron como control positivo, ya que expresan altos niveles de CD1d. Por su parte, las *empty vector*, se utilizaron como control negativo, ya que están transfectadas con el mismo vector que las CD1d, pero sin el gen codificante de esta molécula. La PMA/Ionomicina se utilizó como control positivo de la activación celular. El anti CD1d (clon 51.1, eBiosciences, cat. no. 14-0016-8) se utilizó como control negativo para bloquear la presentación antigénica, y a su vez, el control de isotipo (clon eBMG2b, eBiosciences, cat. no. 14-4732-82) se utilizó como control de esta condición.

Una vez establecido el co-cultivo, la placa se incubó durante 24h a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, la placa se centrifugó a 800 x g durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante de cada cultivo, almacenándolo a -20 °C.

### **1.3.3. Cultivo de células HeLa**

Tanto las células HeLa convencionales (HeLa 229 (ATCC® CCL2.1™)) como las CD1d-transfectadas y las EV se sembraron inicialmente a 70.000 células/cm<sup>2</sup>, tanto en *flask* de 75 cm<sup>2</sup> como en *flask* de 25 cm<sup>2</sup>. Fueron mantenidas en cultivo hasta alcanzar un 80-90% de confluencia, momento en el que se realizaba un pase a una dilución adecuada para su correcto crecimiento.

#### **1.3.3.a) Siembra de células HeLa a partir de un vial congelado**

1. Descongelar rápidamente el vial en un baño a 37 °C.
2. Transferir el contenido del vial a 9 ml de medio de cultivo (Ver *Recetas 3.*).

3. Centrifugar para eliminar el agente crioprotector (DMSO) durante 5 minutos a 200 x g y RT. Descartar el sobrenadante.
4. Resuspender en 1-2 ml de medio de cultivo y volver a centrifugar.
5. Resuspender en 1-2 ml de medio y transferir a un *flask* de cultivo con un volumen adecuado de medio para el crecimiento celular (unos 20 ml en un *flask* T75, unos 5-6 ml en un *flask* T25). Mezclar bien agitando cuidadosamente el *flask* para facilitar la distribución uniforme de las células por toda su superficie.
6. Cultivar a 37 °C y un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 1.3.3.b) Tripsinización

1. Descartar el medio de cultivo de las células.
2. Lavar con 5 ml de HBSS sin calcio ni magnesio (Gibco, cat. no. 14170088) o PBS y descartar.
3. Añadir suficiente volumen de la disolución de tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, cat. no. 25300054) atemperada a 37 °C como para cubrir toda la superficie del *flask* (1-2 ml). Incubar a 37 °C durante 5-10 minutos.
4. Revisar en el microscopio que las células se hayan despegado (aparecerán redondas y refráctiles), y en ese momento añadir 5 – 10 ml de medio de cultivo completo para inactivar la tripsina.
5. Resuspender con una pipeta para separar los agregados y terminar de despegar todas las células.

#### 1.3.3.c) Congelación de las células

1. Centrifugar las células tripsinizadas procedentes de dos *flask* confluentes en un falcon adecuado durante 5 minutos a 200 x g. Resuspender el *pellet* en 1,5 ml de FBS al 5% de DMSO.
2. Almacenar los viales a -80 °C para periodos cortos. Para almacenamiento a largo plazo, trasladar las células a nitrógeno líquido pasadas 24 horas.

#### **1.3.4. ELISA del sobrenadante**

Una vez obtenidos los sobrenadantes del co-cultivo de células HeLa e iNKTs, se midió la cantidad de IFN- $\gamma$  presente en los mismos mediante un kit comercial de ELISA para esta citocina en humanos (Invitrogen, cat. no. CHC1233). Se trata de un ELISA *en sándwich* en el que la presencia de IFN- $\gamma$  en las muestras se mide gracias a una reacción colorimétrica de la peroxidasa, la cual se encuentra conjugada al anticuerpo de detección mediante el sistema avidina-estreptavidina. Básicamente, se siguieron las instrucciones del fabricante en cuanto a protocolo y *buffers* de trabajo: cubrir la placa con el anticuerpo de captura, bloquear, incubar con las muestras problema, añadir el anticuerpo de detección y, finalmente, el sustrato de la peroxidasa para poder leer los resultados mediante espectrofotometría.

## 2. Circuito de recogida de muestras y consentimiento informado

Las muestras de tejido cervicovaginal de este trabajo fueron recogidas de los siguientes hospitales: Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Hospital Municipal de Badalona y Hospital Universitario Vall d'Hebron. Para el estudio de las células T CD4 de memoria residentes en el cérvix en el contexto del VIH (objetivo #4) se recogieron muestras simultáneas de tejido cervical (a través de histerectomías, conizaciones o toma de biopsias) y sangre de las pacientes VIH<sup>+</sup> que entraron en el estudio. Los datos específicos de estas pacientes se ilustran en la tabla anexa 1. Todas las pacientes sometidas a histerectomías por causas no neoplásicas fueron informadas de la finalidad del estudio, y su consentimiento para participar en el mismo se recogió de forma escrita, conforme a la Declaración de Helsinki. De forma breve, una vez realizada cada operación, la pieza de tejido en cuestión fue trasladada al departamento de Anatomía Patológica, donde fue examinada y cortada, separando una pieza de ectocérvix y otra de endocérvix como material de trabajo. Estas piezas se recogieron en medio con antibióticos y fungicidas (ver *Recetas 4.*) para eliminar los posibles patógenos del tejido y minimizar el riesgo de contaminación. Finalmente, la muestra se trasladó a nuestro laboratorio, donde se eliminó la mayor parte de tejido estromal para trabajar únicamente con la mucosa y submucosa.

## 3. Puesta a punto del cultivo del tejido

Una vez establecido el circuito de recogida de las muestras desde el hospital hasta el laboratorio, fue necesario establecer las condiciones óptimas de cultivo del tejido para maximizar su rendimiento y obtener el mayor número posible de células viables del mismo. Para ello, se llevaron a cabo diversas pruebas.

### 3.1. Tipo de placa, tiempo de cultivo, necesidad de una matriz externa de colágeno

En primer lugar, se estudió la viabilidad del tejido en función del tipo de placa utilizada para su cultivo. Para ello, se cultivaron 6 bloques de tejido por pocillo en una placa de 12 o de 24 pocillos, y se mantuvieron en cultivo durante 7 días (ver receta del medio de cultivo en *Recetas 5.*). Pasado ese tiempo, el tejido fue digerido con colagenasa IV (Gibco) y se estudió el número de células CD3<sup>+</sup> recuperadas en cada caso mediante citometría de flujo. En un experimento posterior, se estudió cómo afectaba el tiempo de cultivo a la viabilidad celular, a la vez que se estudió la necesidad de cultivar el tejido sobre un soporte de colágeno, tal y como indicaba el protocolo de referencia<sup>177</sup>. Para ello, se cultivaron entre 4 y 6 piezas de tejido por condición en presencia o ausencia de este soporte de colágeno (Gelita-Spon Rapid<sup>3</sup>, Gelita Medical), digiriéndose a los 3 ó 7 días de cultivo y observando el número de células CD3<sup>+</sup> viables recuperadas en cada caso.

#### 4. Adición de diferentes glicolípidos: estrategias de *delivery*

**Adición directa.** En primer lugar, 6-8 piezas de tejido cervicovaginal (ecto y endocérvix) se incubaron en presencia de glicolípidos a diferentes concentraciones (10 ng/ml, 100 ng/ml y 1 µg/ml) en una placa de 12 pocillos y un volumen final de 1 ml de medio de cultivo (ver *Recetas 5.*). Los tejidos fueron incubados a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

**Adición a suspensión celular.** Posteriormente, se probó a digerir el tejido de forma enzimática y mecánica (ver *Digestión del tejido* más adelante) e incubar la suspensión celular obtenida en una placa de 96 pocillos y un volumen final de 200 µl de medio de cultivo (10<sup>6</sup> células/ml) junto con los glicolípidos correspondientes a las concentraciones de trabajo. El cultivo fue mantenido durante 48 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

**Adición + MIP-3B.** La estrategia de cultivo más utilizada a lo largo de la presente tesis consistió en incubar 6-8 piezas de ecto y endocérvix en presencia de los diversos glicolípidos y 100 ng/ml de CCL19 (MIP-3β), una quimiocina capaz de atraer al medio de cultivo, entre otras, a células dendríticas e iNKTs para facilitar su encuentro y el acceso al estímulo en cuestión. Tras una noche de cultivo en una placa de 12 pocillos, las células migrantes fueron recogidas y cultivadas durante 4 horas más en una placa de 96 pocillos junto con brefeldina (BD Biosciences, cat. no. 555029, dilución 1:1000) para detener el tráfico intracelular de membranas, guardando el sobrenadante de cultivo para posteriores análisis de las citocinas secretadas mediante ELISA o Luminex. En algunos casos, esta brefeldina estuvo acompañada de una dosis de recuerdo de glicolípidos.

Finalmente, en todos los casos, las poblaciones inmunes presentes en este tejido y su capacidad secretora de citocinas fueron analizadas mediante citometría de flujo previa digestión del tejido.

**Adición + MIP-3B + Antígeno proteico.** Debido a las dificultades iniciales para detectar una respuesta del tejido a la adición de estos estímulos, y en base a lo descrito en la literatura<sup>178</sup> se estudió también el efecto de añadir un antígeno proteico (*recombinant chlamydial protease-like activity factor*, rCPAF; u ovoalbúmina) a la vez que los glicolípidos para facilitar el proceso de presentación por parte de las células presentadoras de antígeno.

#### 5. Digestión del tejido

Con el fin de poder analizar ampliamente el fenotipo de las diversas poblaciones inmunes presentes en el tejido cervicovaginal, se realizó una digestión de este tejido siguiendo el protocolo brevemente descrito a continuación.

1. Los bloques de mucosa cervicovaginal (6-8), de 2x2x2 mm aproximadamente, fueron transferidos a una solución de RPMI al 2,5% de FBS y 5 mg/ml de colagenasa IV, e incubados durante 30 minutos a 37°C en agitación.
2. Tras la digestión enzimática, se llevó a cabo una digestión mecánica del tejido con ayuda de un mortero de plástico.

3. La suspensión celular obtenida fue filtrada a través de un filtro de 70  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, a fin de eliminar el *debris* tisular.
4. Tras lavar dos veces con PBS las células para eliminar los restos de colagenasa, el *pellet* obtenido fue resuspendido en 250  $\mu\text{l}$  de PBS para comenzar la tinción con anticuerpos para citometría.

## 6. Citometría de flujo

La técnica más utilizada durante la presente tesis para analizar y fenotipar las células obtenidas a partir del tejido cervicovaginal fue la citometría de flujo, marcando tanto las proteínas de la superficie celular como moléculas presentes en el interior de dichas células (citocinas, antígenos virales/bacterianos, etc.) mediante tinciones intracelulares. Además, en ciertos experimentos también se llevó a cabo una separación celular mediante citometría de flujo (*sorting*), para purificar las poblaciones de interés.

### 6.1. Marcaje de superficie

1. 250  $\mu\text{l}$  de suspensión celular fueron incubados con 1  $\mu\text{l}$  del marcador de viabilidad Aqua (LIVE/DEAD™ Fixable Aqua dead cell stain kit, for 405 nm excitation, Life Technologies, Invitrogen, cat. no. L34966) durante 30 minutos a RT.
2. Tras dos lavados con PBS, las células fueron resuspendidas en el cóctel de anticuerpos de superficie correspondiente a cada experimento (ver tabla anexa 2 *Anticuerpos utilizados*) en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  de *staining buffer* (ver *Recetas 1.*).
3. Tras 20 minutos de incubación en oscuridad y a RT, las células fueron lavadas dos veces en el mismo medio de tinción.
4. Finalmente, las células se fijaron en PBS al 1% de p-formaldehído (PFA) antes de ser adquiridas en el citómetro (BD LSRFortessa SORP). En el caso de los experimentos de separación celular, las células fueron resuspendidas en PBS al 1% de FBS y 0,5 mM de EDTA y adquiridas en un citómetro separador BD FACSAria II. Los resultados fueron analizados utilizando el software FlowJo vX.0.7 (TreeStar).

### 6.2. Marcaje intracelular

Brevemente, el protocolo de tinción intracelular fue idéntico al del apartado anterior, añadiendo los pasos específicos para esta tinción tras haber realizado el marcaje de superficie y antes de fijar las células. En función de la molécula intracelular a marcar, se utilizó un kit de permeabilización y fijación diferente para asegurar el mínimo marcaje inespecífico: el kit BD *Cytofix/Cytoperm (Fixation/Permeabilization solution kit*, BD Biosciences, cat. no. 554714) se utilizó para los marcajes de clamidia y citocinas, el kit *Fix and Perm* de Invitrogen (Medio A para la fijación, cat. no. GAS001S100 y medio B para la permeabilización, cat. no. GAS002S100) se utilizó para marcar el p24 viral intracelular y el kit *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set*

(eBiosciences, cat. no. 00-5523-00) se utilizó para los marcajes de factores de transcripción. En todos los casos, el protocolo utilizado fue similar:

1. Una vez marcadas las proteínas de superficie y lavadas las células, fueron fijadas mediante la solución correspondiente del kit.
2. Tras centrifugar y eliminar dicha solución, se añadió la solución permeabilizadora con los anticuerpos de trabajo (ver Tabla anexa 2, *Anticuerpos utilizados*).
3. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron dos últimos lavados de las células antes de fijarlas con la misma solución de PBS al 1% de PFA.
4. Finalmente, las células fueron adquiridas en el citómetro (BD LSRFortessa SORP), y los resultados analizados mediante el software FlowJo vX.0.7 (TreeStar).

## 7. Medida de citocinas en el sobrenadante

### 7.1. ELISA

Para la detección de estas citocinas se utilizaron nuevos kits comerciales de ELISA (Abcam, cat. no. ab46048 y ab108908), más sensibles que los utilizados en los co-cultivos de iNKTs y células HeLa. Mediante estos kits se midió la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  del tejido en respuesta a los diferentes glicolípidos con los que se incubó. Nuevamente, se siguieron las instrucciones de la casa comercial en cuanto a *buffers* a utilizar y protocolo experimental.

### 7.2. Luminex

Con algunos de los sobrenadantes del cultivo de tejido se llevó a cabo un ensayo Luminex para medir la secreción de diferentes citocinas de forma simultánea. El kit utilizado (Millipore, cat. no. HTH17MAG-14K) permitió medir los niveles de IL-17, IL-22, IL 13, IL-4, IL-12 (p70) y TNF- $\alpha$  de las muestras analizadas. Para ello, se siguió el protocolo descrito por la compañía en cuanto a *buffers* a utilizar y protocolo experimental.

## 8. Generación de un *stock* infeccioso de *Chlamydia trachomatis*

*Chlamydia trachomatis* es una bacteria parásita que necesita de una célula eucariota para crecer y completar su ciclo vital. En general, se utilizan líneas celulares epiteliales como huéspedes para generar *stocks* infecciosos de este patógeno, debido a que es el tipo celular que infecta preferentemente. Aunque se pueden utilizar líneas celulares tanto de ratón como de humano, en este trabajo se utilizaron las células HeLa (células epiteliales de origen cervical) para dicho fin.

### 8.1. Infección de células HeLa

Para la infección de células HeLa con *Chlamydia trachomatis* es necesario partir de una monocapa de células en un 80-90% de confluencia.

1. Descongelar un vial de *Chlamydia trachomatis* y llevarlo a RT.
2. Inocular la clamidia directamente al medio de cultivo de las células. El volumen necesario varía en función de la infectividad del inóculo pero, en general, añadir 100  $\mu$ l de inóculo a un *flask* confluyente de 25 cm<sup>2</sup> (Thermo Fisher, cat. no. 163371) con 6 ml de medio de cultivo.
3. Mezclar y centrifugar el *flask* durante 30 minutos a 754 x g, orientando la boca del mismo hacia el eje del rotor.
4. Descartar el medio infectado y añadir 6 ml de medio de cultivo de clamidia (ver *Recetas 6.*) a cada *flask*.
5. Incubar el *flask* a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas o hasta que se vean inclusiones en las células, desenroscando ligeramente su tapa para permitir el intercambio gaseoso.

### 8.2. Purificación de los EBs

Los cuerpos elementales (*elementary bodies*, EBs) de *Chlamydia trachomatis* son la forma infecciosa de este patógeno y crecen en el interior de la célula infectada. Por ello, es preciso purificarlos para poder reinfectar nuevas células y amplificar el tamaño del *stock*.

1. Despegar las células infectadas y crecidas en monocapa con la ayuda de un raspador para células (Thermo Fisher, cat. no. 11597692).
2. Pipetear la suspensión para deshacer los agregados celulares y transferir el volumen a un falcon de 50 ml.
3. Centrifugar a 2851 x g durante 10 minutos. Mientras tanto, preparar 10 ml de dH<sub>2</sub>O (agua destilada) al 10% de PBS y colocarla a -20 °C durante la centrifugación.
4. Decantar el sobrenadante y eliminar completamente el volumen restante. Resuspender el *pellet* en 1 ml del PBS diluido y frío por cada *flask* infectado. Para concentrar los EBs, añadir 1 ml de PBS por cada 2 o más *flasks* infectados, teniendo en cuenta el tamaño del *flask* utilizado y la cantidad de células infectadas.
5. Transferir a un tubo *bijou* (Thermo Fisher, cat. no. 11369123) que contenga 5-7 bolas estériles de cristal (Thermo Fisher, cat. no. 10375750).
6. Vortexear a máxima velocidad durante 1 minuto.
7. Transferir el volumen a un nuevo tubo y centrifugar durante 7 minutos a 400 x g.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo *bijou* o criotubo (dependiendo del volumen de trabajo) estéril, añadiendo el mismo volumen de *buffer* SPG (ver *Recetas 7.*). Almacenar a -80 °C.

### 8.3. Titulación del *stock* por inmunofluorescencia

Para conocer la infectividad del *stock* generado es necesario titularlo. Para ello, se inoculan diluciones seriadas de *Chlamydia trachomatis* sobre una monocapa de células

epiteliales y se cuenta el número de células infectadas al cabo de 48 horas mediante inmunofluorescencia.

1. Sembrar una placa de 96 con células HeLa. Para ello, tripsinizar un *flask* confluyente y diluirlo 1:12. Coger 3 ml de esa suspensión y mezclarlo con 7 ml de medio de cultivo. Sembrar 100  $\mu$ l de células por pocillo y dejarlas toda la noche en el incubador (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>).
2. Cuando los pocillos estén confluentes, infectar con diferentes diluciones de *Chlamydia trachomatis* (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>...) en un volumen final de 100  $\mu$ l.
3. Centrifugar durante 30 minutos a 754 x g.
4. Descartar el medio infectado y añadir 100  $\mu$ l de medio de cultivo de clamidia a cada pocillo.
5. Incubar hasta que se vean inclusiones maduras (48-72h) a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.
6. Reemplazar el medio con 100  $\mu$ l de PBS para lavar (x2).
7. Reemplazar el PBS con 100  $\mu$ l de metanol frío para fijar las células. Incubar a -20 °C durante 10 minutos.
8. Lavar dos veces con PBS.
9. Reemplazar el PBS con 100  $\mu$ l de PBS al 3% de BSA para bloquear uniones inespecíficas. Incubar durante 60 minutos a RT.
10. Reemplazar la solución de bloqueo con 100  $\mu$ l de anticuerpo contra clamidia marcado con FITC, diluido 200 veces en solución de bloqueo (Chemicon, cat. no. AB1120F). Incubar una hora a RT.
11. Lavar dos veces con 100  $\mu$ l de PBS y dejar en un volumen final de 250  $\mu$ l de PBS.
12. Observar la preparación en un microscopio invertido de fluorescencia, o dejar la placa a 4 °C hasta su examen.

## 9. Infección del tejido con *Chlamydia trachomatis*

Antes de evaluar el efecto de los glicolípidos sobre la infección por *Chlamydia trachomatis* en el tejido cervicovaginal humano, se infectaron una serie de tejidos con este patógeno para poner a punto tanto el protocolo de infección como los métodos de detección y cuantificación de dicha infección, lo que supuso un considerable esfuerzo teniendo en cuenta la escasa literatura existente sobre la infección de células primarias cervicales<sup>179</sup>.

### 9.1. Pruebas iniciales (*shaker/esponja/eppendorf*)

Se probaron diferentes métodos de infección para identificar aquel que mayores tasas de infección generaba. Todos ellos consistían en añadir directamente al tejido, o a su medio de cultivo, un inóculo del patógeno. Las diferentes opciones probadas fueron:

- A) Cultivar entre 5 y 8 bloques de tejido en una placa de 12 pocillos, con 1 ml de medio de cultivo (ver *Recetas 5.*) sin penicilina, y el volumen correspondiente de clamidia, a 37°C

durante 2 horas. Se probó a cultivar esta placa en un incubador estático y en uno en movimiento (300 rpm) para ver si la infección se favorecía en este proceso.

- B) Cultivar entre 5 y 8 bloques de tejido en una placa de 12 pocillos, con medio de cultivo sin penicilina, y el volumen correspondiente de clamidia, situando el tejido encima de una esponja de colágeno (Gelita-Spon Rapid<sup>3</sup>, Gelita Medical), con la mucosa orientada hacia arriba, para añadirle justamente encima el inóculo. En cada pocillo se añadió medio de cultivo hasta que quedase al nivel del tejido (2 ml, aproximadamente), y se dejó durante 2 horas a 37 °C antes de cambiar el medio por medio de cultivo fresco.
- C) Cultivar entre 5 y 8 bloques de tejido en un tubo eppendorf, con medio de cultivo sin penicilina, y el volumen correspondiente de clamidia, a 37 °C durante 2 horas en un termobloque con agitación (400 rpm).

## 9.2. Protocolo estandarizado

Tras todas estas pruebas, finalmente se estableció un protocolo estándar para la infección del tejido con este patógeno, consistente en colocar entre 6 y 8 piezas de tejido por pocillo, en una placa de 12, con la mucosa orientada hacia la parte superior. De esta forma, la clamidia se añadió directamente encima del epitelio, facilitando la infección del mismo. Estos tejidos, cultivados en medio R20 (RPMI al 20% de FBS) sin penicilina, se incubaron durante 2 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, tras lo que se cambió el medio infectado por medio R20 nuevo, manteniendo el tejido en cultivo durante 12 días, con cambios de medio periódicos (3-4 días) durante ese intervalo.

## 10. Inmunofluorescencia del tejido infectado

Uno de los métodos empleados para evaluar el grado de infección del tejido fue la inmunofluorescencia. Para ello, los tejidos de estudio fueron fijados e incluidos en medio óptimo para la criodisección (OCT), congelados y cortados con ayuda de un criotomo en láminas de entre 5 y 7 µm de grosor. Dichos cortes fueron recogidos en portaobjetos de cristal y almacenados a -80 °C hasta su utilización, siguiendo el protocolo descrito a continuación.

### 10.1. Inmunofluorescencia convencional

1. Atemperar los cortes de tejido a RT y dejarlos secar completamente antes de comenzar durante 20-30 minutos.
2. Fijar con 3,7% de formaldehido en PHEM *buffer* (ver *Recetas 8.*) durante 15 minutos a RT.
3. Lavas con PBS en agitación (4 lavados de 8 minutos).
4. Permeabilizar el tejido con 0,2% de tritón X-100 en PHEM *buffer* durante 10 minutos a RT.

5. Lavar rápidamente con PBS con ayuda de una pipeta Pasteur.
6. Bloquear con el *buffer* correspondiente (ver *Recetas HOPE 9.*) durante 1 hora a RT.
7. Incubar con el anticuerpo anti-clamidia (CT602: *C. trachomatis* species-specific MOMP monoclonal antibody, MAb6ciii/Goat anti-*Chlamydia trachomatis* FITC conjugated Polyclonal antibody, Chemicon, cat. no. AB1120F) a la dilución correspondiente (1:1000 para el CT602 y 1:200 para el de Chemicon) en *buffer* de bloqueo durante hora y media a RT en un ambiente húmedo y oscuro.
8. Lavar con PBS (como en el paso 3).
9. Incubar con el anticuerpo secundario diluido en PBS cuando sea necesario (Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse, Jackson ImmunoResearch, cat. no.715-605-150, dilución 1:1000) durante 1 hora en las mismas condiciones que el primario.
10. Lavar nuevamente con PBS.
11. Añadir una gota de medio de montaje con DAPI al tejido (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI, Life Technologies, Invitrogen, cat. no. P36931) y cubrir con el cubreobjetos. Dejar secar y sellar los extremos con esmalte de uñas. Observar al microscopio pasadas 24 horas.

## 10.2. Cytospin

En algunos casos, en vez de marcar el tejido íntegro por inmunofluorescencia, se prefirió digerir los bloques de tejido infectados para marcar la suspensión celular resultante mediante la técnica conocida como *cytospin*. Brevemente, una vez digerido el tejido (ver *Digestión del tejido*), 50 µl de la suspensión celular resultante, a una concentración de 1000 células/µl, fueron adheridos a un portaobjetos mediante centrifugación a 700 rpm durante 5 minutos. Una vez adheridas las células, se siguió el mismo protocolo utilizado para las inmunofluorescencias convencionales.

## 11. Infección del tejido con VIH

Del mismo modo que con *Chlamydia*, varios de los tejidos cervicovaginales fueron infectados con un aislado clínico de VIH-1 (cepa BaL) a fin de estudiar el efecto de los glicolípidos de trabajo en este contexto. Para ello, el protocolo estandarizado que se utilizó fue el siguiente:

1. Una vez cortadas, entre 8 y 12 piezas de ecto y endocérnix fueron incubadas a 37 °C en 310 µl de medio R20 (ver *Recetas 10.*) e infectadas con 40 µl de VIH-1 (TCID<sub>50</sub>= 3655), en una placa de 24 pocillos.
2. Tras dos horas, los bloques de tejido fueron lavados tres veces con PBS en una placa de 6 pocillos para eliminar los restos de virus.
3. Finalmente, se transfirieron 8 piezas de tejido por pocillo a una placa de 12 con 1 ml de medio R20.
4. De forma periódica (cada 3 ó 4 días), el medio de cultivo fue reemplazado por medio R20 fresco, manteniendo el tejido en cultivo durante 10-12 días antes de su digestión.

## 12. Migración de células infectadas fuera del tejido (*transwell*)

Para confirmar que las células preferentemente infectadas por el virus eran realmente las células de memoria residentes en el tejido, estudiamos la migración de esta población, una vez infectado el tejido, en respuesta a diferentes quimiocinas que deberían atraer fundamentalmente a las células no residentes: esfingosina-1-fosfato (S1P), CCL19 (MIP-3 $\beta$ ) y CCL21<sup>180</sup>. Para ello, cultivamos 8 piezas de tejido cervicovaginal por condición, infectado según lo descrito en el apartado anterior, durante 10 días. Pasado ese tiempo, transferimos el tejido de cada condición a un soporte con una membrana de policarbonato semipermeable (tamaño de poro: 5  $\mu$ m) que contenía 100  $\mu$ l de medio R20. Colocamos ese soporte en un pocillo de una placa de 24, con 600  $\mu$ l de medio R20 con 100 ng/ml de CCL19 y CCL21, y 10  $\mu$ M de S1P, y dejamos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante una noche. Al día siguiente, digerimos el tejido y marcamos, por separado, la suspensión celular resultante y las células presentes en la parte inferior del pocillo (migratorias) para analizarlas mediante citometría de flujo.

## 13. Cuantificación del ADN viral asociado a célula mediante PCR cuantitativa (qPCR)

Todas las suspensiones celulares purificadas mediante separación celular a partir del modelo de infección *ex vivo* o de las pacientes VIH<sup>+</sup> fueron inmediatamente lisadas con un medio específico para este fin que contenía proteinasa K: se dejaron a 55°C durante toda una noche y posteriormente a 95°C durante cinco minutos. Posteriormente, los lisados celulares se cuantificaron mediante qPCR utilizando *primers* contra repeticiones terminales largas (5'-TTAAGCCTCAATAAAGCTTGCC-3' en el caso del *forward* y 5'-GTTCGGGCGCCACTGCTAG-3' para la *reverse*, siendo 5'-CCAGAGTCACACACCAGACGGGCA-3' la secuencia de la sonda). Para cuantificar el ADN total del VIH-1 se utilizó una curva estándar utilizando el gen CCR5 para normalizar los resultados. Para esta amplificación, cada ciclo tuvo 4 fases: dos minutos a 50°C, diez minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se realizaron un total de 55 ciclos por muestra. La contribución de cada población al reservorio total de VIH se calculó considerando la frecuencia de cada población (obtenida mediante citometría de flujo) dentro del total de células CD4<sup>+</sup> y su frecuencia relativa de infección.

## 14. Ensayo de ADN proviral intacto (IPDA)

Las células T<sub>RM</sub> obtenidas mediante separación celular de dos pacientes en TAR fueron inmediatamente lisadas con un *buffer* de proteinasa K, tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Dos microlitros de estos lisados celulares fueron sometidos al ensayo IPDA, utilizando para ellos los *primers*, sondas y condiciones de PCR previamente descritas en la publicación original<sup>181</sup>.

## 15. Hibridación *in situ* de ARN viral e inmunohistoquímica del tejido cervical

Se obtuvieron muestras parafinadas de tejido cervical de pacientes virémicas o avirémicas en tratamiento antirretroviral del departamento de anatomía patológica de los Hospitales Universitarios Vall d'Hebron (HUVH) y Germans Trias i Pujol (HUGTP). La detección del ARN se llevó a cabo mediante el kit ultrasensible *RNAscope 2.5 HD Duplex Reagent* (Anacrome). Se utilizaron sondas específicas y de alta-sensibilidad contra la secuencia de ARN mensajero GagPol del VIH (bases 507-4601; referencia #317691)<sup>182</sup>. Se montaron secciones de tejido cervical de 5 µm de grosor en portaobjetos Superfrost Plus (Fisher Scientific) y el ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma breve, las muestras se desparafinaron con xileno y se rehidrataron con etanol al 100% antes de hacer una recuperación de antígenos por calor y una digestión con proteasa a modo de pre-tratamiento. A continuación, las sondas se incubaron durante dos horas a 40°C y las muestras se guardaron durante una noche en solución de citrato sódico 5X. El día siguiente se llevó a cabo una amplificación de la señal de las sondas contra ARN mediante una incubación secuencial con los reactivos indicados en el kit. Finalmente se llevó a cabo una inmunohistoquímica en esas mismas muestras para la detección de CD69, de forma similar a como se ha descrito anteriormente. En primer lugar, se realizó un bloqueo con tampón Tris 1X al 1% de seroalbúmina bovina y 10% de suero de mono durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó una incubación con anti-CD69 (1/100, Abcam) durante toda una noche a 4°C. Por último, la detección de este anticuerpo se realizó gracias al kit de detección DAB de Abcam, siguiendo las instrucciones del fabricante. Estas muestras se analizaron con la ayuda de una cámara digital DP71 (Olympus, Center Valley, PA, USA) conectada a un microscopio Olympus BX41. Los controles negativos consistieron en muestras apareadas sin la sonda específica y en muestras de pacientes no infectadas, mientras que las células fueron consideradas como positivas para ARN viral en base al diámetro de la tinción, por lo que las señales consistentes en pequeños puntos no se tomaron en cuenta durante la cuantificación<sup>182</sup>. El número total de células positivas se obtuvo mediante inspección visual de las muestras, y el área analizada se midió utilizando el programa ImageJ.

## 16. Recetas de los *buffers* y medios de cultivo

1. **Staining buffer:** 5% de suero de ratón y 5% de suero de cabra en PBS a pH 7'4, filtrado a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ .
2. **Buffer para la separación con beads contra iNKT:** PBS a pH 7'2 con 0'5% de BSA y 2 mM de EDTA.
3. **Medio de cultivo de células HeLa:** DMEM al 10% de FBS, 5000 U/ml de penicilina y 5 mg/ml de estreptomina.
4. **Medio de disección del tejido:** RPMI 1640 con 5  $\mu\text{g/ml}$  de anfotericina B, 1  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina, 5000 U/ml de penicilina y 5 mg/ml de estreptomina.
5. **Medio de cultivo del tejido:** RPMI 1640 al 15% de FBS, aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio (medio esencial mínimo), 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina, 2'5  $\mu\text{g/ml}$  de anfotericina B, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina.
6. **Medio de cultivo de clamidia:** DMEM al 10% de FBS, 10  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina y 1  $\mu\text{g/ml}$  de cicloheximida (solo añadida a los cultivos de células HeLa, no a los de tejido).
7. **SPG buffer:** 75 g/l de sacarosa,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1'74 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2'6 mM, 0'72 g/l de ácido L-glutámico en agua miliQ, ajustando el pH hasta 7'4.
8. **PHEM buffer:** PIPES 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM en  $\text{H}_2\text{O}$ , ajustando el pH hasta 6'9.
9. **HOPE buffer:** PBS al 10% de suero de cabra, 0'1% de Tritón X-100 y 0'2% de gelatina de pez.
10. **Medio R20 para infección con VIH:** RPMI 1640 al 20% de FBS con 10 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina



## **Resultados**



## **Capítulo 0: Puesta a punto del modelo de explante cervicovaginal**

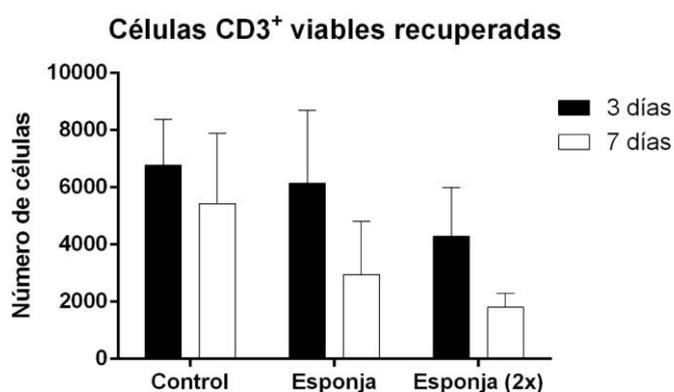


## 1. Antecedentes y objetivo

A la hora de comenzar a trabajar con un nuevo modelo de laboratorio, siempre es necesario poner a punto todas y cada una de las variables que intervienen en el mismo, desde el tipo de medio que se utiliza para cultivar la muestra hasta el tiempo que se mantiene la muestra en cultivo. Por ello, para comenzar a trabajar con el tejido cervicovaginal humano tomamos como referencia el trabajo publicado por Grivel y Margolis en 2009<sup>177</sup>, analizando las diferentes variables que en él se detallan para establecer aquellas que nos permitían recuperar un mayor número de células viables. Así, esta puesta a punto puede dividirse en dos etapas: la puesta a punto del modelo de cultivo en sí, y la del proceso de digestión y tinción de la suspensión celular obtenida, ya que la gran mayoría de los experimentos de la presente tesis se analizaron mediante citometría de flujo. De este modo, una vez establecido el circuito de recogida de las muestras, en colaboración con los cirujanos y el personal de anatomía patológica del hospital, se destinaron una serie de tejidos a estas pruebas preliminares.

## 2. Modelo de cultivo

En primer lugar, estudiamos la necesidad de incluir un soporte de colágeno en forma de esponja en las placas de cultivo, tal y como se describe en el protocolo de referencia. Este soporte simula la composición de la matriz extracelular del tejido, por lo que podría ayudar a mantener la integridad del mismo y evitar la dispersión de las células.



*Figura 1. Número de células CD3<sup>+</sup> viables recuperadas tras el cultivo de tejido cervicovaginal durante tres (negro) o siete (blanco) días, en presencia o ausencia de una esponja de colágeno simple o doble (n=3). Se representan la media y la desviación estándar de cada condición. El análisis estadístico mediante el test de Wilcoxon no reveló diferencias significativas.*

En la figura 1 se observa que, si bien la viabilidad de las células de interés (células CD3<sup>+</sup>) disminuía a medida que avanzaban los días de cultivo, el uso de este soporte (Esponja) no aumentaba la frecuencia de linfocitos CD3<sup>+</sup> viables recuperados, ni a 3 ni a 7 días de cultivo. De hecho, se estudió si al poner una capa doble de esponja (Esponja (2x), más parecida en cuanto a grosor a la que se detalla en el protocolo de Grivel y Margolis) la viabilidad de estas células variaba, pero no se observó ninguna mejora, incluso se vio una tendencia negativa. Por tanto, por razones prácticas y económicas, se decidió que los bloques de tejido se cultivarían directamente sobre el fondo plástico de la placa, cubriéndolos con el medio de cultivo correspondiente.

A continuación, se analizó el efecto que tenía la placa de cultivo utilizada sobre la viabilidad de estas células. Para ello, seis bloques de tejido fueron cultivados durante siete días en placas de 12 ó 24 pocillos, con 1 ml o 500  $\mu$ l del medio de cultivo estándar respectivamente. Posteriormente, el tejido fue digerido para determinar, mediante citometría de flujo, la cantidad de células CD3<sup>+</sup> viables presentes en cada una de las condiciones. Tal y como se observa en la figura 2, el cultivo en una placa de 12 pocillos permitió recuperar un mayor número de células T viables, por lo que se estableció este soporte como el estándar para los experimentos posteriores.

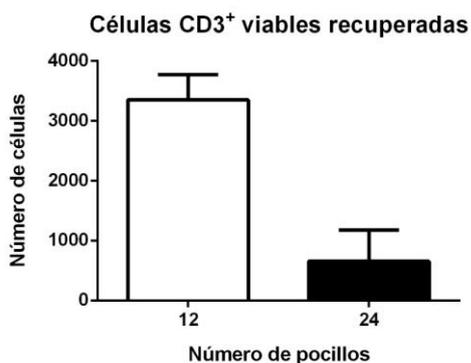


Figura 2. Número de células CD3<sup>+</sup> viables recuperadas tras el cultivo de tejido cervicovaginal en una placa de 12 (blanco) o 24 (negro) pocillos (n=3). Se representan la media y la desviación estándar de cada condición. El análisis estadístico mediante el test de Wilcoxon no reveló diferencias significativas.

### 3. Digestión del tejido y citometría

De forma paralela, también se establecieron las condiciones idóneas de digestión del tejido, basándonos de nuevo en lo descrito por Grivel y Margolis<sup>177</sup>. Se analizó la eficacia de diferentes enzimas en el proceso de disgregación del tejido, siendo la colagenasa IV a 5 mg/ml la que permitía recuperar un mayor número de células viables tras este proceso. También se estudió el efecto de la velocidad de agitación a la que se sometían las muestras durante el proceso de digestión enzimática, concluyendo que una agitación a 400 r.p.m. era suficiente para la obtención de una suspensión celular con un elevado porcentaje de células viables. Por último, se compararon dos métodos de disgregación mecánica del tejido tras la digestión con colagenasa: uno manual, utilizando una varilla de plástico para machacar el tejido en el propio eppendorf en el que se ha llevado a cabo la digestión enzimática (figura 3 izquierda), y otro automatizado, utilizando un disociador *gentleMACS* (Miltenyi Biotec, figura 3 derecha).

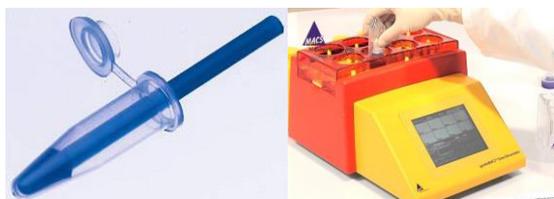


Figura 3. Varilla de plástico utilizada para la digestión manual del tejido (izquierda). Disociador *gentleMACS* utilizado para la digestión automática del tejido (derecha).

Pese a la comodidad que este segundo método presentaba, se observó que dicho proceso resultaba más agresivo para el tejido, puesto que el número de células vivas obtenidas tras el método automático era menor. Por ello, se decidió que el protocolo para la disgregación mecánica del tejido debía ser manual.

Finalmente, se estudió el efecto del tratamiento con colagenasa IV sobre diferentes marcadores de superficie, ya que estudios previos<sup>1</sup> habían descrito que la estabilidad de moléculas tales como CD56 disminuye drásticamente tras la digestión enzimática, dificultando los análisis de citometría. La estabilidad tras el tratamiento con colagenasa IV de todos los marcadores analizados en el presente estudio fue examinada previamente para asegurar que sus niveles de expresión en la superficie celular se mantenían.

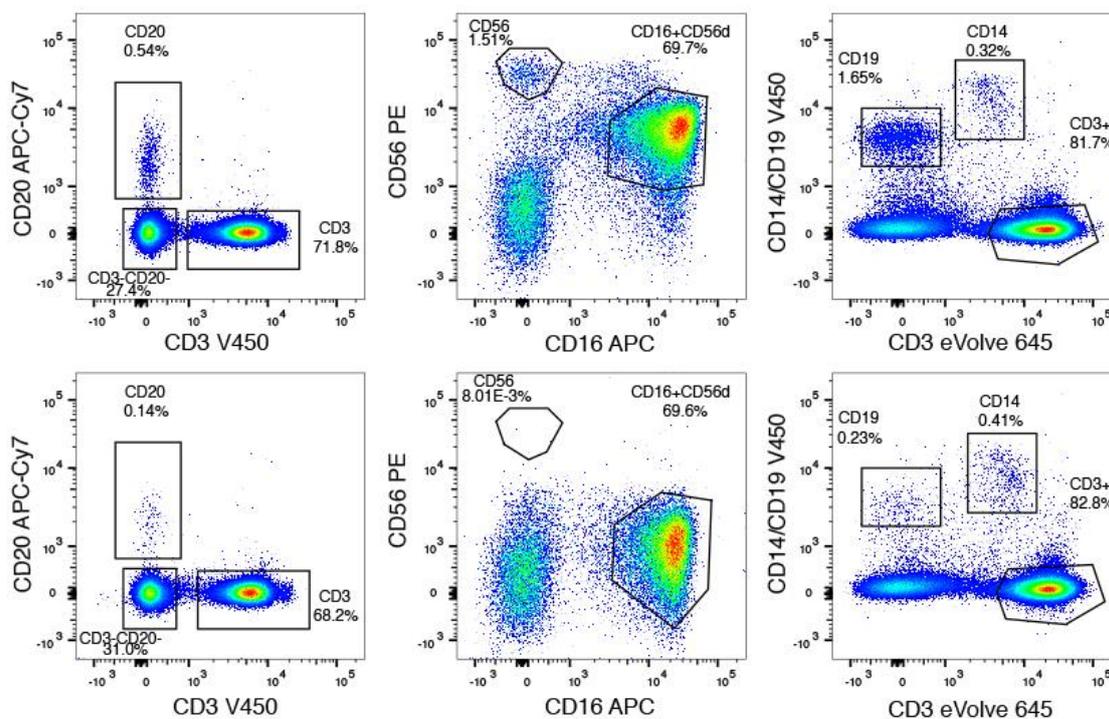


Figura 4. Expresión de diferentes marcadores de superficie por parte de células de sangre periférica en condiciones basales (fila superior) o tras el tratamiento con colagenasa (fila inferior).

En la figura 4 se muestran los niveles de expresión de ciertos marcadores en ausencia (fila superior) o presencia (fila inferior) de colagenasa IV. Cabe destacar que los marcadores clásicamente asociados a las células B (CD19 y CD20) disminuían considerablemente tras la digestión. Asimismo, en estos experimentos se observó que la expresión de CD56 prácticamente desaparecía, aunque cabe destacar que el efecto de la colagenasa variaba en función del lote utilizado. Por ello, ciertos marcadores conflictivos no fueron tenidos en cuenta en la mayoría de los análisis. Por el contrario, se corroboró que ciertos marcadores como CD3 o CD14 no se veían afectados por este proceso (independientemente del lote de colagenasa utilizado), lo que permitía identificar linfocitos T y células de origen mieloide. Una vez conocida toda esta información, se estableció la estrategia general de *gating* para los diferentes experimentos realizados (figura 5), la cual se basó en establecer primeramente una *gate* separada para los linfocitos y otra para las células de origen mieloide. Posteriormente, cada una de estas poblaciones fue analizada para excluir los dobletes y las células no viables del análisis, utilizando como marcador de viabilidad una sonda que penetra en aquellas células que tengan alterada su membrana externa, lo que compromete su supervivencia. Al tratarse de tejido digerido, se incorporó el marcaje con CD45 como parte de la estrategia general de *gating* para reducir la contaminación por otros tipos celulares de origen no hematopoyético. Finalmente, la fracción linfoide (figura 5, izquierda) se separó en linfocitos T (CD3<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup>) y el resto de linfocitos (CD3<sup>+</sup>

CD14<sup>-</sup>), dividiendo estos últimos en células NK CD16<sup>+</sup>/<sup>-</sup> y células B (CD1d<sup>+</sup>). Por su parte, las diferentes poblaciones mieloides (CD3<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, figura 5, derecha) se separaron en función de su expresión de CD11c y CD14 en dos grupos: CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> (tipo monocitos o dendríticas intersticiales) y CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> (tipo células dendríticas convencionales).

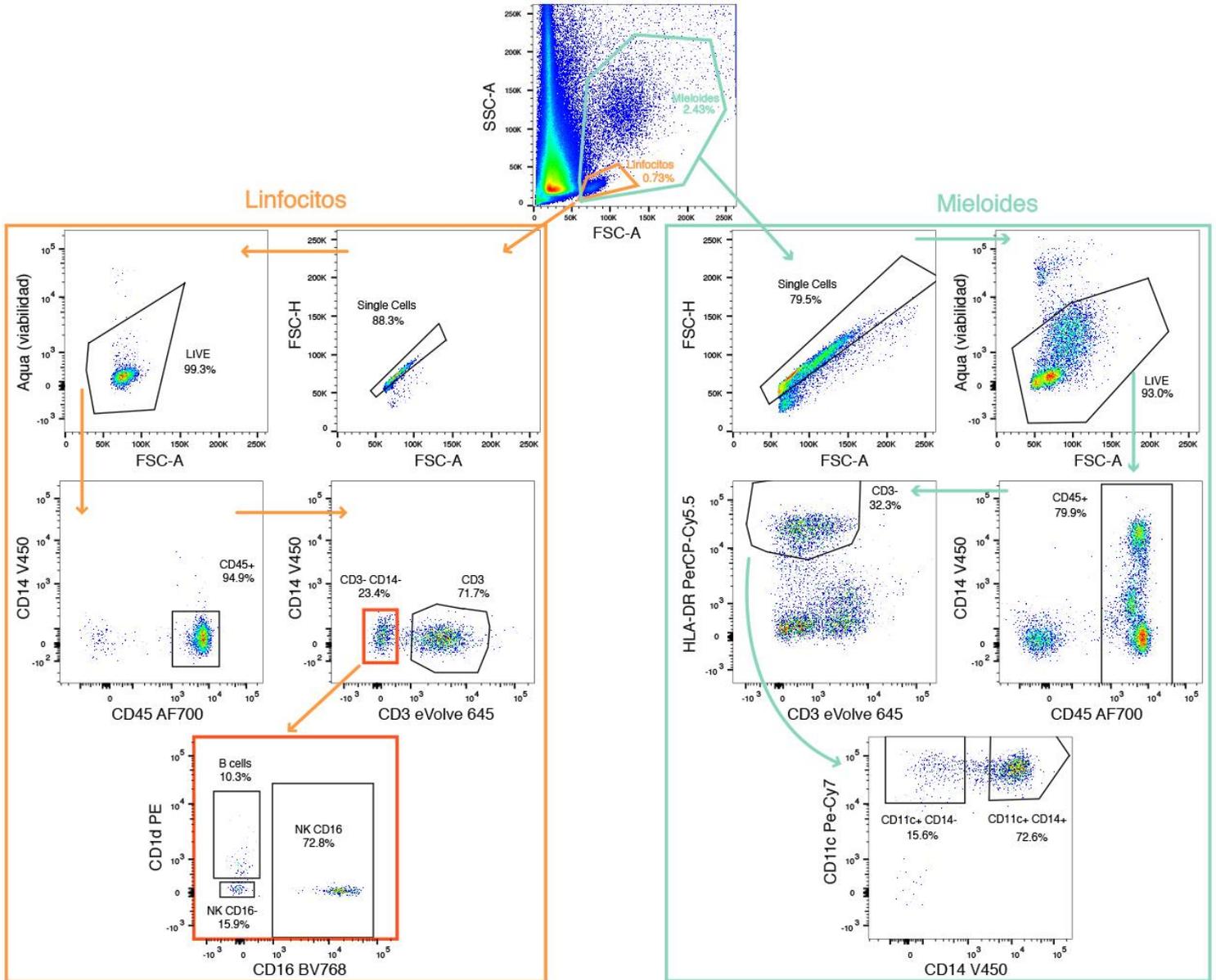


Figura 5. Ejemplo de estrategia de gating utilizada en algunos de los análisis de tejido cervicovaginal mediante citometría de flujo consistente en seleccionar los linfocitos y las células mieloides por separado, excluir los dobles y células no viables y seleccionar las células de origen hematopoyético (CD45<sup>+</sup>). Finalmente, los linfocitos T (izquierda, cuadro naranja) se seleccionaron en base a su expresión de CD3, mientras que las células B y NK se identificaron en base a su expresión de CD1d y CD16 a partir de las CD3<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup>. Por su parte, para identificar las células mieloides (derecha, cuadro verde), se excluyeron las células CD3<sup>+</sup> y se separaron las restantes en función de su expresión de CD11c y CD14.

Como resultado de estos experimentos, se obtuvieron las frecuencias basales de las diferentes poblaciones inmunes que se encuentran presentes en la mucosa cervicovaginal. Así, la figura 6 muestra las frecuencias de algunas poblaciones analizadas, tanto en ecto como en endocérvix.

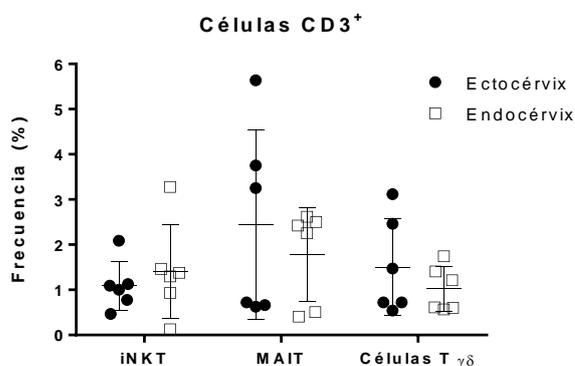


Figura 6. Frecuencias basales de células iNKT, MAIT y linfocitos T  $\gamma\delta$  a partir del total de CD3<sup>+</sup> en ectocérvix (negro) y endocérvix (blanco) (n=6). Las barras representan la media y la desviación estándar de los resultados. El análisis estadístico mediante el test de Wilcoxon no mostró diferencias significativas entre ambos tejidos.

El análisis estadístico reveló que la distribución de estos tipos celulares entre ambos tejidos no presentaba diferencias significativas ( $p > 0,05$  en todos los casos), si bien es cierto que se apreció una variabilidad considerable entre individuos. A pesar de la baja frecuencia de estas poblaciones en el tejido cervicovaginal, constatamos que realmente éramos capaces de detectarlas mediante citometría de flujo, por lo que era posible analizarlas en detalle. Por el contrario, otras poblaciones como los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y las células mieloides presentaron frecuencias mucho más elevadas, tal y como se había descrito en la literatura<sup>1</sup> (datos no mostrados).



**Capítulo 1: Efecto de los derivados de la  $\alpha$ GC frente a las infecciones de transmisión sexual**



## 1. Antecedentes y objetivo

El papel protector de la  $\alpha$ GC en el ámbito del cáncer mediante la estimulación de las células iNKT ha sido ampliamente estudiado<sup>170-172</sup>. Sin embargo, la anergia que este compuesto induce en dicha población tras repetidas administraciones ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar derivados sintéticos de la  $\alpha$ GC capaces de superar esta limitación<sup>169</sup>. Diferentes grupos han generado este tipo de moléculas con el objetivo de incluirlas como parte de una vacuna frente a enfermedades tales como la gripe<sup>173</sup> o la malaria<sup>174</sup>, poniendo de manifiesto su capacidad para generar una respuesta CD8 eficaz. Por otro lado, también se busca que estos nuevos moduladores de las células iNKT permitan polarizar la respuesta inmune que se genere hacia el perfil Th más eficaz para controlar la infección<sup>168</sup>. Teniendo todo esto en mente, en esta primera parte del trabajo nos centramos en analizar la respuesta inmunitaria que inducía en la mucosa cervicovaginal una batería de compuestos estructuralmente similares a la  $\alpha$ GC, diseñados por nuestro colaborador, el Dr. Amadeu Llebaría. El objetivo principal era ver si alguno de ellos era capaz de inducir una respuesta Th1 más potente que el compuesto original, con el fin de generar una respuesta protectora frente a *Chlamydia trachomatis*, sin dejar de tener en cuenta otro tipo de respuestas inmunitarias que podrían ser también de interés. Para ello, en primer lugar se hizo un amplio *screening* de las diferentes moléculas para estudiar su actividad mediante diversas técnicas, y una vez se hubieron descartado las menos activas, comenzamos a probar las más prometedoras en el modelo de explante cervicovaginal.

## 2. Screening inicial de los compuestos

Este análisis inicial se realizó de forma simultánea mediante diferentes técnicas, en diversos laboratorios independientes.

### 2.1. ELISA en líneas celulares de iNKT

Por un lado, nuestros colaboradores de la Universidad Autónoma de Barcelona (Lorena Usero y Carme Roura) midieron mediante ELISA la concentración de diversas citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-13) en los sobrenadantes de diferentes líneas de células iNKT (generadas a partir de células primarias) que habían sido incubadas con esta batería de compuestos. Dichos resultados forman parte de la tesis de la doctora Usero (*Estudi de la funció supressora de les cèl·lules iNKT en el control de la resposta autoimmunitària a la Diabetis Tipus 1 humana*), por lo que no se muestran aquí, pero se tuvieron en cuenta a la hora de descartar los compuestos con menor actividad ya que, además, coincidían con los resultados obtenidos por otras vías.

### 2.2. ELISPOT en donantes sanos

Por otro lado, colaboradores de IrsiCaixa (Esther Jiménez y Julia G. Prado) llevaron a cabo ensayos ELISPOT para medir la secreción de IFN- $\gamma$  producida por PBMCs de donantes sanos, en respuesta a los diferentes compuestos, a tres concentraciones diferentes (10 ng/ml, 100 ng/ml y 1  $\mu$ g/ml).

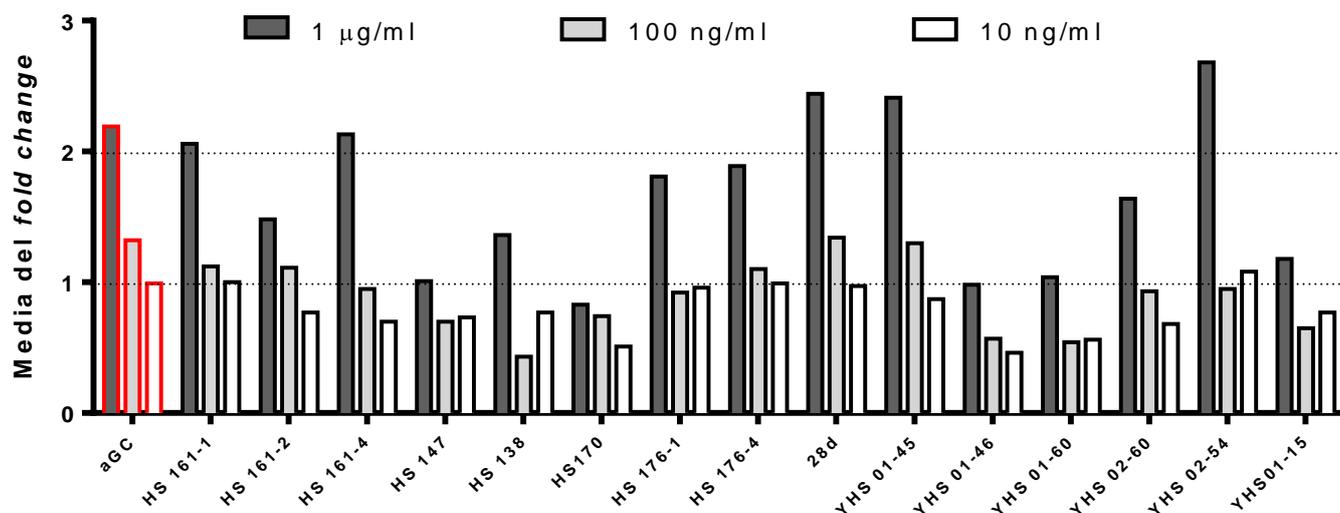


Figura 1. Fold change medio de la cantidad de puntos observados en el cultivo de células de sangre periférica a diferentes concentraciones de glicolípido (1 µg/ml, negro; 100 ng/ml, gris; y 10 ng/ml, blanco). El fold change se obtuvo al dividir el número medio de puntos en respuesta a un glicolípido en tres donantes diferentes (n=3) entre el número medio de puntos en los controles negativos correspondientes.

En la figura 1 se representa esta secreción de IFN- $\gamma$  en forma de *fold change*. Debido a la falta de reproducibilidad entre individuos (alta dispersión de los datos), y al bajo número de puntos positivos que se observaron en la mayoría de los pocillos en comparación con los pocillos control (sin glicolípido, ruido de fondo), se escogió esta representación del *fold change* para identificar de forma más clara qué compuestos debían ser tenidos en cuenta. Se observó una clara diferencia entre la administración de glicolípidos a 1 µg/ml y a las otras dos concentraciones, ya que en algunos casos (HS161, 28d, YHS-01-45, YHS-02-54,  $\alpha$ GC) llegaron a presentar más del doble de puntos que el control negativo (*fold change* > 2). De hecho, la presencia de 100 ng/ml y 10 ng/ml de estas moléculas indujo, en gran parte de los casos, menos secreción de IFN- $\gamma$  que en la condición control (*fold change* < 1). Representando estos datos agrupados por glicolípido podemos observar una respuesta dosis-dependiente bastante clara en casi todos los casos. Así, en comparación con la  $\alpha$ GC, se reafirma que los compuestos más relevantes en cuanto a la cantidad de IFN- $\gamma$  que son capaces de generar mediante esta técnica son HS161 (tanto 1 como 4), 28d, YHS-01-45 e YHS-02-54. Por su parte, HS176 también presenta un perfil similar, aunque ligeramente menos potente.

### 2.3. Co-cultivo de células HeLa-CD1d<sup>high</sup> y células iNKT primarias: ELISA y Luminex

Por último, en nuestro laboratorio, co-cultivamos células iNKT aisladas de la sangre de diferentes donantes sanos con células HeLa transfectadas con un plásmido que aumenta su expresión de CD1d. Estas células HeLa actúan como células presentadoras de antígeno, de forma que las iNKT pueden interactuar con el glicolípido. Como ya se ha comentado en la introducción, la frecuencia de esta población es realmente baja (0,1-0,2% del total de las células T en sangre periférica<sup>183</sup>), por lo que en cada ronda de experimentos se aislaron las iNKT de

varios donantes, y aquellos con la mayor frecuencia de esta población fueron los utilizados en estos ensayos. De forma representativa, en la figura 2 se puede ver la frecuencia de iNKT del total de PBMCs en dos donantes aleatorios. En todos los casos, la frecuencia de esta población se determinó en base a su co-expresión de CD3 y  $V\alpha 24J\alpha 18$ , estudiada mediante citometría de flujo.

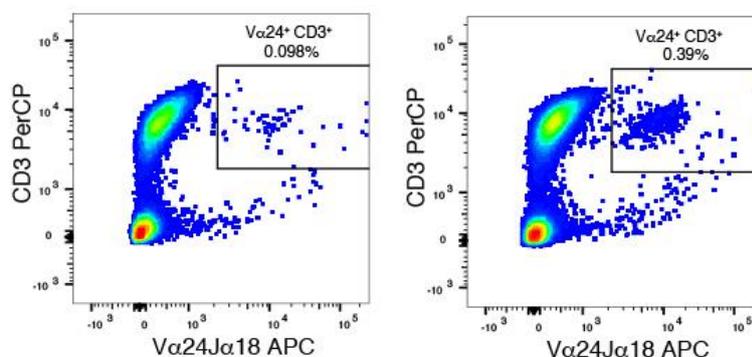


Figura 2. Dot plot representativo de la frecuencia de células iNKT (identificadas como CD3<sup>+</sup> Vα24Jα18<sup>+</sup>) en la sangre periférica de dos donantes diferentes, obtenido mediante citometría de flujo.

El sobrenadante de estos co-cultivos fue recogido y analizado mediante ELISA para medir la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de las iNKT. Cada glicolípido fue analizado a tres concentraciones diferentes (10 ng/ml, 100 ng/ml y 1  $\mu$ g/ml) en un mínimo de 4 donantes y un máximo de 8. En esta serie de experimentos se incluyó un nuevo compuesto, HS22, considerado un control negativo debido a que experimentos previos de cristalografía demostraron que presentaba una baja afinidad por el CD1d en comparación con el resto de compuestos. La figura 3 muestra los resultados obtenidos en este experimento.

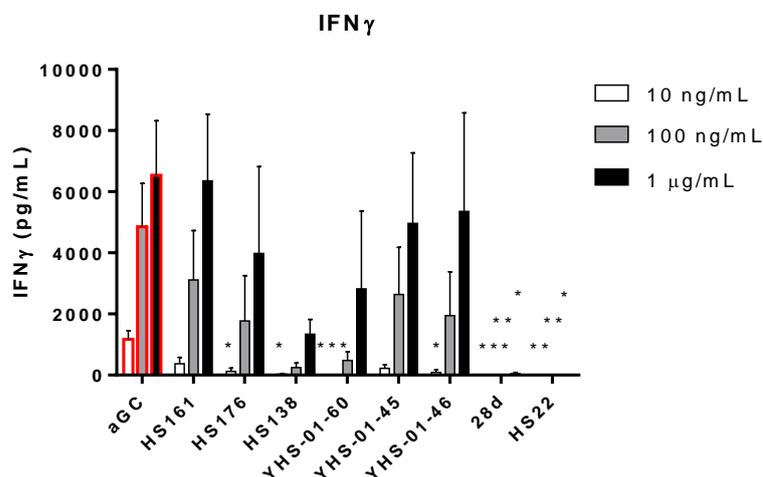


Figura 3. Secreción de interferón- $\gamma$  (medido en pg/ml) en los co-cultivos de células HeLa CD1d<sup>high</sup> y células iNKT primarias aisladas de la sangre de donantes sanos (n=4-8), en presencia de diversos glicolípidos a tres concentraciones diferentes: 10 ng/ml (blanco), 100 ng/ml (gris) y 1  $\mu$ g/ml (negro). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante la comparación múltiple ANOVA. Las barras representan la media y desviación estándar de los resultados.

En primer lugar, se observa una respuesta dosis-dependiente en prácticamente todos los casos. No obstante, en comparación con la molécula de referencia ( $\alpha$ GC, primera columna), de media, ninguno de los glicolípidos estudiados genera una mayor secreción de IFN- $\gamma$  a ninguna de las tres concentraciones estudiadas. Aún así, cabe destacar que ciertos compuestos (HS161, YHS-01-46 e YHS-01-45) sí inducen unos niveles de IFN- $\gamma$  similares a los de la  $\alpha$ GC, especialmente a la concentración más alta (1  $\mu$ g/ml), y que la variabilidad entre individuos es elevada. También se observa que otros compuestos (28d, y el control negativo HS22) no parecen generar secreción de IFN- $\gamma$  en este modelo a ninguna de las concentraciones estudiadas. En cuanto a la concentración más baja (10 ng/ml), prácticamente ninguna de las moléculas de estudio estimula una producción de IFN- $\gamma$  relevante, lo que dificulta compararlas entre sí. Por su parte, la concentración intermedia (100 ng/ml) mostró un efecto suficiente como para ver secreción de IFN- $\gamma$  en la mayoría de los casos y discriminar entre los diferentes compuestos. Además, debido a que era la concentración más utilizada en la literatura y que resultaba menos tóxica que la concentración superior, se decidió que era la adecuada para la siguiente etapa del proyecto.

Posteriormente, los sobrenadantes de estos co-cultivos se analizaron mediante Luminex para estudiar la secreción de diferentes citocinas, con el fin de tener una visión más global del efecto que inducían los glicolípidos en las células iNKT. Brevemente, esta técnica consiste en la utilización de *beads* conjugadas a multitud de anticuerpos diferentes capaces de reconocer un amplio abanico de citocinas presentes en una misma muestra de forma simultánea. La detección de todas estas *beads* se realiza mediante citometría de flujo, y permite cuantificar la concentración de dichas citocinas en la muestra problema. Además, esta prueba se realiza en una placa, de forma similar al ELISA, lo que posibilita analizar hasta 96 muestras al mismo tiempo.

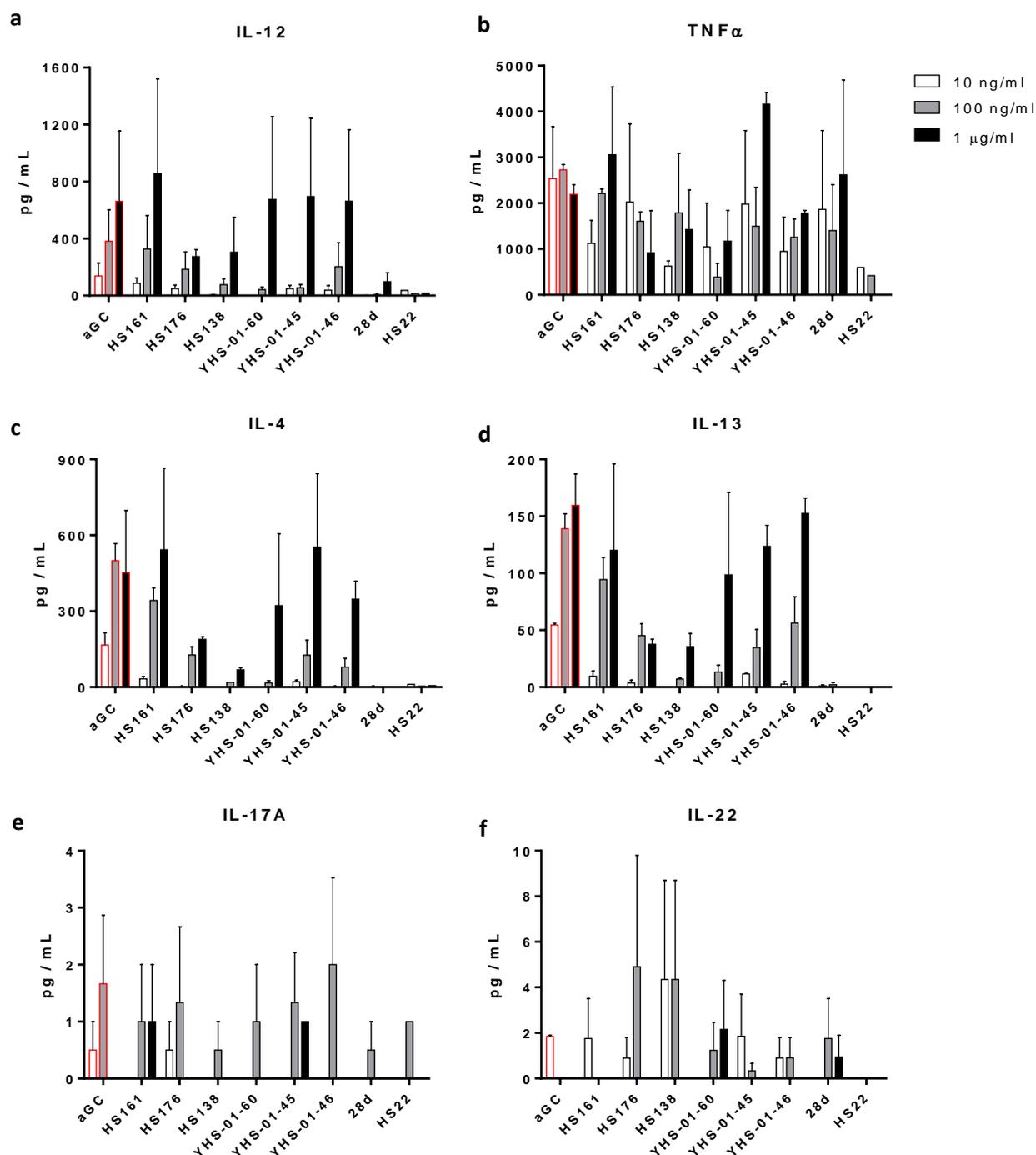


Figura 4. Secreción de diferentes citocinas (medidas en pg/ml) en los co-cultivos de células HeLa CD1d<sup>high</sup> y células iNKT primarias aisladas de la sangre de donantes sanos (n=2-3), en presencia de diversos glicolípidos a tres concentraciones diferentes: 10 ng/ml (blanco), 100 ng/ml (gris) y 1 μg/ml (negro). El análisis estadístico mediante la comparación múltiple ANOVA no mostró diferencias significativas. Las barras representan la media y la desviación estándar de los resultados.

En este experimento se vio que la capacidad de inducir secreción de IL-12 (asociada con una polarización Th1) de todas las moléculas era bastante limitada, salvo a la concentración más alta, especialmente en el caso de YHS-01-60, YHS-01-45 e YHS-01-46 (figura 4 a). Por su parte, HS161 mostró un comportamiento similar al de la  $\alpha$ GC a las tres concentraciones estudiadas. También se observó que prácticamente todos los compuestos generaban una síntesis de TNF- $\alpha$ ,

en mayor o menor medida (figura 4 b), siendo HS161 e YHS-01-45 los más destacados y consistentes, especialmente a la concentración más elevada. En cuanto a la secreción de citocinas asociadas a un perfil Th2, de nuevo observamos que la administración de 1 µg/ml del glicolípido de estudio originaba una mayor concentración tanto de IL-4 como de IL-13 en los sobrenadantes analizados, siendo de nuevo el conjunto formado por HS161, YHS-01-60, YHS-01-45 e YHS-01-46 los que mayor capacidad inductora presentaban (figura 4 c y d). Sin embargo, en comparación con la secreción de citocinas de perfil Th1 (IL-12 e IFN-γ), esta capacidad era cuantitativamente inferior aun teniendo en cuenta la dispersión de los resultados. Por último, las bajas concentraciones de IL-17A e IL-22 halladas en estas muestras pusieron de manifiesto la incapacidad de todos estos compuestos de originar una respuesta Th17 o Th22 (figura 4 e y f) a ninguna de las dosis estudiadas en células de sangre periférica.

### 3. Efecto de los glicolípidos en el tejido cervicovaginal

Una vez optimizadas las condiciones de cultivo y digestión del tejido, se realizaron las primeras pruebas con glicolípidos para estudiar su efecto sobre las poblaciones inmunitarias de la mucosa cervical femenina.

#### 3.a) Estrategias de distribución (delivery)

El primer paso en esta etapa de la investigación fue identificar la estrategia de distribución más adecuada para asegurar que el glicolípido penetrase en el tejido y llegase hasta las células de interés. Para ello, se probaron diferentes métodos:

- ◆ **Adición del glicolípido directamente al medio de cultivo del tejido intacto.** Esta estrategia no nos permitió ver cambios en la frecuencia de las diferentes poblaciones inmunitarias presentes en el tejido (linfocitos T, NK, células mieloides, etc.), ni en su estado de activación, probablemente debido a la dificultad del glicolípido para penetrar en el tejido, por lo que fue descartada.
- ◆ **Digestión del tejido y adición del glicolípido a la suspensión celular resultante.** La digestión del tejido es un proceso muy agresivo para las células que lo componen, puesto que implica una digestión enzimática con colagenasa seguida de una digestión mecánica. Con este protocolo vimos que la viabilidad de las células mieloides (la de las dendríticas especialmente) quedaba comprometida, y estas poblaciones desaparecían o disminuían considerablemente tras varios días en cultivo, por lo que también se descartó.
- ◆ **Adición del glicolípido junto con un antígeno proteico.** Viendo las dificultades de los glicolípidos para modular las células diana por sí solos, decidimos administrarlos a la vez que un antígeno proteico, basándonos en estudios previos que afirmaban que la combinación de αGC con otro antígeno de naturaleza no

lipídica resultaba más eficaz que la administración de los compuestos por separado<sup>178, 184</sup>. Hicimos pruebas con dos proteínas diferentes, una general (ovoalbúmina) y otra específica de clamidia (factor de actividad tipo proteasa de clamidia, CPAF), sin observar una mayor respuesta en ninguno de los dos casos. Por ello, decidimos que esta estrategia tampoco nos ayudaba a estudiar el efecto de los glicolípidos.

- ◆ **Adición del glicolípido junto con una quimiocina (MIP-3 $\beta$ ).** Finalmente, decidimos tratar a la vez el tejido con los compuestos a estudiar y una quimiocina (MIP-3 $\beta$ , también conocida como CCL19) para atraer células al medio y facilitar, por un lado, su acceso al glicolípido, y por otro, la interacción entre los diferentes tipos celulares de interés (APCs e iNKTs). En la figura 5 se puede ver que esta combinación, comparada con la adición de ambos compuestos por separado, permitía recuperar un mayor número de células iNKT. Paralelamente, también se observó un aumento considerable en la expresión de CD69 por parte de las células NK, indicativo de un mayor estado de activación.

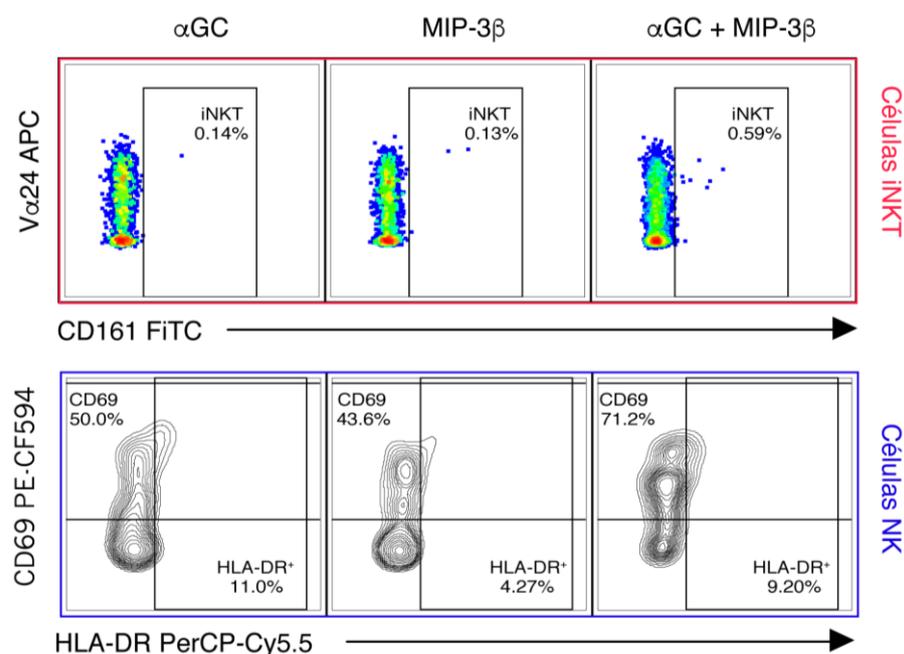


Figura 5. Dot plots de citometría correspondientes a tejido cervicovaginal digerido de donantes sanas. En respuesta a diferentes estímulos ( $\alpha$ GC, columna izquierda; MIP-3 $\beta$ , columna central; y combinación de ambos, columna derecha), se ilustran la frecuencia de células iNKT (fila superior) y la expresión de CD69 y HLA-DR por parte de las células NK (fila inferior).

Por su parte, si atendemos a las células mieloides, esta combinación también resultó ser más eficaz a la hora de generar un fenotipo de carácter adyuvante en dos poblaciones: las CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> (de fenotipo similar a las células dendríticas) y las CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> (de fenotipo similar a los monocitos). Los marcadores que analizamos para determinar este fenotipo adyuvante fueron CD1d (molécula perteneciente al MHC que utilizan las APC para presentar los glicolípidos al resto

de poblaciones) y CD40 (una proteína coestimuladora expresada por las APC y necesaria para su activación). Como puede verse en la figura 6, estos dos compuestos en conjunto causaron un considerable incremento en la frecuencia de CD40 en ambas poblaciones, mientras que la frecuencia de CD1d prácticamente no varió en las CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup>, y disminuyó ligeramente en las CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>. Sin embargo, la fracción de células que expresaba ambos marcadores (CD1d y CD40) aumentó de manera significativa tras la incubación con ambos estímulos de forma simultánea, por lo que se decidió que esta debía ser la estrategia de trabajo para valorar el efecto de los diferentes derivados de la  $\alpha$ GC.

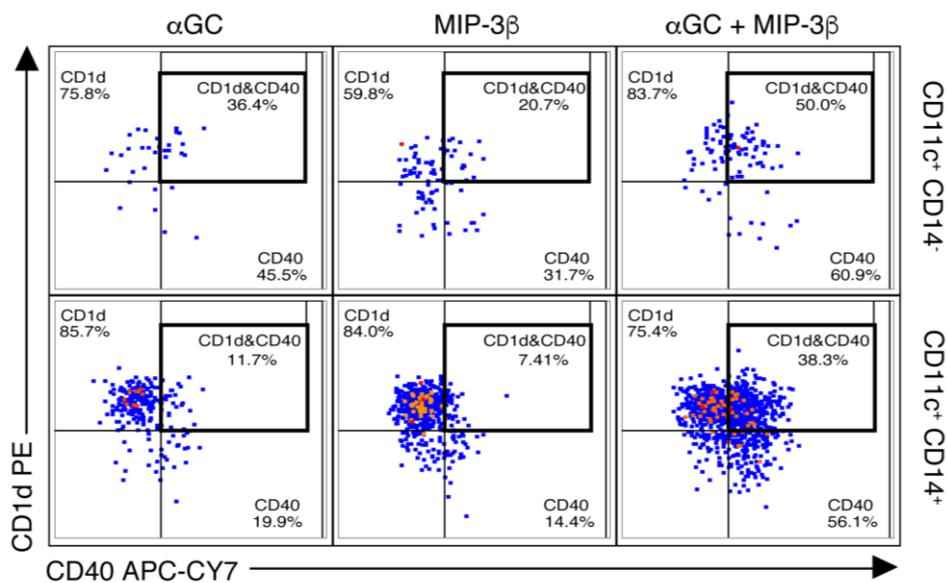


Figura 6. Dot plots de citometría correspondientes a tejido cervicovaginal digerido de donantes sanas. En respuesta a diferentes estímulos ( $\alpha$ GC, columna izquierda; MIP-3 $\beta$ , columna central; y combinación de ambos, columna derecha), se ilustran la expresión de CD1d y CD40 en células CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> (fila superior) y CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> (fila inferior).

### 3.b) Secreción de citocinas al medio (ELISA sensible)

Una vez establecidas las condiciones óptimas de estimulación del tejido con los diferentes compuestos, se estudió su capacidad de inducir secreción de citocinas al medio. Para ello, cinco piezas de tejido se incubaron durante toda una noche en presencia de MIP-3 $\beta$  y el glicolípido correspondiente a 100 ng/ml. A la mañana siguiente, se recogió el sobrenadante de esos cultivos y se almacenó a -80 °C hasta el día en que se analizó la presencia de IFN- $\gamma$  en el mismo mediante un kit de ELISA específico para esta citocina, de mayor sensibilidad que la mayoría de kits estándar (Abcam, ab46048). Pese a esta mayor sensibilidad, tal y como puede verse en la figura 7, no se detectaron grandes cantidades de interferón en respuesta a ninguno de los compuestos, ni siquiera en el caso de la  $\alpha$ GC. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el sistema de co-cultivo de las células iNKT con células HeLa CD1d<sup>high</sup>, donde éramos capaces de detectar hasta mil veces más IFN- $\gamma$  utilizando la misma concentración de glicolípido. Sin embargo, no hay que olvidar que, en este caso, se trataba de bloques de tejido cervicovaginal en los que la fracción de

iNKT ronda el 0,1% del total de células  $T^{185}$ , por lo que era de esperar que la cantidad total de IFN- $\gamma$  detectado fuera mucho menor. Además, se observó una elevada variabilidad entre individuos ( $n=4-6$ ), lo que dificulta aún más extraer conclusiones fiables. Pese a todos estos factores, YHS-01-60, YHS-01-46 e YHS-01-45 resultaron ser los compuestos que mayor secreción de IFN- $\gamma$  generaban en comparación con la  $\alpha$ GC (línea roja punteada).

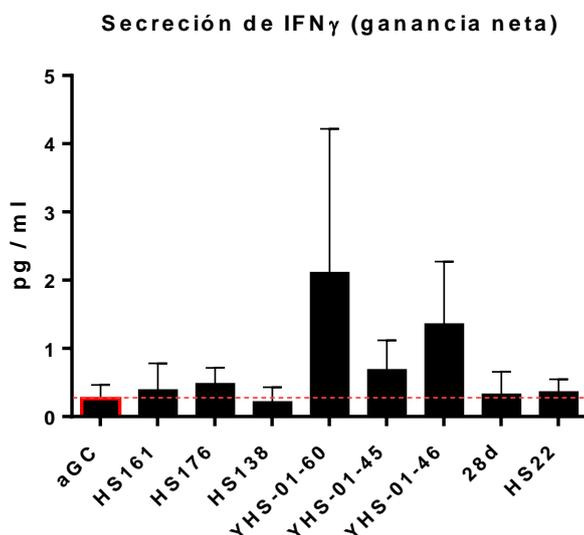


Figura 7. Secreción de IFN- $\gamma$ , en pg/ml, por parte del tejido cervicovaginal en respuesta a 100 ng/ml de glicolípido y MIP-3 $\beta$  tras una noche en cultivo. La secreción se muestra en forma de ganancia neta, resultado de restar el valor del control negativo con MIP-3 $\beta$  a cada muestra correspondiente ( $n=4-6$ ). La línea punteada representa el valor correspondiente a la  $\alpha$ GC. La comparación mediante ANOVA no mostró ningún resultado significativo. Las barras representan la media y la desviación estándar de los resultados

Por otro lado, en esos mismos sobrenadantes ( $n=4-6$ ) se cuantificó la presencia de TNF- $\alpha$  utilizando un kit de la misma compañía para la detección de esta citocina mediante ELISA (Abcam, ab108908). En este caso, el rango de detección era mil veces superior (en el orden de los nanogramos frente a los picogramos del kit anterior), y se correspondía con lo que habíamos observado en el Luminex. Tal y como se ilustra en la figura 8, los compuestos con mayor actividad fueron HS161, YHS-01-45, YHS-01-46 y 28d en este caso. Contrasta especialmente la falta de TNF- $\alpha$  que se aprecia en respuesta a YHS-01-60, ya que este era el compuesto que mayor tasa de secreción de IFN- $\gamma$  presentaba. De nuevo, cabe destacar que, pese a ser el compuesto de referencia,  $\alpha$ GC es uno de los compuestos que menor secreción de TNF- $\alpha$  origina (línea roja punteada), si bien es cierto que la alta variabilidad de los resultados socava de nuevo la robustez de los mismos. Aun así, se observó que la capacidad de secreción de TNF- $\alpha$  del tejido es mil veces superior a la de secreción de IFN- $\gamma$ , lo que se explica, en parte, porque esta citocina se presenta en las primeras fases de la respuesta inmune para causar una estimulación general de las diferentes poblaciones inmunitarias<sup>186</sup>, mientras que el IFN- $\gamma$  forma parte de una respuesta Th1, más específica y dependiente de patógeno.

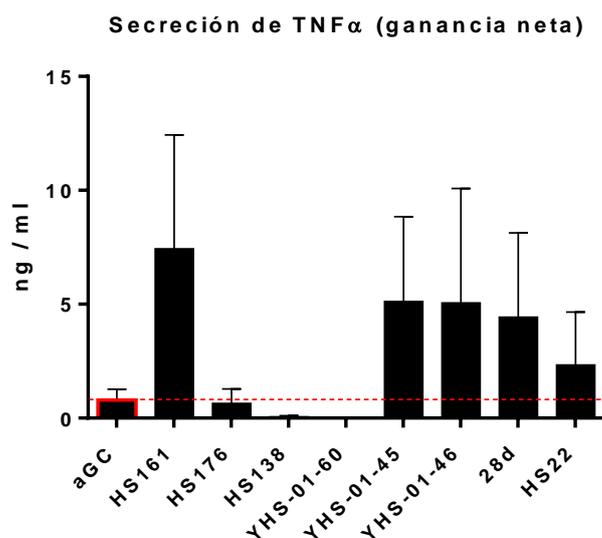


Figura 8. Secreción de TNF- $\alpha$ , en ng/ml, por parte del tejido cervicovaginal en respuesta a 100 ng/ml de glicolípido y MIP-3 $\beta$  tras una noche en cultivo. La secreción se muestra en forma de ganancia neta, resultado de restar el valor del control negativo con MIP-3 $\beta$  a cada muestra correspondiente ( $n=4-6$ ). La línea punteada representa el valor correspondiente a la  $\alpha$ GC. La comparación mediante ANOVA no mostró ningún resultado significativo. Las barras representan la media y la desviación estándar de los resultados.

En base a todos los resultados presentados hasta ahora, se decidió que HS161 e YHS-01-45 (YHS-45 a partir de ahora) eran los glicolípidos más prometedores para continuar con las siguientes pruebas. De manera adicional, se decidió utilizar HS138 como control negativo en dichos experimentos.

### 3.c) Fenotipo adyuvante

Teniendo en cuenta la aplicación para la que se pretendían utilizar estos glicolípidos (adyuvantes en vacunas contra enfermedades de transmisión sexual), otro de los parámetros interesantes a la hora de valorar su actividad era su capacidad para inducir un fenotipo adyuvante en las células presentadoras de antígeno presentes en el tejido.

De este modo, a partir de muestras procedentes de cinco pacientes diferentes, ocho bloques de ecto y endocérnix fueron cultivados durante una noche en presencia de 100ng/ml del glicolípido a estudiar y 100 ng/ml de MIP-3 $\beta$ , para atraer al medio las células de interés y facilitar, tanto el acceso de las células presentadoras de antígeno a los compuestos, como el encuentro entre estas APC y las células diana. A la mañana siguiente, las células migratorias fueron recogidas; los sobrenadantes de cultivo, almacenados para posteriores experimentos; y los bloques de tejido, descartados. Estas células migratorias fueron marcadas con diferentes anticuerpos para su análisis mediante citometría de flujo, utilizando para ello un panel que incluía diversas moléculas asociadas con fenotipos de activación y maduración. Los anticuerpos utilizados para este experimento se detallan en la tabla anexa 2.

Uno de estos marcadores fue el CD1d, que como ya se ha comentado, permite la presentación antigénica de los glicolípidos por parte de las APC. La frecuencia de este marcador se estudió nuevamente en dos poblaciones de carácter mielóide ( $CD3^-$  HLA-DR $^+$ ):  $CD11c^+ CD14^-$  (de fenotipo similar a las células dendríticas) y  $CD11c^+ CD14^+$  (de fenotipo similar a los monocitos).

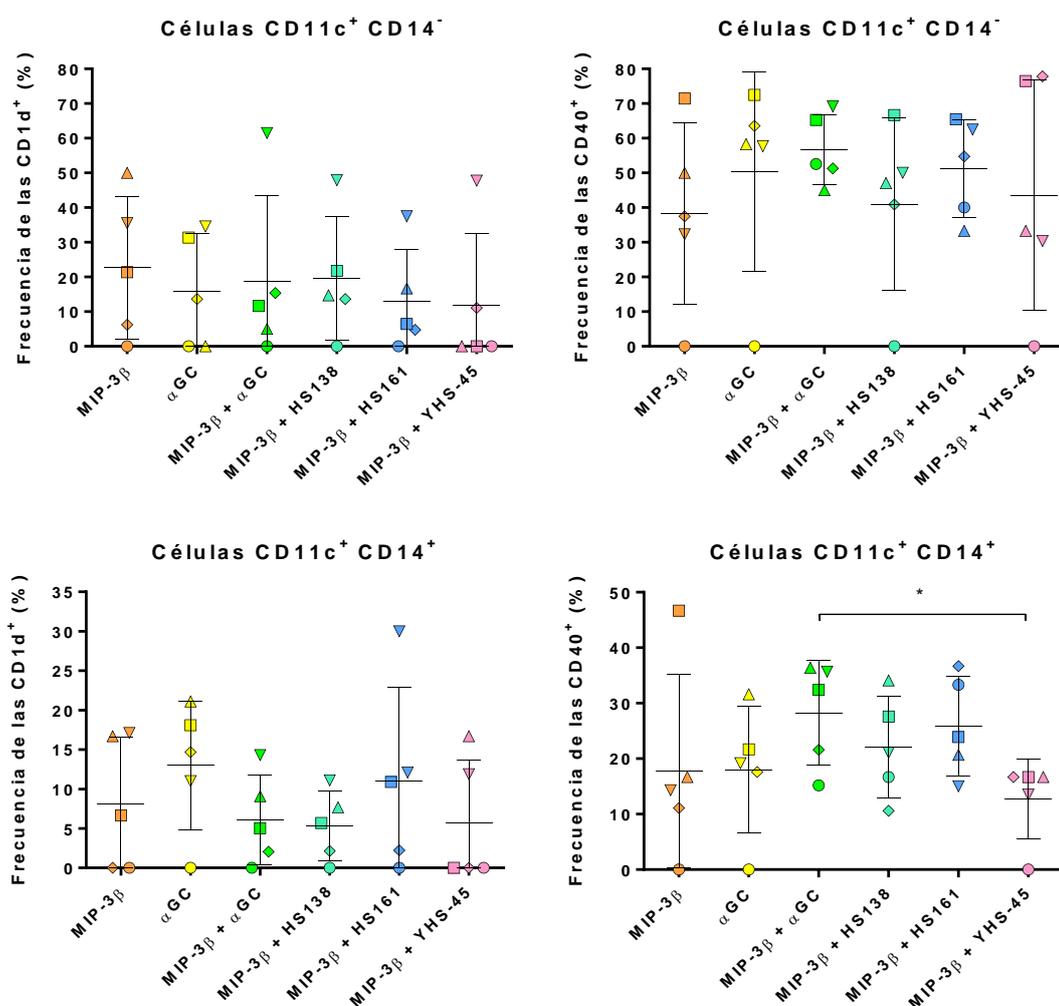


Figura 9. Frecuencia de las células CD1d $^+$  (primera columna) y CD40 $^+$  (segunda columna) en las células CD11c $^+$  CD14 $^-$  (primera fila) y CD11c $^+$  CD14 $^+$  (segunda fila), obtenidas tras la digestión de tejido cervicovaginal de donantes sanas ( $n=5$ ) cultivado con 100 ng/ml de glicolípidos y MIP-3 $\beta$  durante una noche. Las barras muestran la media y desviación estándar de los resultados. \* $p < 0,05$  para un análisis múltiple por ANOVA.

La primera columna de la figura 9 muestra los niveles de expresión de este marcador en esas dos poblaciones, en respuesta a diferentes glicolípidos. En primer lugar, se observó que las células CD11c $^+$  CD14 $^-$  del tejido cervicovaginal expresaban mayores niveles de CD1d que las CD11c $^+$  CD14 $^+$  en prácticamente todas las condiciones (media de 16,95% en células CD11c $^+$  CD14 $^-$  frente a media de 8,21% en células CD11c $^+$  CD14 $^+$ ), lo que puede explicarse debido a su naturaleza de APC clásica. Sin embargo, esta expresión era muy variable en la población del estudio, lo que no permitió ver diferencias

estadísticamente significativas ni tendencias claras en los resultados ( $p > 0,05$  en todos los casos).

El otro de los marcadores analizado en estas dos poblaciones fue CD40 (figura 9, segunda columna), una proteína coestimuladora expresada por las APC y necesaria para su activación. De nuevo, en este análisis observamos que las células CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> del tejido cervicovaginal expresan mayores niveles de este marcador que las CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> en todas las condiciones estudiadas. Como sucedía con el CD1d, vimos una gran variabilidad en las muestras analizadas en ambas poblaciones, ya que el efecto de los glicolípidos fue diferente en cada donante. Dentro de estos resultados, cabe destacar que, al contrario de lo que sucedió con el resto de compuestos, la incubación con MIP-3 $\beta$  + YHS-45 no causó un aumento de la expresión de CD40 en las células CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>, sino que se mantuvo en niveles similares a los de la condición control con MIP-3 $\beta$  ( $p < 0,05$ ; ANOVA), mientras que en las células CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> este compuesto presentó efectos diversos.

Así, pese a los prometedores resultados descritos en el apartado a) *Estrategias de distribución*, dichos resultados no se reprodujeron en las cinco pacientes analizadas: la incubación con MIP-3 $\beta$  y los glicolípidos sintéticos no supuso un aumento de la expresión de CD1d o CD40 en estas poblaciones en comparación con MIP-3 $\beta$  y  $\alpha$ GC (tanto en conjunto como por separado). Por ello, no podemos afirmar que la incubación con los glicolípidos aquí estudiados promueva una activación y maduración de las células presentadoras de antígeno del tejido cervicovaginal humano en estas condiciones.

Por otro lado, también se analizó el efecto de la incubación con glicolípidos sobre el total de células CD3<sup>+</sup> (células T) en el sobrenadante de los mismos tejidos incubados durante una noche con ambos compuestos, para lo que se estudió la expresión de CD69 y HLA-DR (figura 10).

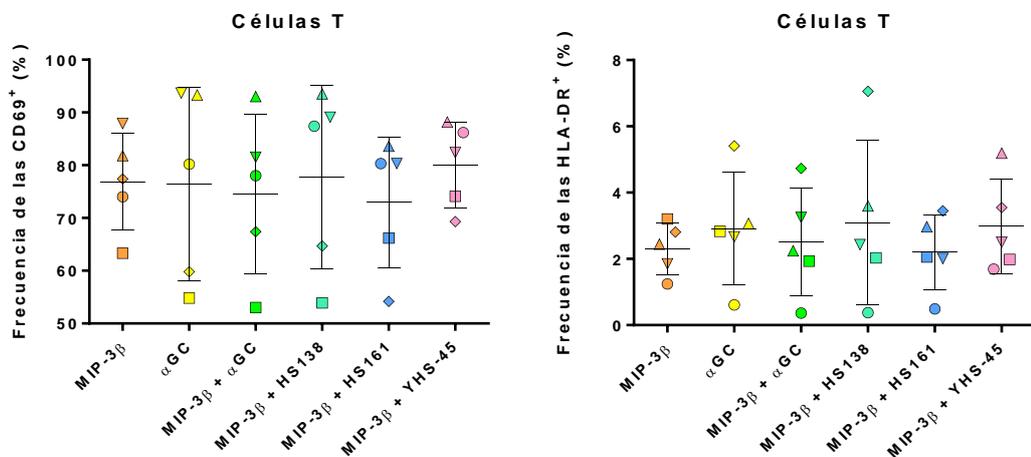


Figura 10. Frecuencia de las células CD69<sup>+</sup> y HLA-DR<sup>+</sup> dentro del total de células T CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>, obtenidas del sobrenadante de tejido cervicovaginal de donantes sanas ( $n=5$ ) cultivado con 100 ng/ml de glicolípidos y MIP-3 $\beta$  durante una noche. Las barras muestran la media y desviación estándar de los resultados. El análisis múltiple por ANOVA no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos.

De nuevo, observamos que existe una cierta variación entre individuos en prácticamente todas las condiciones. Estadísticamente, no se observan diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de estos marcadores en presencia de los diferentes compuestos, ya que la media de cada condición es similar a la de la condición de referencia con MIP-3 $\beta$  y  $\alpha$ GC, y esta es, a su vez, similar a la media de las condiciones con cada uno de los compuestos por separado.

De forma paralela, se estudió el efecto de estos compuestos sobre la activación de las células NK, incluyendo en este análisis tanto las CD16<sup>+</sup> (de carácter eminentemente citotóxico) como las CD16<sup>-</sup> (con mayor tendencia a la producción de citocinas)<sup>187</sup>. Para ello, se compararon los niveles de expresión de CD69 y HLA-DR de esta población en presencia de MIP-3 $\beta$  y  $\alpha$ GC con los que se observaron en presencia del resto de compuestos (figura 11).

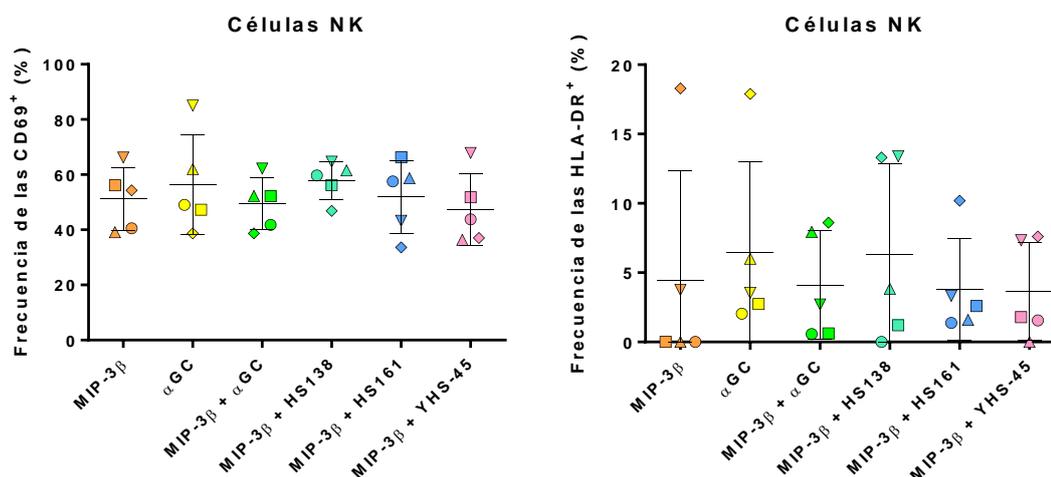


Figura 11. Frecuencia de las células CD69<sup>+</sup> y HLA-DR<sup>+</sup> dentro del total de células NK, obtenidas del sobrenadante de tejido cervicovaginal de donantes sanas (n=5) cultivado con 100 ng/ml de glicolípido y MIP-3 $\beta$  durante una noche. Las barras muestran la media y desviación estándar de los resultados. El análisis múltiple por ANOVA no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos.

En este caso, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre unas condiciones y otras. De hecho, los niveles de expresión de ambos marcadores fueron bastante similares a los del control basal (MIP-3 $\beta$  solo), por lo que la adición de glicolípidos no parece estimular a esta población. Cabe destacar el contraste entre los niveles de expresión de ambos marcadores, ya que mientras que la frecuencia de CD69 se mantuvo más o menos estable entre todos los individuos, los valores de HLA-DR observados presentaron una gran variación interindividual. Además, también existen diferencias cuantitativas entre ambas moléculas: de media, casi el 50% de células NK expresaron CD69 en respuesta a alguno de los glicolípidos, mientras que, por término medio, la expresión de HLA-DR en esta población resultó ser unas diez veces menor. Así, teniendo en cuenta todos estos datos, podemos concluir que la adición de los glicolípidos

no parece activar esta población, al menos en cuanto a expresión de CD69 y HLA-DR se refiere. No obstante, podría ser interesante ver si, tanto estas células como las iNKT presentan una mayor capacidad citotóxica tras la estimulación con los compuestos estudiados (medida de la frecuencia de granzima/perforina mediante citometría).

### 3.d) Tinción intracelular de citocinas (ICS)

Finalmente, para evaluar el efecto de los glicolípidos sintéticos sobre la estimulación del sistema inmunitario del tejido cervicovaginal humano, se estudió de nuevo la secreción de citocinas que dichos compuestos generaban, esta vez mediante citometría de flujo (tinción intracelular de citocinas), con el fin de identificar las poblaciones que secretaban estas citocinas. Para ello, seis bloques de tejido fueron incubados durante una noche con los glicolípidos de estudio y MIP-3 $\beta$ . A la mañana siguiente, recogimos los sobrenadantes de estos cultivos y aislamos las células allí presentes para incubarlos durante 5 horas con brefeldina, un reactivo que detiene el tráfico intracelular de membranas. Pasado ese tiempo, las células fueron teñidas con diferentes anticuerpos de superficie e intracelulares (ver *Tabla anexa 2*), a fin de estudiar su capacidad de secreción de ciertas citocinas mediante citometría de flujo. En la figura 12 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en este experimento, ya que, en el momento en que se escribe esta tesis estamos trabajando en aumentar la n de estos experimentos para poder extraer conclusiones sólidas.

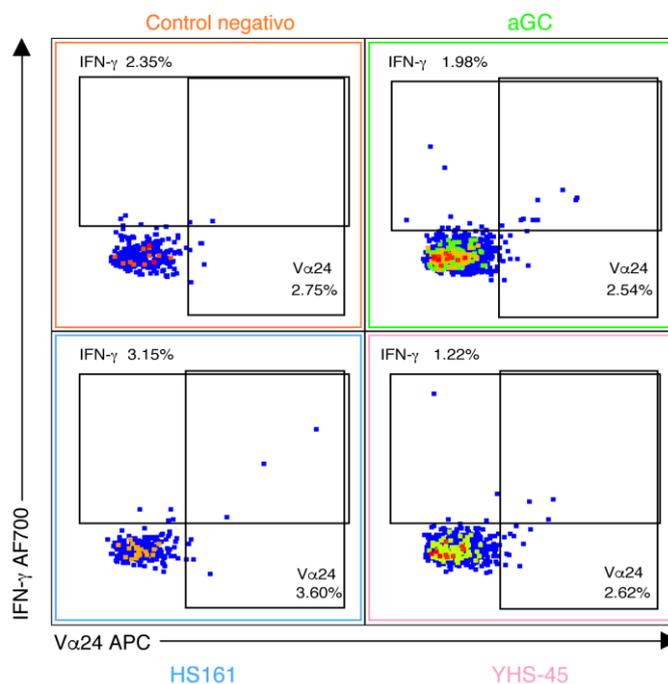


Figura 12. Dot plots representativos que ilustran la frecuencia de células iNKT y la secreción de IFN- $\gamma$  en un tejido cervical humano estimulado con diferentes glicolípidos y MIP-3 $\beta$  a 100 ng/ml durante una noche.

#### 4. Infección del tejido con *Chlamydia trachomatis*

Finalmente, quisimos ver el efecto de estos glicolípidos frente a una infección por *Chlamydia trachomatis*. Sin embargo, antes de llevar a cabo estos experimentos, fue necesario poner a punto otros aspectos tales como la generación de un stock infeccioso de esta bacteria, la titulación del mismo y la detección de la infección por este patógeno en el tejido. Además, se estudiaron diversas maneras de infectar el tejido para identificar la más eficaz.

##### 4.1. Generación de un stock infeccioso de *Chlamydia trachomatis* y titulación

*Chlamydia trachomatis* es una bacteria de crecimiento intracelular, por lo que para la generación de un stock infeccioso a partir de un aislado de la Colección Americana de Cultivos Tipo o ATCC (*Chlamydia trachomatis* Serovar D, ATCC VR-885) fue necesario crecerla utilizando células HeLa. Clamidia es capaz de infectar estas células y multiplicarse en su interior, expandiendo el número total de agentes infecciosos (figura 13).

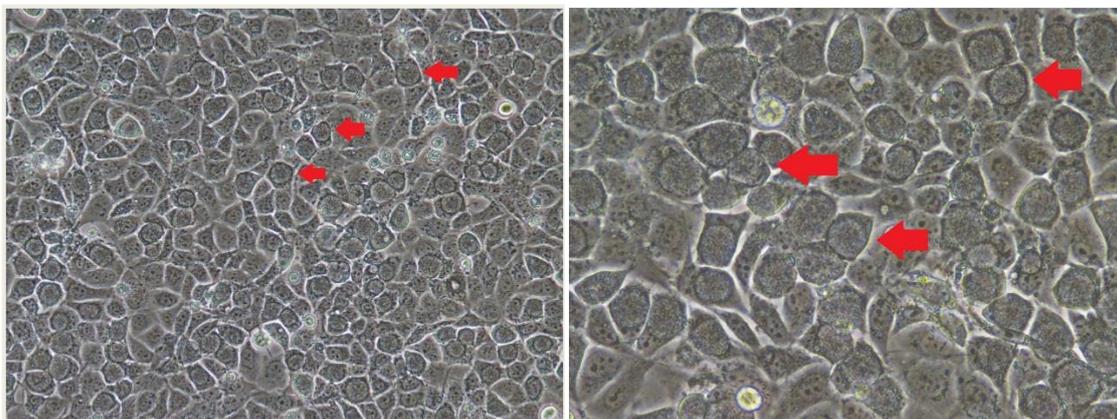


Figura 13. Monocapa de células HeLa infectadas con *Chlamydia trachomatis* a x10 (izquierda) y x20 (derecha) aumentos. Las flechas rojas señalan células con grandes inclusiones de esta bacteria.

Así, lisando estas células infectadas podemos purificar esos agentes infecciosos (cuerpos elementales, EBs) mediante centrifugación, originando un inóculo libre de restos celulares y enriquecido en este patógeno. Una vez generado un volumen considerable de este stock mediante ciclos sucesivos de infecciones-purificaciones-reinfecciones, titulamos dicho stock en las propias células HeLa para conocer su número de unidades formadoras de infecciones por mililitro (IFU/ml). Para ello, infectamos una placa de células HeLa confluentes con diversas diluciones del stock de clamidia y analizamos el número de IFU por pocillo mediante inmunofluorescencia, marcando para ello las bacterias con un anticuerpo policlonal conjugado a FITC (Chemicon, AB1120F). En la figura 14 se muestra una imagen representativa de esta tinción.

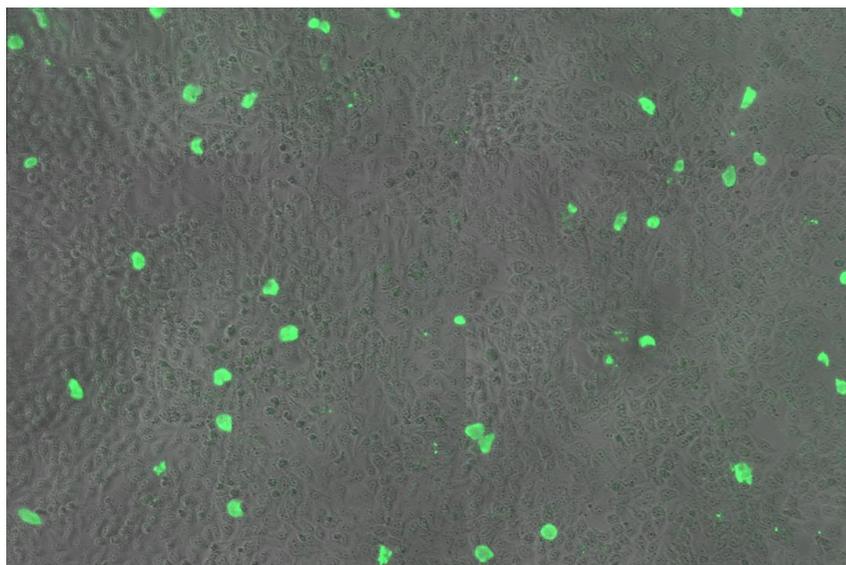


Figura 14. Tinción mediante inmunofluorescencia de las inclusiones citoplasmáticas que origina *Chlamydia trachomatis* en células HeLa infectadas (verde).

Para calcular la titulación del *stock*, se utilizó la siguiente fórmula matemática:

$$IFU/ml = \frac{N^{\circ} \text{ de inclusiones por campo} * \text{Factor de dilución} * N^{\circ} \text{ de campos por pocillo}}{\text{Volumen de inóculo}}$$

$$\text{Donde, } N^{\circ} \text{ de campos por pocillo} = \frac{\text{Área del pocillo}}{\text{Área analizada del pocillo}}$$

Aplicando en esa fórmula los datos de los que disponíamos, el resultado fue que la cantidad de IFU por mililitro de nuestro *stock* infeccioso era de  $69,5 \times 10^6$  IFU/ml.

#### 4.2. Detección de la infección

Una vez titulado el *stock*, procedimos a infectar el tejido cervicovaginal con clamidia. Para ello, en primer lugar, comprobamos la relevancia de diversos factores en el proceso de infección: tamaño del bloque de tejido a infectar, adición del inóculo sobre el tejido o al medio de cultivo, cantidad de inóculo necesaria para la infección, agitación del cultivo durante el tiempo de infección y tiempo total de infección. Tras varias pruebas, concluimos que la mejor estrategia consistía en:

- ◆ Cortar el tejido en bloques unas 3 veces más grandes de lo que cortábamos para el resto de experimentos.
- ◆ Orientar los bloques de tejido con la cara mucosa mirando al cielo en la placa de cultivo, colocando 3 bloques por pocillo.
- ◆ Depositar 10  $\mu$ l de inóculo ( $69,5 \times 10^6$  IFU/ml) directamente sobre cada pieza de tejido.
- ◆ Mantener el tejido con la clamidia a 37 °C durante los 3 primeros días de cultivo, sin agitación.
- ◆ Mantener el tejido en cultivo durante 14 días hasta su digestión y marcaje por citometría de flujo (tinción intracelular con un anticuerpo monoclonal específico contra la Proteína Externa de Membrana Principal, MOMP).

No obstante, hasta que conseguimos establecer todas estas condiciones óptimas, nos enfrentamos al problema de la detección de la infección en el tejido. La estrategia inicial para esta detección fue el marcaje por citometría de flujo. No obstante, el anticuerpo policlonal que utilizábamos para el marcaje de células HeLa infectadas durante 48 horas (figura 15, izquierda), en torno a un 5% de marcaje inespecífico) no funcionaba igual de bien en tejido infectado durante tres días (figura 15, derecha), por lo que decidimos cambiar a un anticuerpo monoclonal (CT602, generosamente cedido por el Dr. Ian Clarke, *The Chlamydia Biobank*, Universidad de Southampton) conjugado a Alexa Fluor 647 en nuestro laboratorio mediante un kit comercial (LifeTechnologies).

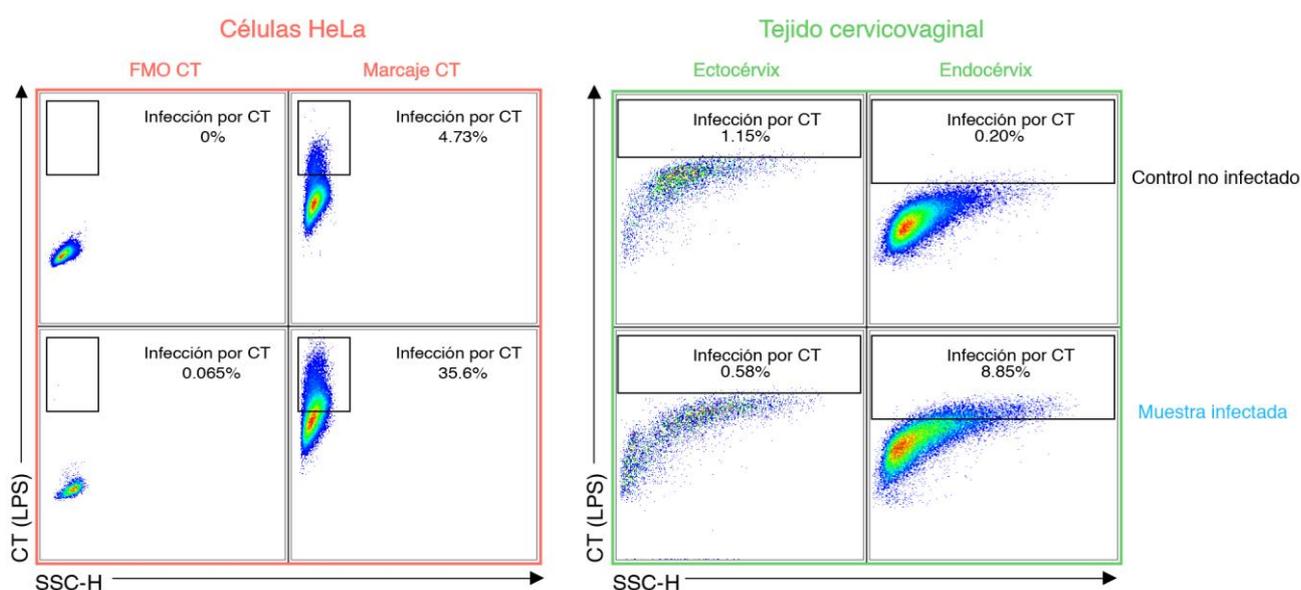


Figura 15. Células HeLa (naranja, izquierda) y tejido cervicovaginal (verde, derecha) infectados por *Chlamydia trachomatis* durante 48 y 72 horas respectivamente, junto con sus correspondientes controles sin infectar (fila superior). La columna naranja izquierda muestra el control de células HeLa sin marcar (FMO). La columna verde izquierda ilustra los resultados en el ectocérvix, mientras que la verde derecha presenta los resultados del endocérvix. En ambas muestras se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra el LPS de la bacteria, conjugado a FITC para la detección de la infección (Chemicon).

Nuevamente, pese a que este anticuerpo funcionaba muy bien en células HeLa infectadas durante 48 horas (figura 16, izquierda), en tejido no se apreciaba claramente una población positiva para este patógeno pese a haber aumentado el tiempo de cultivo hasta los seis días (figura 16, derecha).

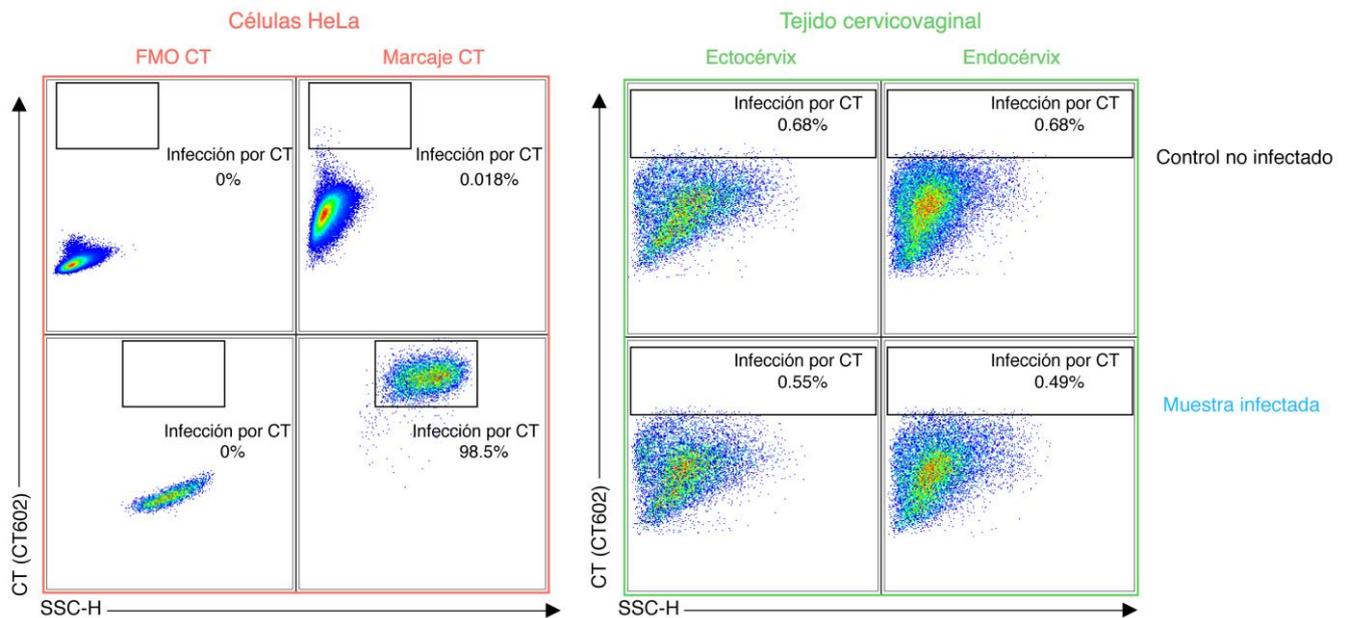


Figura 16. Células HeLa (naranja, izquierda) y tejido cervicovaginal (verde, derecha) infectados por *Chlamydia trachomatis* durante 48 horas y 6 días respectivamente, junto con sus correspondientes controles sin infectar (fila superior). La columna naranja izquierda muestra el control de células HeLa sin marcar (FMO). La columna verde izquierda ilustra los resultados en el ectocervix, mientras que la verde derecha presenta los resultados del endocervix. En ambas muestras se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido contra el Major Outer Membrane Protein (MOMP) de la bacteria (*The Chlamydia Biobank*), conjugado a Alexa Fluor 647 para la detección de la infección.

Por ello, exploramos otros métodos de detección, como la PCR para detectar ADN de clamidia replicativamente activa (realizada por el servicio de Microbiología del Hospital Universitario Valle Hebrón, donde se realiza rutinariamente para el diagnóstico de esta infección), la infección de células HeLa con el sobrenadante del cultivo del tejido (en donde esperábamos que hubiera cuerpos elementales de clamidia, capaces de iniciar la infección de esta línea celular) o la inmunofluorescencia de tejido infectado, tanto intacto como disgregado (inmunofluorescencia de la suspensión celular obtenida mediante cytopsin, ver *Métodos*).

De todas estas pruebas, la que generó los resultados más optimistas fue la técnica del cytopsin de tejido infectado, ya que fue la única en la que pudimos detectar algo de infección. En la figura 17 puede verse en rojo el marcaje de *Chlamydia trachomatis* con el anticuerpo monoclonal, mientras que en azul se observan los núcleos de las células del tejido, marcadas con DAPI. Si bien es cierto que se aprecian acumulaciones de puntos rojos en zonas concretas de la muestra, dichas acumulaciones no se localizan en torno a un núcleo claramente definido de forma consistente, por lo que no está del todo claro que estas imágenes se correspondan en todos los casos con células de tejido cervicovaginal infectadas por clamidia y no con artefactos de la técnica. Incluir también un marcaje de la membrana celular quizá nos permitiría identificar de forma más clara inclusiones citoplasmáticas similares a las que observamos en células HeLa. Pese a todo, es la única técnica que nos ha permitido ver, mediante microscopía del tejido cervicovaginal, algo similar a las inclusiones citoplasmáticas típicas de esta infección.

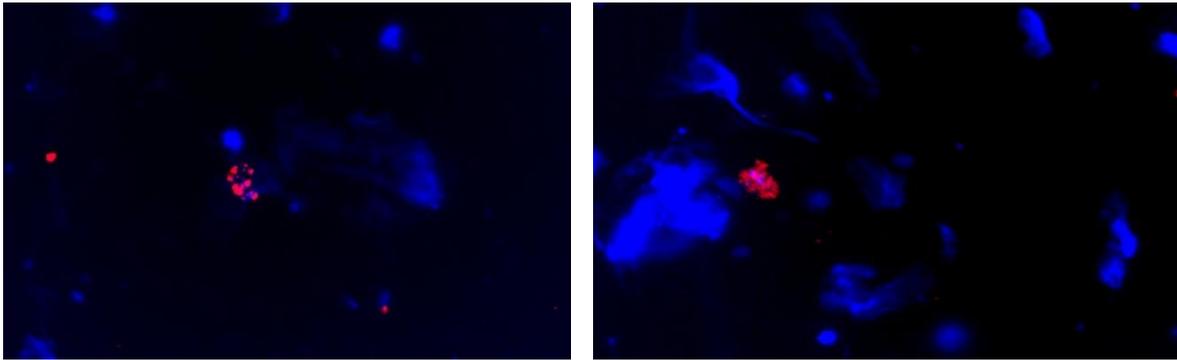


Figura 17. Imágenes representativas de endocervix infectado por *Chlamydia trachomatis* durante 6 días, digerido y sometido a un cytopspin para llevar a cabo una inmunofluorescencia de las células resultantes. Azul: núcleos celulares marcados con DAPI. Rojo: inclusiones citoplasmáticas de clamidia marcadas con un anticuerpo monoclonal (CT602).

Finalmente, realizando una infección del tejido en las condiciones descritas anteriormente, pero manteniéndolo en cultivo durante 14 días antes de la digestión, conseguimos percibir un aumento en la frecuencia de células infectadas por citometría de flujo (figura 18).

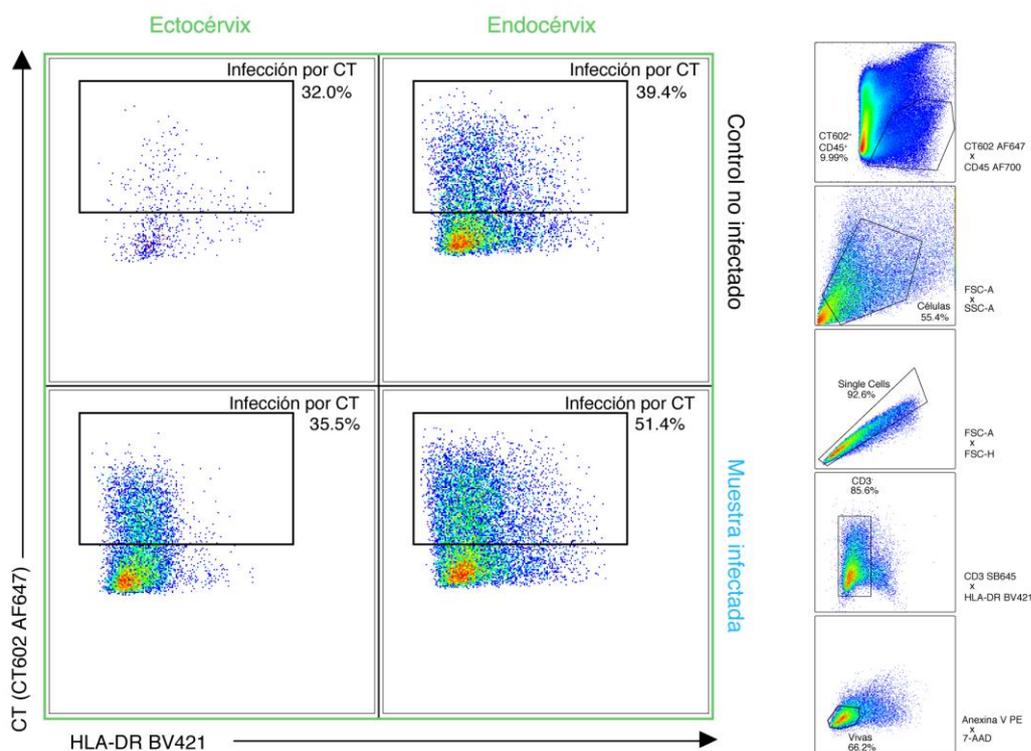


Figura 18. Marcaje de tejido cervicovaginal (ectocervix, columna izquierda; endocervix, columna derecha) infectado por *Chlamydia trachomatis* durante 6 días (fila inferior) junto con sus correspondientes controles sin infectar (fila superior), utilizando un anticuerpo monoclonal (CT602 conjugado a Alexa Fluor 647) para la detección de la bacteria. A la derecha se muestra la estrategia de gating en estos análisis, consistente en seleccionar las células positivas para CT602, descartar dobletes y células CD3<sup>+</sup> y quedarnos con las células vivas.

No obstante, el porcentaje de uniones inespecíficas del anticuerpo en las muestras no infectadas es considerablemente elevado (32% en ectocervix y 39,4% en endocervix) por lo que,

aun viendo un incremento neto del 12% en el endocérvix (el compartimento que se infecta de forma casi exclusiva) cuando analizamos los tejidos infectados, no podemos estar del todo seguros de que ese aumento se deba a uniones específicas, sobre todo teniendo en cuenta que se trata de un único tejido, por lo que esta técnica todavía cuenta con un margen de mejora que debemos explorar.

#### 4.3. Efecto de los glicolípidos en la infección por *Chlamydia trachomatis*

Debido a las dificultades técnicas para detectar el grado de infección del tejido, valorar el efecto de los glicolípidos en este modelo resultaría sumamente complicado y poco fiable. Por ello, decidimos utilizar un modelo celular altamente relevante en esta investigación como son las células HeLa, puesto que se trata de células epiteliales de cérvix humano. Así, estas células pueden infectarse fácilmente con *Chlamydia trachomatis*, tal y como se ha demostrado en este trabajo, y representan el modelo *in vitro* de mayor similitud al tejido que nos ocupa.

Como ya se ha comentado en la introducción, el IFN- $\gamma$  es capaz de controlar la infección por clamidia<sup>72</sup>, por lo que lo primero que hicimos fue tratar de reproducir este fenómeno en nuestros cultivos. Para ello, células HeLa fueron incubadas con diferentes dosis de IFN- $\gamma$  antes (una noche antes), durante y después de la infección con *Chlamydia trachomatis*, a fin de ver una disminución dosis-dependiente de la infección y de identificar el momento en el que la adición de IFN- $\gamma$  resulta más eficaz.

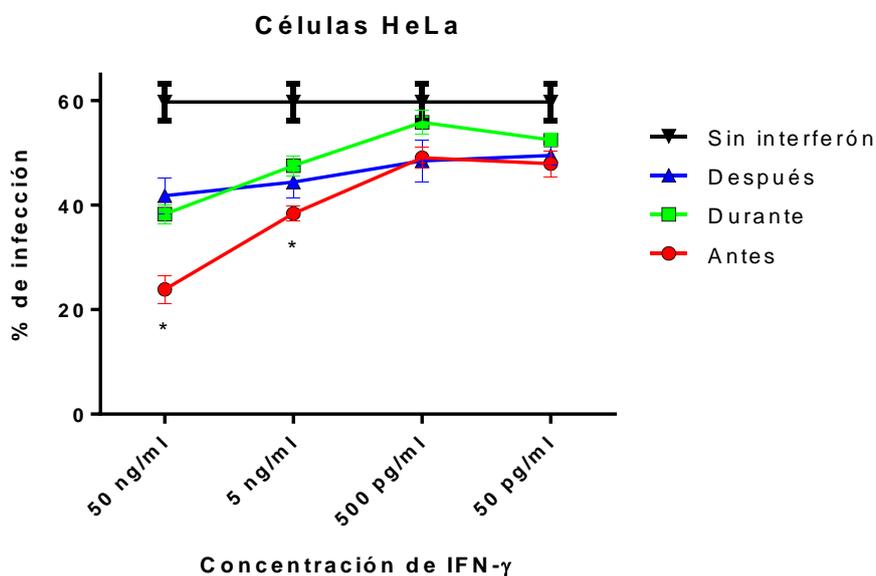


Figura 19. Porcentaje de infección por clamidia en células HeLa expuestas a diferentes cantidades de IFN- $\gamma$  antes (rojo), durante (verde) o después de la infección (azul). La línea negra muestra la tasa de infección de las mismas células en ausencia de interferón durante todo el proceso. Las barras de error representan el error estándar de la media ( $n=3$ ). \* $p<0,05$  para un análisis múltiple por ANOVA.

En la figura 19 se aprecia que a medida que disminuía la concentración de IFN- $\gamma$  aumentaba la tasa de infección por lo que, en nuestro modelo, esta citocina también era capaz de limitar la infección de manera dosis-dependiente. Además, también se observa que se

consiguió la mayor tasa de protección cuando se añadió antes que la bacteria al medio de cultivo, lo que tiene gran relevancia con vistas a una futura vacuna contra este patógeno: cuanto mayor producción de IFN- $\gamma$  sea capaz de generar dicha vacuna, mayor será la tasa de protección para el individuo. Este efecto protector del IFN- $\gamma$  antes de la inoculación de la bacteria resultó más evidente a las concentraciones más elevadas, ya que a medida que la concentración de esta citocina disminuía, la tasa de infección de las células tendía a igualarse entre las tres condiciones, acercándose a los valores registrados en ausencia total de interferón.

Por último, se estudió el efecto protector de sobrenadantes de tejido que había sido incubado con diferentes glicolípidos, procedente de los experimentos descritos en los apartados anteriores. El objetivo era ver si la respuesta citocínica generada por los compuestos analizados era suficiente para limitar la infección por clamidia en células HeLa. De esta forma, incubamos células HeLa durante toda una noche con sobrenadantes de tejido estimulado con los derivados de la  $\alpha$ GC, infectamos dichas células a la mañana siguiente, y a las 48 horas analizamos su tasa de infección mediante citometría de flujo. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 20.

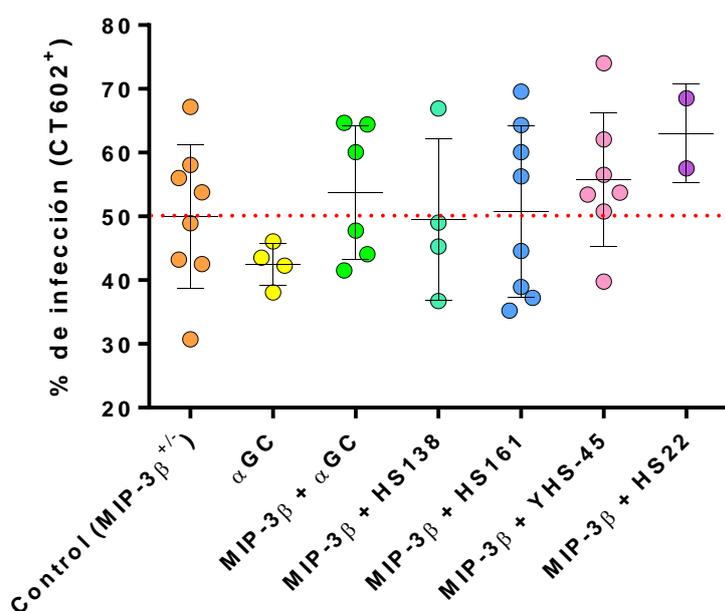


Figura 20. Porcentaje de infección por clamidia en células HeLa expuestas, durante la noche anterior a la inoculación de la bacteria, a sobrenadantes de tejido cervicovaginal incubado con diferentes glicolípidos. Las barras de error representan la media y la desviación estándar de los resultados ( $n=2-8$ ). La barra punteada indica el valor de la media de infección en la condición control. El análisis estadístico mediante el test de Wilcoxon no mostró diferencias significativas.

De nuevo, los resultados presentan una gran variabilidad entre sí a excepción de la condición  $\alpha$ GC sola, la cual es bastante consistente en las cuatro réplicas. Así, se observa que la tasa de infección media se mantiene más o menos similar en la mayoría de condiciones, siendo en todos los casos similar a la de la condición control. Por lo demás, ninguno de los compuestos de estudio parece tener un efecto protector consistente ante la infección, al menos en este modelo, aunque se aprecia que existen dos grupos en algunas de las condiciones: uno en los que la incubación con glicolípidos disminuye el porcentaje de infección (ya que el tejido quizás ha respondido al estímulo secretando factores protectores como IFN- $\gamma$ ) y otro en el que esta incubación parece favorecer la infección (quizá en estos el glicolípidos genera una respuesta que potencia la infección o simplemente no genera ninguna respuesta). Esta variabilidad podría deberse a diferencias en la frecuencia de células iNKT entre las donantes o a otros factores tales

como la edad o el estado del ciclo menstrual (dos de las muestras con la mayor tasa de infección se correspondían con las donantes de mayor edad, en estado menopáusico).

## 5. Infección del tejido con VIH

Otro de los objetivos de la presente tesis era evaluar el papel de los derivados sintéticos de la  $\alpha$ GC durante la infección por VIH-1 del tejido cervicovaginal. Para cumplir este objetivo, lo primero que hicimos fue establecer las condiciones óptimas de infección del tejido con este patógeno. En este caso, se estudiaron la dosis de virus necesaria para conseguir una infección del tejido cuantificable (TCID) y la cinética de la infección, analizada en base a la expresión de p24 en las células del tejido. p24 es una proteína de la cápside del virus que se utiliza de manera habitual para establecer el nivel de infección de las células. En este trabajo, la presencia de dicha proteína se estudió mediante tinción intracelular y citometría de flujo. En la figura 21 se representa una cinética de la producción de este p24 en células T a dos dosis de virus. En ella vemos que las mayores tasas de infección se consiguen a 12 días, y que entre los días 7 y 12 existe una diferencia bastante considerable en cuanto a la frecuencia de p24, por lo que inferimos que el grado de infección óptimo del tejido se consigue a partir del décimo día de infección, y es necesario esperar hasta entonces para ver una infección consistente. En cuanto a la dosis de virus necesaria, comprobamos que la dosis alta generaba una mayor tasa de infección, por lo que establecimos una dosis intermedia, con una TCID<sub>50</sub> de 3655, como la dosis estándar para las infecciones *ex vivo* del tejido.

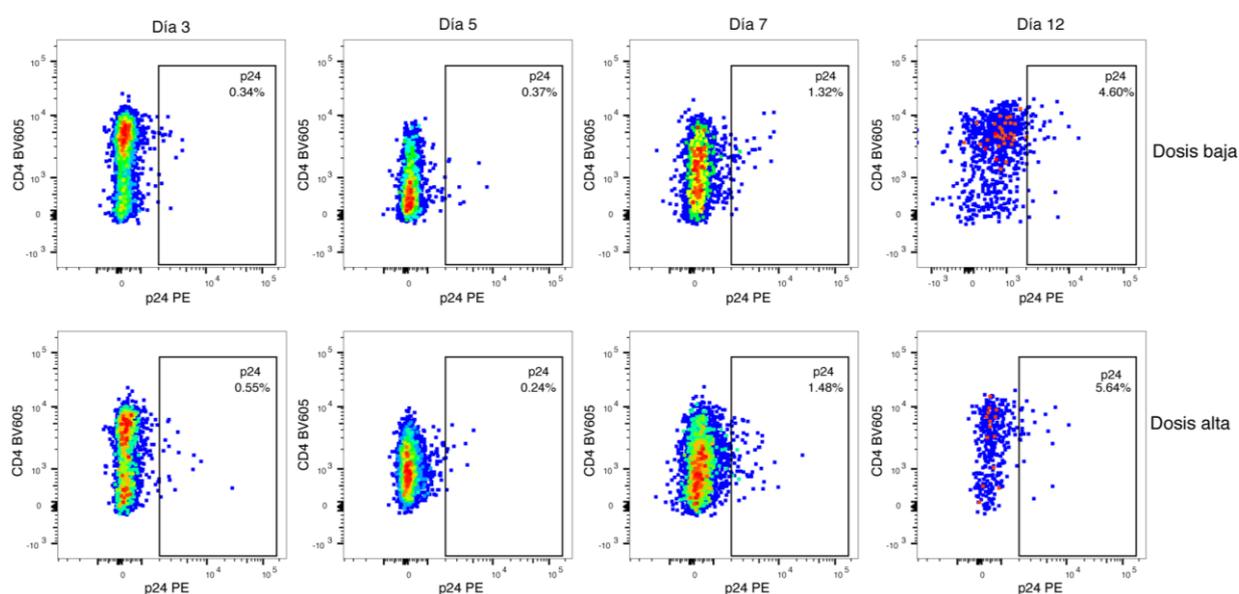


Figura 21. Cinética de la expresión de p24 en células T de tejido cervicovaginal tras la infección *ex vivo* con una dosis baja de virus VIH-1<sub>Bol</sub> (fila superior, TCID<sub>50</sub>=2284) o una dosis alta del mismo (fila inferior, TCID<sub>50</sub>=18 275), a 3, 5, 7 y 12 días post-infección.

### 5.1. Efecto de los glicolípidos en la infección del tejido con VIH

Una vez establecida la infección, estudiamos el efecto de la estimulación con glicolípidos en la infección por VIH-1. Para ello, se incubaron ocho bloques de tejido cervicovaginal en presencia de 100 ng/ml de glicolípido una noche antes, durante o al cabo de tres días de la infección con una cepa BaL de VIH-1 ( $TCID_{50} = 3655$ ). Estos cultivos se mantuvieron durante 10 días, momento en el cual fueron digeridos y marcados para analizar mediante citometría de flujo los niveles de p24 intracelular. Los resultados de estos experimentos se ilustran en la figura 22.

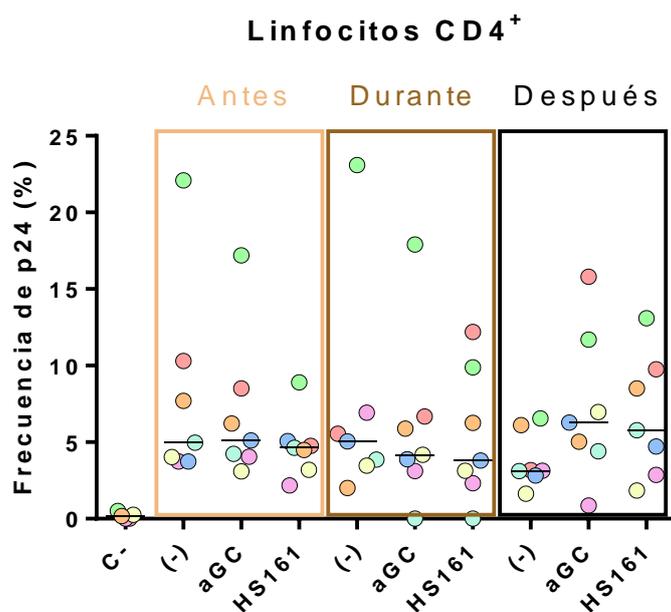


Figura 22. Expresión de p24 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de tejido cervicovaginal tras la infección ex vivo con un virus VIH-1<sub>BaL</sub> ( $TCID_{50}=3655$ ) a los 10 días post-infección, habiendo expuesto el tejido a 100 ng/ml de αGC (αGC) o HS161 antes, durante o tres días después de la infección (n=7). Se representa la mediana de los resultados. El análisis estadístico mediante ANOVA no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los resultados.

En primer lugar, se aprecia que la tasa de infección variaba considerablemente de un individuo a otro, lo que probablemente se deba a las diferentes susceptibilidades frente al VIH-1 que presentan diferentes individuos (como por ejemplo, el estado o cantidad de las células diana). En segundo lugar, se observó que el efecto de los glicolípidos difería en función del momento en que se añadían al cultivo. Así, cuando el tejido era incubado con estas moléculas durante la noche anterior a la infección por VIH, parecían tener un efecto protector, ya que la frecuencia de p24 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> disminuía en algunas de las muestras que habían recibido glicolípido en comparación con las que no habían sido estimuladas previamente, un efecto que se observó más claramente en los tejidos con las tasas más altas de infección. Viendo esta tendencia, es probable que, si aumentásemos la n del experimento y pudiéramos controlar factores como la edad de la donante o su estado del ciclo menstrual, estas diferencias se hicieran estadísticamente significativas. Por el contrario, el efecto de estos compuestos cuando se añadieron durante la infección fue más variable: en tres de las donantes la adición de αGC causó un aumento en la frecuencia de linfocitos infectados, y en dos de ellas se observó lo mismo con HS161. Sin embargo, el resto de donantes mostraron el efecto contrario. Finalmente, la adición de los glicolípidos en el tercer día post-infección mostró una tendencia hacia el aumento de la tasa de infección en los tejidos. La αGC aumentó la frecuencia de células infectadas en casi la totalidad de donantes, al igual que HS161, aunque su efecto fue más moderado. Ello podría deberse a que estos compuestos representan un estímulo para el tejido, por lo que causarían

una activación de las células que lo componen, facilitando así la diseminación del virus y aumentando la tasa de infección.

Por todo esto, sería interesante repetir este experimento en un mayor número de donantes para confirmar las tendencias que aquí se muestran.





**Capítulo 2: Células T de memoria residentes ( $T_{RM}$ ) en el tejido cervical  
como reservorios del VIH**



## 1. Antecedentes y objetivos

El principal obstáculo que existe a día de hoy para la curación de la infección por VIH son los reservorios virales. Pese a que la terapia antirretroviral disminuye los niveles de carga viral hasta hacerlos prácticamente indetectables en sangre, el virus es capaz de establecer reservorios latentes y de continuar replicándose en los tejidos, permitiendo un rebote de la viremia cuando se interrumpe el tratamiento<sup>188</sup>. En sangre, el virus se aprovecha de las células de memoria del sistema inmunitario para constituir estos reservorios<sup>189, 190</sup>, ya que son células con unas características idóneas para su mantenimiento: larga vida, estado de reposo o quiescencia y capacidad proliferativa homeostática<sup>150</sup>. En tejido, las células T de memoria residentes representan un candidato ideal para dicho cometido, ya que comparten varias de estas características. Además, su amplia distribución en diferentes tejidos corporales supone un interés añadido, ya que también se localizan en la puerta de entrada del virus: la mucosa. Por ello, en este capítulo, nos centramos en estudiar su papel durante la infección por VIH en el tracto genital femenino, ya que hasta ahora no ha sido descrito en profundidad.

## 2. Caracterización y fenotipo

El primer paso en este proyecto fue confirmar la presencia de este tipo celular en el tejido cervicovaginal humano y estudiar sus características fenotípicas. Para ello, digerimos el ectocérvix y el endocérvix de varias donantes sanas con el fin de estudiar la distribución de esta población en la mucosa genital femenina, y fenotiparla en detalle. La estrategia de análisis de citometría que se aplicó en este caso puede verse en la figura 1.

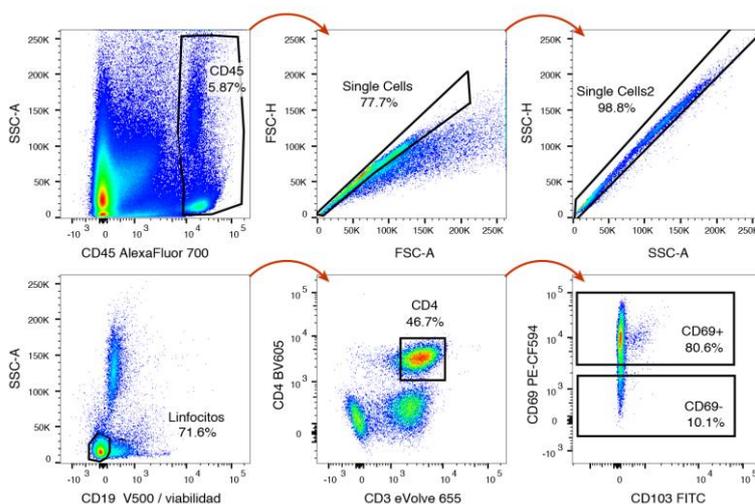


Figura 1. Estrategia general de gating para el fenotipado de las células T CD4<sup>+</sup> obtenidas de tejido cervicovaginal de donantes sanas. La estrategia consistió en seleccionar las células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup>, seguida de excluir los dobletes por duplicado, así como las células muertas y las CD19<sup>+</sup> (células B). Finalmente, a partir de las células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> se identificaron las células CD69<sup>+</sup> (T<sub>RM</sub>).

Las células T<sub>RM</sub> se caracterizan fundamentalmente por la expresión de CD69, cuya frecuencia fue muy elevada en todas las muestras analizadas (en torno al 80%). Para confirmar que estas células eran realmente células T<sub>RM</sub>, en primer lugar estudiamos una serie de marcadores complementarios que ayudan a definir con exactitud este fenotipo<sup>51</sup>. Así, en consonancia con lo descrito en la literatura<sup>191</sup>, confirmamos que estas células expresaban menores niveles de los factores de transcripción Eomes, T-bet y Hobit en comparación con sus

homólogos CD69<sup>-</sup>, así como de S1PR1 (3,91% frente a un 3,29%) y CCR7 (figura 2), receptores de moléculas que estimulan la migración hacia los tejidos linfáticos. En contraposición, las CD69<sup>+</sup> presentaron mayores niveles de CD49a y PD-1 (figura 2), dos proteínas fuertemente asociadas al fenotipo T<sub>RM</sub><sup>51</sup>. Así, pudimos confirmar que la gran mayoría de las células T CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> del tracto genital femenino eran *bona fide* T<sub>RM</sub>.

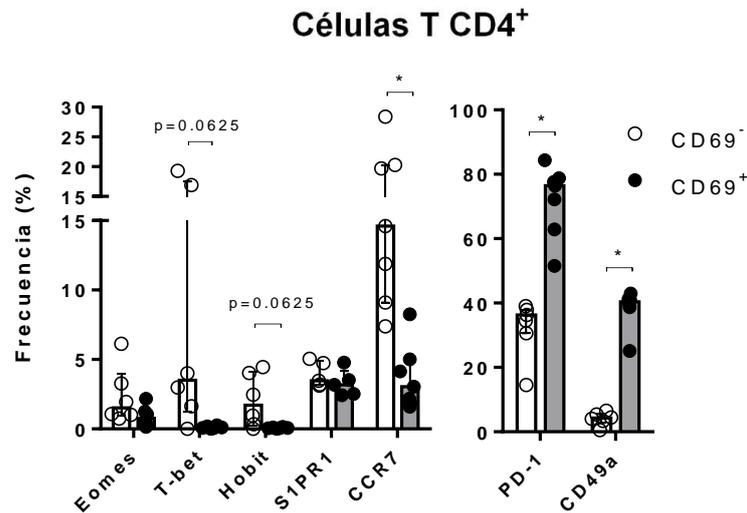


Figura 2. Frecuencia de diferentes proteínas de superficie y factores de transcripción en células T CD4<sup>+</sup> CD69<sup>-</sup> (blanco) y en T CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> (negro, n=5-7). Las barras representan la mediana y las líneas, el rango intercuartílico de los datos. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Wilcoxon para comparar ambos grupos. \*p<0,05.

A continuación, pasamos a estudiar en detalle el fenotipo de estas células, según el análisis de citometría mostrado en la figura 3.

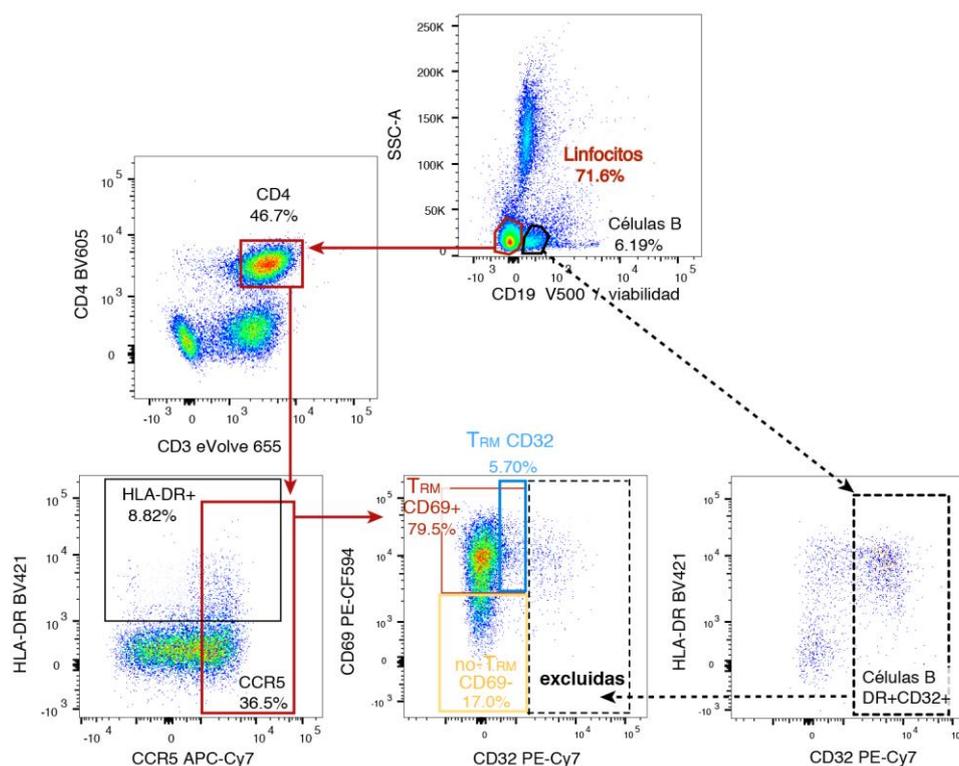


Figura 3. Estrategia general de gating para el fenotipado de las células T  $CD4^+$  obtenidas de tejido cervicovaginal de donantes sanas. Basados en la estrategia mostrada en la figura 1, se seleccionaron los linfocitos (en rojo) excluyendo las células muertas y  $CD19^+$ . A continuación, se seleccionaron las células T  $CD3^+CD4^+$  y, dentro de estas, las  $CCR5^+$ , para analizar tres poblaciones diferentes en base a su expresión de  $CD69$  y  $CD32$ : las  $no-T_{RM}$  (amarillo), las  $T_{RM} CD32^-$  (naranja) y las  $T_{RM} CD32^+$  (azul). Las células con alta expresión de  $CD32$  (células B en su mayoría) fueron excluidas del análisis para evitar contaminaciones de otras poblaciones que no fueran la de interés.

Se sabe que la mayor parte de los individuos infectados por el VIH-1 lo están por cepas con tropismo R5, las cuales son mayoritarias en la transmisión vía mucosa<sup>192</sup> y se valen del correceptor CCR5 para penetrar en las células diana. En nuestras muestras, la frecuencia de este correceptor en los linfocitos T  $CD4^+$  fue de un 45,8% en el ectocérvix y de un 41,9% en el endocérvix (figura 4), y dentro de esta población, la frecuencia de las  $T_{RM}$  presentó valores muy similares a los observados en el total de  $CD4^+$  (figura 4). Por otro lado, recientemente se ha asociado la expresión de  $CD32$  en células T con un estado de transcripción activa del virus<sup>193</sup>, lo que podría tener también implicaciones en la susceptibilidad de estas células a la infección. Por ello, pese a que su frecuencia dentro del tejido era considerablemente pequeña (figura 4), el fenotipo de las células T  $CD4^+ CCR5^+ T_{RM} CD32^+$  (que fueron más abundantes en el ectocérvix que en el endocérvix,  $p=0,031$ ) también se estudió en detalle. Sin embargo, cabe destacar que únicamente se analizaron las células  $CD32^{dim}$  para eliminar la posible contaminación de células B ( $CD32^{high}$ ), tal y como se ha descrito recientemente<sup>194, 195</sup>. Para ello, tal y como se observa en la figura 3, las células que expresaban altos niveles de este marcador fueron excluidas del análisis.

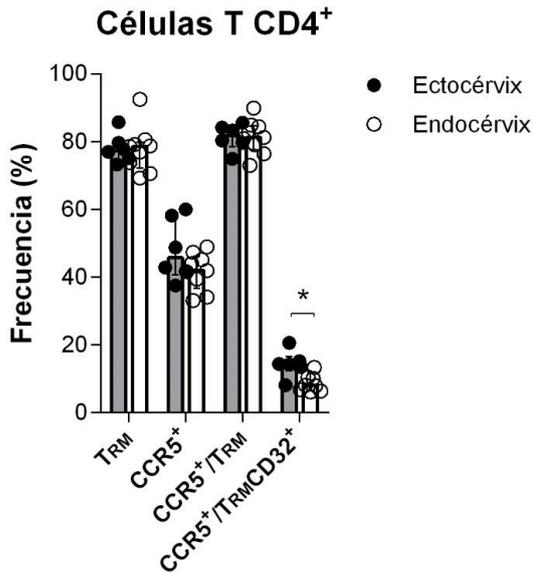


Figura 4. Frecuencia de diferentes poblaciones dentro de las células T CD4<sup>+</sup> en el ectocérvix (negro, n=6) y endocérvix (blanco, n=9). Las barras representan la mediana y las líneas, el rango intercuartílico de los datos. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Wilcoxon para comparar ambos grupos. \*p<0,05.

Dentro del análisis detallado del fenotipo de las T<sub>RM</sub> incluimos diferentes marcadores: algunas integrinas asociadas canónicamente a esta población (como CD103 o  $\alpha 1$ ) en otros tejidos<sup>49, 51</sup> y relacionadas también con el *homing* hacia la mucosa ( $\alpha 4\beta 7$ <sup>196</sup>); receptores de quimiocinas que modularían la migración de estas células fuera del tejido (CCR7); algunos otros correceptores del VIH-1 que les harían más vulnerables frente al virus (CXCR4 y CXCR6); y algunos receptores de interleucinas que les conferirían una longevidad y una capacidad de proliferación homeostática imprescindibles para mantener el reservorio viral (CD122, CD127 y CD132)<sup>189</sup>. Los resultados de este amplio análisis se muestran en la figura 5.

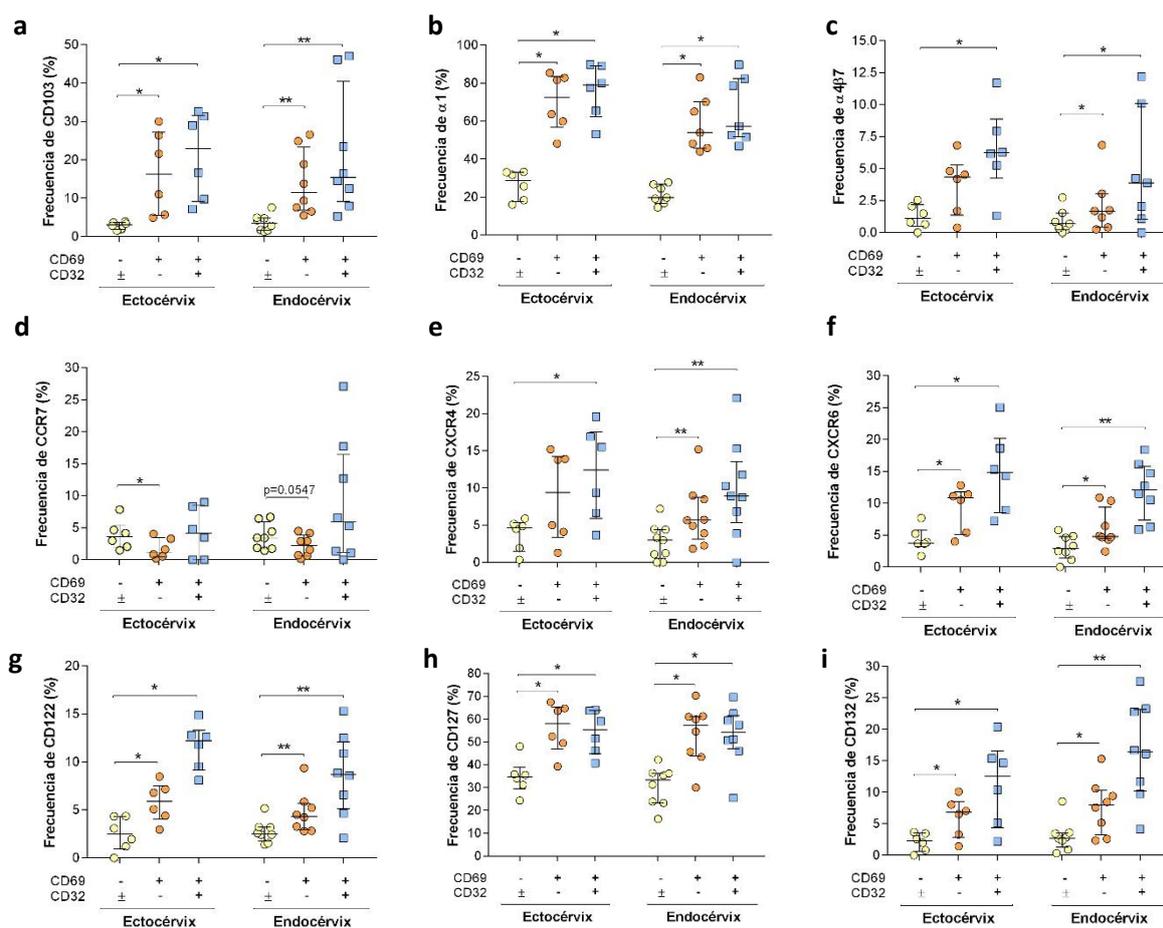


Figura 5. Frecuencia de expresión de diferentes proteínas de superficie dentro de tres poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup>, a saber: no-TRM (amarillo), TRM CD32<sup>-</sup> (naranja) y TRM CD32<sup>+</sup> (azul). N=6 en ectocervix y n=7-9 en endocervix. Las líneas representan la mediana y el rango intercuartílico de los datos. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Wilcoxon para comparar ambos grupos. \*p<0,05; \*\*p<0,01

En cuanto a las integrinas, observamos que en todos los casos estaban más asociadas a las TRM que a las no-TRM (CD69<sup>-</sup>), tanto en ecto como en endocervix. Además, la población de TRM CD32<sup>+</sup> presentaba incluso mayores niveles de todos estos marcadores, que en algunos casos están asociados también a una mayor susceptibilidad a la infección ( $\alpha 4\beta 7$ , figura 5 a-c)<sup>197</sup>. Por su parte, la expresión de CCR7 estaba más asociada a las no-TRM en ambos tejidos (figura 5 d), tal y como se esperaba, indicando que las TRM muestran una muy baja capacidad de recirculación. Los correceptores de VIH estudiados (CXCR4 y CXCR6) también presentaron mayores niveles de expresión en las células TRM, y más aún en las que expresaban CD32, confirmando que esta población podría ser más vulnerable a la infección por diferentes cepas de VIH-1 (figura 5 e, f). Por último, analizamos la expresión de diversos receptores de interleucinas: CD122 (cadena  $\beta$ ) y CD132 (cadena  $\gamma$ ) forman los receptores para la IL-2 y la IL-15, mientras que la combinación de CD127 (cadena  $\alpha$ ) y CD132 forma el receptor de la IL-7. De nuevo, vimos que las TRM expresaban mayores niveles de todos estos marcadores, especialmente las CD32<sup>+</sup> (figura 5 g-i). Sin embargo, los niveles de expresión de estas moléculas fueron muy diferentes: mientras que CD122 y CD132 sólo se expresaban en una pequeña población de las TRM (CD32<sup>+/+</sup>), la expresión de CD127 se observó en más del 55% de las células TRM, independientemente de su expresión de CD32. Esto confirmó que, tal y como se ha visto en otros tejidos<sup>51</sup>, la expresión de esta cadena está fuertemente asociada a las células de memoria presentes en el tejido cervical.

### 3. Infección *ex vivo*

Una vez confirmado que esta población presentaba ciertos marcadores que aumentaban su susceptibilidad a la infección por VIH-1, pasamos a estudiar la infección *ex vivo*, con el objetivo de comprobar si estas células se infectaban de manera preferencial. Para ello, el tejido cervicovaginal se infectó en las mismas condiciones que se describieron en el capítulo 1, con una cepa Bal a la misma TCID<sub>50</sub> (3655). El tejido se mantuvo en cultivo durante 10-12 días, y posteriormente fue digerido para analizar el porcentaje de p24 intracelular en diferentes poblaciones. En estos experimentos, se juntaron los bloques de tejido procedentes de ecto y endocérvix para los análisis. En la figura 6 se ilustra un análisis tipo de la citometría de este experimento, en el que los dos últimos gráficos de la línea inferior muestran un caso de tejido infectado (detección de p24) y otro de tejido no infectado (ausencia de p24, control negativo). Es importante aclarar que, durante la infección, la proteína accesoria viral Nef provoca una disminución de la expresión de CD4 en la membrana celular<sup>198</sup>, por lo que en estos análisis se estudió la población CD4<sup>+/−</sup>, asegurándonos de excluir las células CD8<sup>+</sup>.

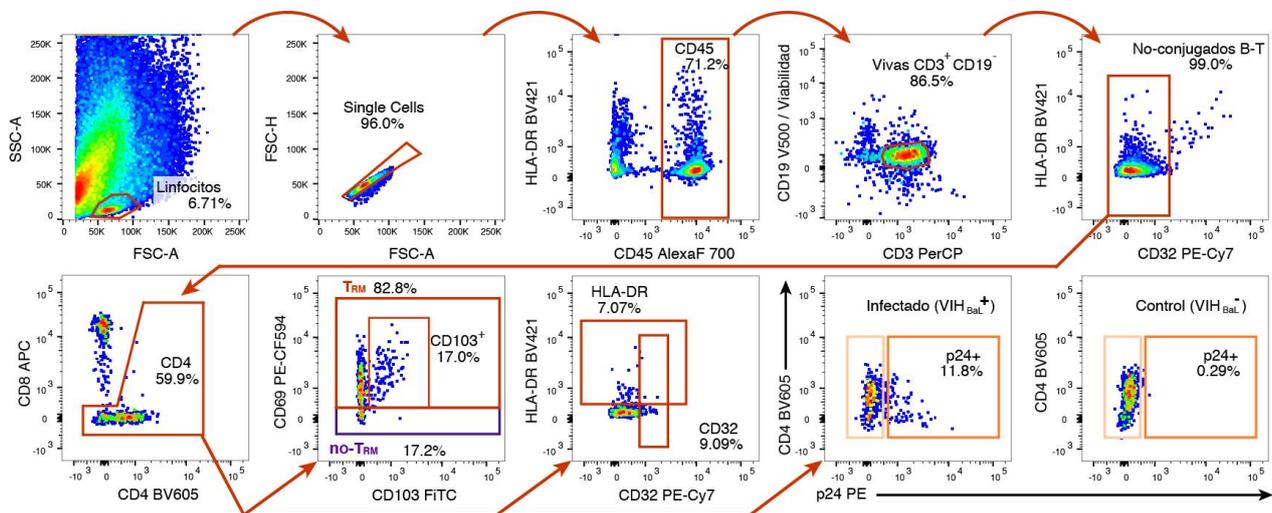


Figura 6. Estrategia general de gating para el análisis fenotípico y la detección intracelular de p24 en células T CD4<sup>+/−</sup> T<sub>RM</sub> y no-T<sub>RM</sub> obtenidas de tejido cervicovaginal infectado *ex vivo* con una cepa VIH-1<sub>Bal</sub>. La estrategia consistió en una selección de los linfocitos mediante el FSC vs SSC, seguida de una exclusión de dobletes, selección de células hematopoyéticas CD45<sup>+</sup> y células vivas CD3<sup>+</sup> (excluyendo a las células CD19<sup>+</sup>), nuevo descarte de células B y una selección final de células T CD4<sup>+/−</sup> a partir de la cual se seleccionaron las células no-T<sub>RM</sub> (morado) o T<sub>RM</sub> (naranja), así como las HLA-DR/CD32<sup>dim</sup>. Por último, se muestra un ejemplo de la expresión de p24 en tejido infectado y no infectado.

Los resultados de estas infecciones *ex vivo* demostraron que, en comparación con el total de CD4<sup>+</sup>, la fracción T<sub>RM</sub> estaba enriquecida en p24 (mediana de 7,3% en el total de CD4<sup>+</sup> frente a mediana de casi un 14% en las T<sub>RM</sub>, figura 7). Además, comparadas con la fracción no-T<sub>RM</sub>, todas las poblaciones analizadas presentaron tasas significativamente mayores de p24 intracelular, indicativo de un mayor grado de infección. Por último, al compararlas entre sí, observamos que la fracción T<sub>RM</sub> CD32<sup>+</sup> presentaba aún mayores niveles de p24 que las T<sub>RM</sub> y las T<sub>RM</sub> CD103<sup>+</sup>, ya que estas dos poblaciones mostraron niveles similares de infección.

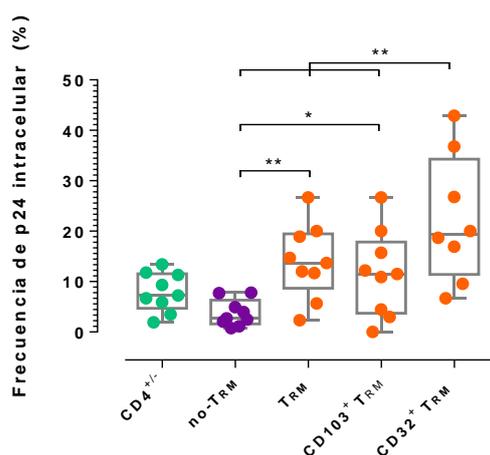


Figura 7. Frecuencia del antígeno p24 viral en el total de células CD4<sup>+/+</sup> (verde), CD4<sup>+/+</sup> no-T<sub>RM</sub> (morado), CD4<sup>+/+</sup> T<sub>RM</sub> (naranja), CD4<sup>+/+</sup> T<sub>RM</sub> CD103<sup>+</sup> y CD4<sup>+/+</sup> CD32<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> detectado tras 10-12 días de infección ex vivo de tejido cervicovaginal, detectado por citometría de flujo (n=8-9). La línea central representa la mediana; la caja, el rango entre los percentiles 25 y 75; y los bigotes, el rango total de los datos. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Wilcoxon. \*p<0,05; \*\*p<0,01

Por otro lado, cuando estudiamos qué poblaciones había dentro de las células productivamente infectadas (aquellas positivas para p24) vimos que, en prácticamente todos los tejidos, más del 50% eran células que expresaban CD69 (células T<sub>RM</sub>, figura 8), por lo que de nuevo confirmamos que esta población se infectaba de forma preferencial por el virus (p=0,003).

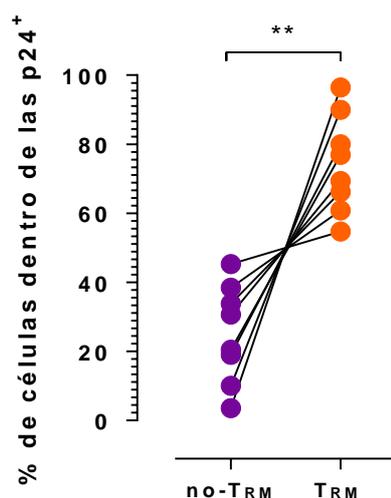


Figura 8. Frecuencia de las células no-T<sub>RM</sub> (morado) y T<sub>RM</sub> (naranja), dentro del total de células positivas para p24, medido por citometría de flujo (n=9). El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Wilcoxon. \*\*p<0,01

Para asegurarnos de que esta mayor abundancia de CD69 dentro de las células p24<sup>+</sup> no era debida a un aumento de su expresión causado por el propio virus (ya que provoca una activación de las células del tejido), llevamos a cabo una cinética de la expresión de CD69 en tejido infectado y no infectado durante 10 días (figura 9). Además, para observar la posible activación que el virus podía estar causando en el tejido, también estudiamos la cinética de HLA-DR en paralelo.

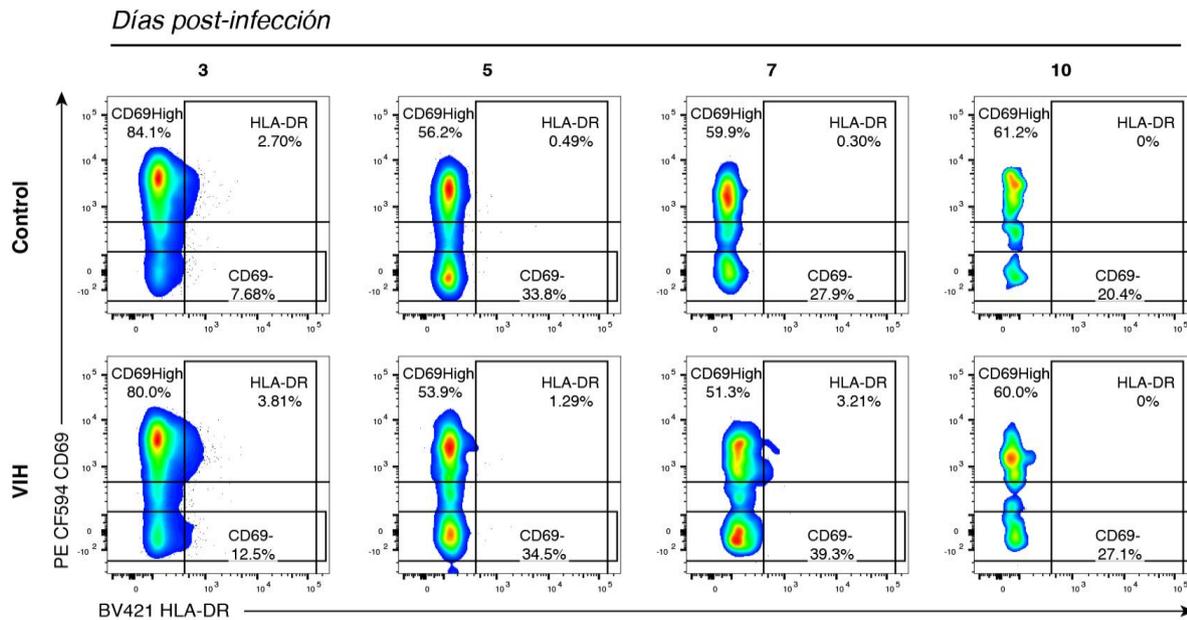


Figura 9. Frecuencia de HLA-DR y células CD69<sup>+</sup> o CD69<sup>-</sup> (a partir del total de células T CD4<sup>+</sup>) detectadas a 3, 5, 7 y 10 días de infección ex vivo de tejido cervicovaginal con una cepa VIH-1<sub>Bal</sub> (TCID<sub>50</sub> de 3655), utilizando citometría de flujo. Los gráficos de la fila superior muestran el tejido control no infectado, mientras que en la inferior se ve el tejido infectado a lo largo del tiempo.

Sorprendentemente, este experimento reveló que la frecuencia de CD69 en el tejido no solo no aumentó sino que disminuyó considerablemente durante el tiempo de infección tanto en el tejido infectado como en el control negativo, por lo que esta abundancia de CD69 entre las células infectadas no puede explicarse por un efecto activador del virus. Así, a diferencia de lo que sucede en sangre, este marcador no es un indicativo del estado de activación de las células en el tejido, sino que realmente identifica a las células T de memoria residentes en el mismo. Por otro lado, este experimento también reveló que la expresión de HLA-DR se mantuvo relativamente estable a lo largo del tiempo en ambas condiciones. Además, en contraposición a lo que se ha descrito en sangre<sup>193</sup>, los niveles de expresión de este marcador en las células productivamente infectadas del tejido fueron extremadamente bajos (<4% frente a >80%), lo que sugiere que las dinámicas de activación que se observan en sangre no son comparables a lo que sucede en el tejido.

A continuación, quisimos comprobar que la mayor parte de las células infectadas por el virus se mantenían en el tejido y se correspondían efectivamente con las células T<sub>RM</sub>. Para ello, cultivamos tejido infectado durante 10 días en un inserto de *transwell*, colocando medio R20 con 100 ng/ml de CCL19, CCL21 y 10 μM de S1P en la parte inferior, para observar qué células migraban a este compartimento. En la figura 10 se muestra una imagen representativa de los resultados de estos experimentos.

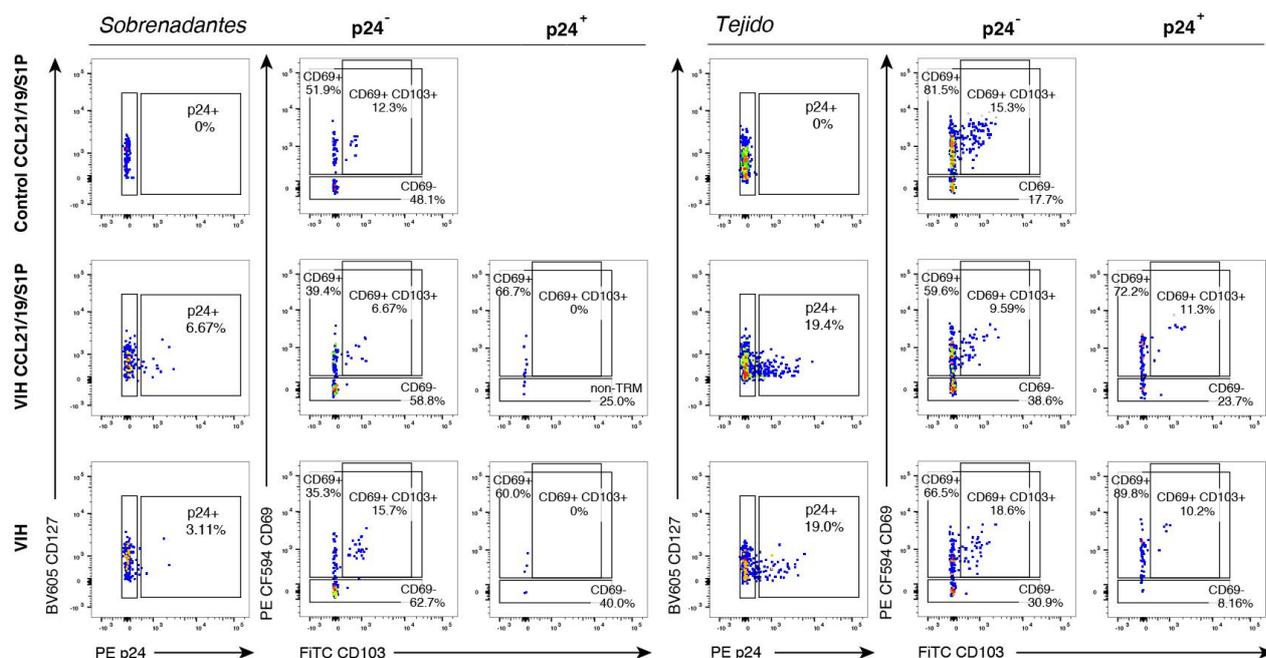


Figura 10. Imágenes representativas de la frecuencia del antígeno viral p24 (eje X) frente a CD127 (eje Y) en células CD8<sup>+</sup> de sobrenadantes (izquierda) y sus tejidos correspondientes (derecha), tratados o no con 100 ng/ml de CCL19 y CCL21, y 10  $\mu$ M de S1P a día 10 de infección. El resto de plots muestran la distribución de las células CD69<sup>+</sup> ( $T_{RM}$ ), CD69<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup>  $T_{RM}$  y CD69<sup>+</sup> ( $non-T_{RM}$ ) entre las células p24 positivas o negativas para cada condición.

Por un lado, observamos que la gran mayoría de las células productivamente infectadas (p24<sup>+</sup>) se localizaban en el tejido, tanto en presencia como en ausencia de quimiocinas (en torno al 19% frente a <7%). Por otro lado, constatamos nuestra hipótesis: la gran mayoría de células p24<sup>+</sup> que identificamos en el tejido eran CD69<sup>+</sup> ( $T_{RM}$ , >70%), mientras que en los sobrenadantes analizados encontramos muy pocas células infectadas que expresasen este marcador. Finalmente, también confirmamos que, tanto en presencia como en ausencia de quimiocinas, las frecuencias de células CD69<sup>+</sup> en cada compartimento se mantuvieron más o menos similares, indicando que esta población no migra en respuesta a las quimiocinas añadidas.

Por último, una PCR cuantitativa de las  $T_{RM}$  y no- $T_{RM}$  infectadas reveló que las primeras contaban con más moléculas de ADN viral por célula que las segundas, con una mediana de 2,15 moléculas de ADN viral por célula en las CD4<sup>+</sup>/<sup>-</sup>  $T_{RM}$  frente a la mediana de 0,88 moléculas que presentaron las no- $T_{RM}$  (figura 11), lo que de nuevo demostró que estas células albergaban una mayor cantidad de material viral, tanto proteico como genético.

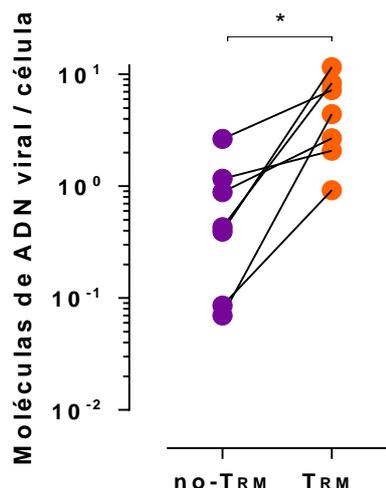


Figura 11. Número de moléculas de ADN viral por célula en no- $T_{RM}$  (morado) y  $T_{RM}$  (naranja) detectadas tras 10-12 días de infección ex vivo mediante qPCR (n=7). El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Wilcoxon.  $*p < 0,05$

Por otro lado, al estudiar el papel de CD32 en estas infecciones *ex vivo*, comprobamos que, aunque la mayoría de células  $p24^+$  eran  $CD32^-$ , la expresión de este marcador era significativamente más elevada en las células  $T_{RM}$  infectadas ( $CD69^+ p24^+$ ) en comparación con las no infectadas ( $CD69^+ p24^-$ ) (figura 12), lo que apoya nuestra hipótesis de que estas células son infectadas de manera preferencial por el virus.

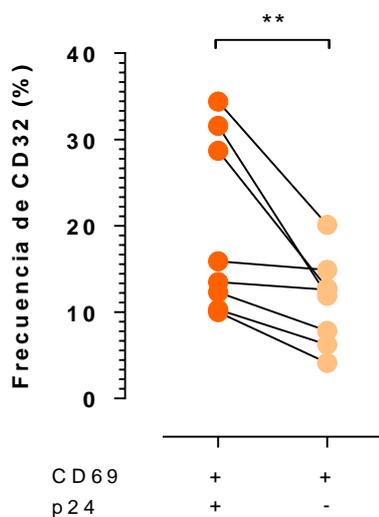


Figura 12. Frecuencia de CD32 en células  $p24^+$   $T_{RM}$  vs  $p24^-$   $T_{RM}$  medido mediante citometría de flujo (n=8). El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Wilcoxon.  $**p < 0,01$

Además, en cuatro de las muestras analizadas el número de células fue lo suficientemente elevado como para purificar la fracción  $T_{RM} CD32^+$  y llevar a cabo una medida de la cantidad de ADN proviral en dicha población mediante una PCR cuantitativa. Este experimento confirmó los datos obtenidos mediante citometría de flujo, ya que observamos que la cantidad de moléculas de ADN proviral por célula era mayor en las  $T_{RM} CD32^+$  si las comparábamos con las  $T_{RM} CD32^-$  (figura 13), lo que reveló que la carga viral de esta población era superior tanto a nivel genético como proteico.

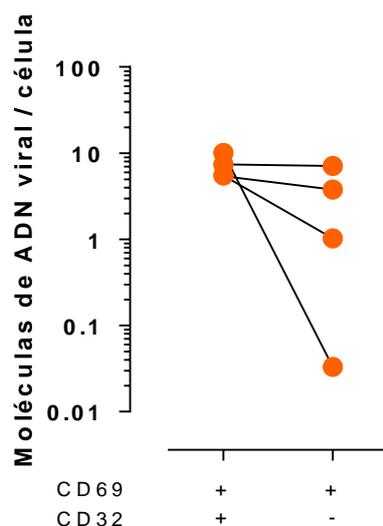


Figura 13. Número de moléculas de ADN viral por célula en  $T_{RM} CD32^+$  y  $T_{RM} CD32^-$  detectadas tras 10-12 días de infección ex vivo mediante qPCR ( $n=4$ ). El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Wilcoxon.

Así, se observó que, en el tejido cervicovaginal de mujeres sanas, las células de memoria residentes  $CD4^+$ , caracterizadas por la expresión de CD69, representaban una diana preferente para el VIH-1 en una infección *ex vivo*, ya que presentaban mayores niveles de proteína y ADN viral que las células  $CD69^-$ . Además, dentro de esta población, aquellas células que expresaban también CD32 mostraban mayores tasas de infección, medidas en base a esos mismos parámetros, que sus homólogas  $CD32^-$ , por lo que podemos afirmar que, en esta población celular, CD32 es un marcador asociado a una mayor susceptibilidad al virus o a una infección productiva, ya que podría *upregularse* una vez que las células se infectan.

#### 4. Efecto del virus sobre las células $T_{RM}$ de mujeres VIH+

Una vez estudiado el efecto del virus en la infección *ex vivo* de tejido cervicovaginal, quisimos estudiar los efectos de este patógeno sobre la población de células  $T CD4^+$  de memoria residentes en el tejido cervical de mujeres VIH+ tratadas. Para ello, realizamos un análisis mediante citometría de flujo de la frecuencia de diferentes poblaciones de células  $T_{RM}$  en dicho tejido. Dicho análisis se ilustra en la figura 14, donde se comparan las frecuencias de diferentes poblaciones dentro del total de células  $CD45^+$  en mujeres sanas y mujeres infectadas por el virus y con carga viral indetectable.

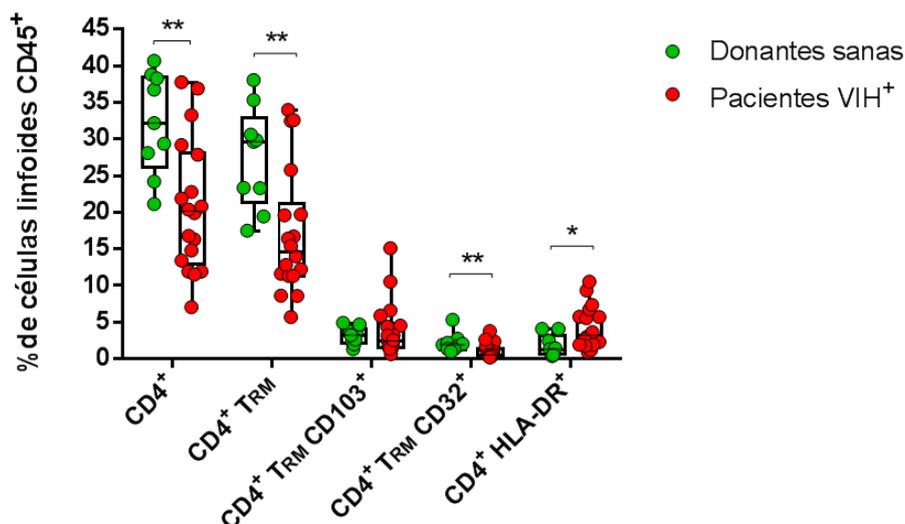


Figura 14. Frecuencia de células  $CD4^+$ ,  $T_{RM}$ ,  $T_{RM} CD103^+$ ,  $T_{RM} CD32^+$  y  $CD4^+ HLA-DR^+$  en el total de linfocitos  $CD45^+$  en el tejido cervical de donantes no infectadas (verde,  $n=9$ ) y pacientes VIH<sup>+</sup> (rojo,  $n=18$ ). La línea central representa la mediana; la caja, el rango entre los percentiles 25 y 75; y los bigotes, el rango total de los datos. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Mann-Whitney para las comparativas entre ambos grupos de pacientes. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$

Lo primero que observamos fue que, en consonancia con lo que se observa en sangre<sup>199</sup>, las mujeres VIH<sup>+</sup> contaban con una menor frecuencia de células  $CD4^+$  que las mujeres sanas, y dentro de esta fracción, la presencia de células  $T_{RM}$  era también significativamente menor en las mujeres infectadas. Este hecho puede deberse a que los linfocitos T  $CD4^+$  son la diana principal del virus, por lo que muchos de ellos mueren a consecuencia de sus efectos citopáticos. De hecho, estos efectos también podrían ser los responsables de la menor frecuencia de células  $T_{RM} CD32^+$  que observamos en los tejidos de donantes VIH<sup>+</sup> ya que, como se ha descrito en el apartado anterior, esta población parece ser infectada de forma preferente por el virus. Por otro lado, tal y como ya se había descrito en la literatura<sup>200</sup>, las muestras de las pacientes VIH<sup>+</sup> mostraron una mayor frecuencia de células HLA-DR<sup>+</sup>, lo que concuerda con el hecho de que se trata de pacientes con una infección crónica en quienes la presencia del virus causa un estado continuo de activación del sistema inmunitario especialmente en los tejidos, a pesar del tratamiento eficaz. De hecho, al analizar las diferentes poblaciones de  $T_{RM}$  de forma individual, observamos que la frecuencia de HLA-DR fue superior en las pacientes VIH<sup>+</sup> en todos los casos (figura 15).

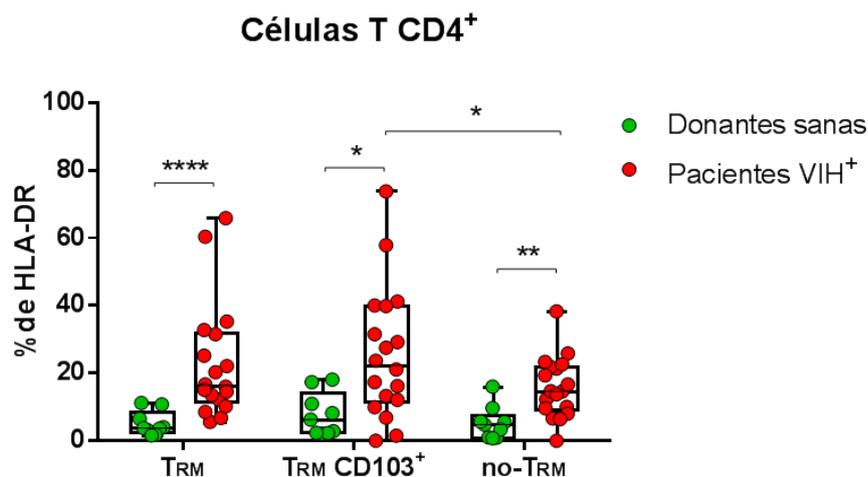


Figura 15. Expresión de HLA-DR en células  $T_{RM}$ ,  $T_{RM} CD103^+$ , y no- $T_{RM}$  del tejido cervical de donantes no infectadas (verde,  $n=9$ ) y pacientes VIH<sup>+</sup> (rojo,  $n=18$ ). La línea central representa la mediana; la caja, el rango entre los percentiles 25 y 75; y los bigotes, el rango total de los datos. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Mann-Whitney para las comparativas entre ambos grupos de pacientes, mientras que para las comparativas intra-grupales se utilizó el test de Friedman con la corrección posterior de Dunn para comparaciones múltiples. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$

## 5. Reservorio en cérvix vs sangre: contribución de cada subpoblación

La mayor parte de los estudios del reservorio viral se han centrado en la sangre, los tejidos linfáticos y el tejido gastrointestinal, mientras que otros tejidos relevantes tales como el tracto genital no han sido estudiados en detalle. Este tejido representa la vía de entrada principal del virus en los contagios por vía sexual, por lo que cabe esperar que sea uno de los primeros tejidos en los que el virus establece sus reservorios. Debido a esto, a continuación estudiamos la distribución del reservorio viral en algunas de las pacientes VIH<sup>+</sup> incluidas en los análisis anteriores, las cuales llevaban al menos un año en tratamiento antirretroviral con carga indetectable, siendo la mediana de años en estado indetectable de 4,5 en nuestro grupo de estudio. Para ello, en muestras obtenidas al mismo tiempo comparamos, mediante PCR cuantitativa, la cantidad de ADN viral en el total de células CD4<sup>+</sup>/<sup>-</sup> (CD8<sup>-</sup>) de la sangre o del tejido cervicovaginal de estas pacientes, para incluir en el análisis todas aquellas células CD4<sup>+</sup> que sufren una disminución de la expresión de este marcador debido a la infección viral.

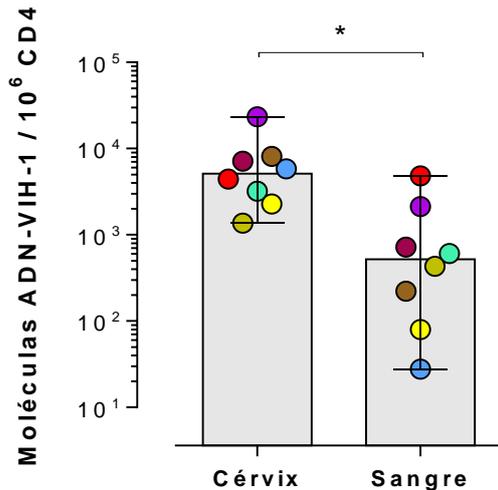


Figura 16. Número de moléculas de ADN viral por millón de células T CD4<sup>+/-</sup> en el cérvix y la sangre de las mismas pacientes VIH<sup>+</sup> en TAR (n=8). Las barras y líneas representan la mediana y el rango de los datos, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Wilcoxon. \*p<0,05

Tal y como se observa en la figura 16, este análisis reveló que prácticamente todas las donantes presentaban mayor cantidad de ADN viral en el tejido cervical que en sangre, confirmando que este tejido representa un reservorio viral que hasta ahora no había sido estudiado. De hecho, las células T CD4<sup>+/-</sup> de la sangre contenían entre 28 y 2027 copias de ADN viral por millón de células T CD4<sup>+/-</sup> mientras que, en el tejido, esta misma población presentaba entre 2792 y 61 642 copias por millón de células, lo que supone entre 4 y 200 veces más cantidad de material genético. Cabe destacar que el número de pacientes incluidas en estos análisis fue inferior al de los análisis fenotípicos anteriores debido a que el número de células recuperadas mediante separación por citometría de flujo fue muy variable, lo que limitó los experimentos de PCR.

A continuación, analizamos la contribución de las células T<sub>RM</sub> a este reservorio en el cérvix (figura 17) y vimos que, en todas las muestras analizadas, prácticamente la totalidad del material genético viral se localizaba en esta población. No obstante, este hecho también se explica porque las células T<sub>RM</sub> son la población mayoritaria dentro de este tejido, con lo que cabe pensar que sean las contribuidoras principales al reservorio viral simplemente debido a su alta frecuencia (ver Tabla anexa 3, *Número de células recuperadas en los experimentos de sorting*).

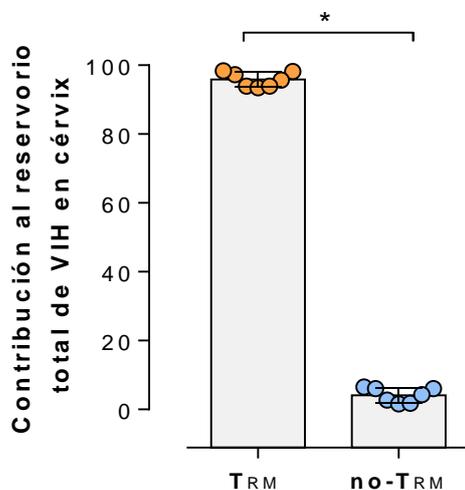


Figura 17. Contribución de las células CD4<sup>+/-</sup> T<sub>RM</sub> y no-T<sub>RM</sub> al reservorio total de VIH en el tejido cervicovaginal (n=8). Las barras y líneas representan la mediana y el rango de los datos, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Wilcoxon. \*p<0,05

Estos resultados contrastan con lo observado en sangre, donde la distribución del reservorio era mucho más equitativa entre las diferentes poblaciones analizadas, sin un claro protagonista (figura 18).

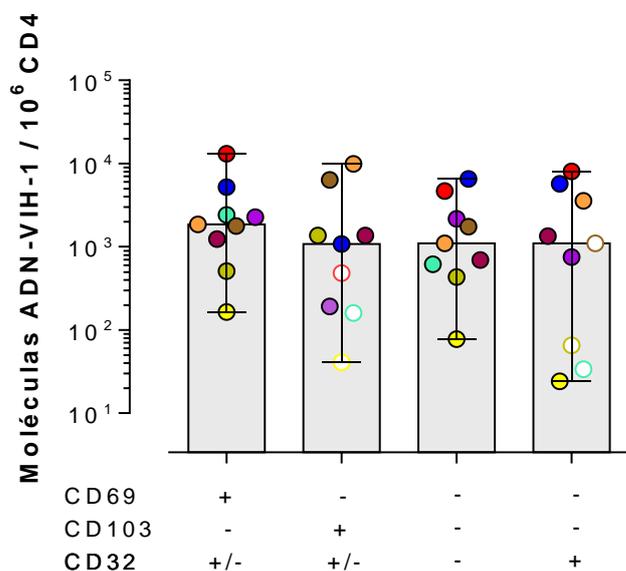


Figura 18. Número de moléculas de ADN viral por millón de células CD4<sup>+</sup> en cuatro poblaciones de células de sangre periférica de pacientes VIH<sup>+</sup> (células T CD4<sup>+</sup> separadas en base a su expresión de CD69, CD103 y CD32; n=9). Las barras y líneas representan la mediana y el rango de los datos, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Friedman con la corrección posterior de Dunn para comparaciones múltiples.

Sin embargo, pese a que todas las poblaciones estudiadas presentaban cantidades similares de ADN viral, la contribución de las mismas era claramente diferente, siendo las células CD69<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>CD32<sup>-</sup> las que mayor peso tenían dentro de este reparto (figura 19). Este hecho se explica porque, al igual que sucedía en el tejido cervical, la frecuencia de esta población era proporcionalmente muy superior a la de las otras tres (> 94% del total de CD4<sup>+</sup>), con lo que no es de extrañar que la mayor parte del material genético del virus se encontrara alojado en ella.

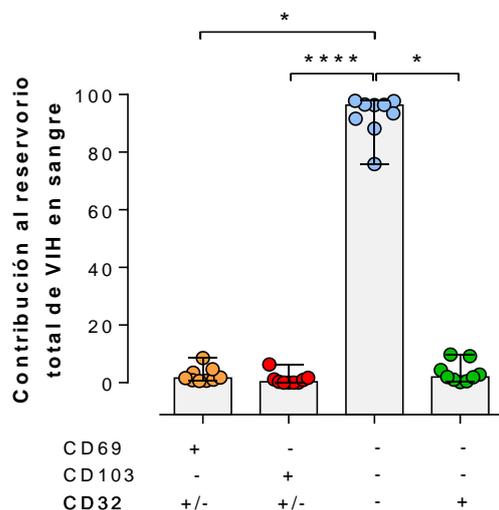


Figura 19. Contribución de las poblaciones analizadas en la figura 18 al reservorio total de VIH en sangre (n=9). Las barras y líneas representan la mediana y el rango de los datos, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Friedman con la corrección posterior de Dunn para comparaciones múltiples. \*p<0,05; \*\*\*\*p<0,0001

Como conclusión, resulta relevante observar que, pese a mantener una carga viral indetectable en sangre durante un periodo de tiempo superior a un año, las mujeres VIH<sup>+</sup> aquí analizadas presentaban ADN viral en diferentes poblaciones tanto de la sangre como del tejido cervicovaginal, siendo este último un reservorio mucho más significativo. Así, la presente tesis

muestra la relevancia de este tejido y, en especial, de las T<sub>RM</sub>, en la persistencia del VIH en el organismo mediante el establecimiento de reservorios virales.

## 6. Las células CD4<sup>+</sup>/- T<sub>RM</sub> contienen genomas intactos del VIH

Para terminar de redondear estos resultados, quisimos saber si el ADN viral encontrado en estas poblaciones era capaz de generar nuevas partículas virales (ADN competente). Para ello, en primer lugar hicimos un ensayo de cuantificación del crecimiento viral (qVOA) a partir de 37 500 T<sub>RM</sub> obtenidas del cérvix de una paciente VIH<sup>+</sup>. Sin embargo, dicho número fue insuficiente para detectar eventos positivos mediante este ensayo. Por ello, recurrimos a otra técnica de mayor sensibilidad y gran similitud con el qVOA: el ensayo de ADN proviral intacto (IPDA)<sup>181</sup>. Para estos experimentos utilizamos las células T<sub>RM</sub> obtenidas del cérvix de otras dos pacientes VIH<sup>+</sup> que habían estado en TAR durante varios años ( $\geq 10$ ). Los resultados de este experimento de PCR digital en gotas (*digital droplet PCR*) pueden verse en la figura 20. De forma breve, pese a que fuimos capaces de detectar gotas con material genético del virus en ambas pacientes, únicamente en la muestra con un mayor número de células (>40 000 en la M30 frente a 7 900 en la M33) fuimos capaces de encontrar genomas intactos (un 33% del total de gotas). Así, podemos concluir que hemos sido capaces de detectar material genético del virus del VIH intacto y, por tanto, con más probabilidad de ser competente, en tejido cervicovaginal de pacientes virológicamente suprimidas y con varios años en tratamiento antirretroviral, lo que corrobora nuestra hipótesis de que este tejido alberga reservorios del VIH.

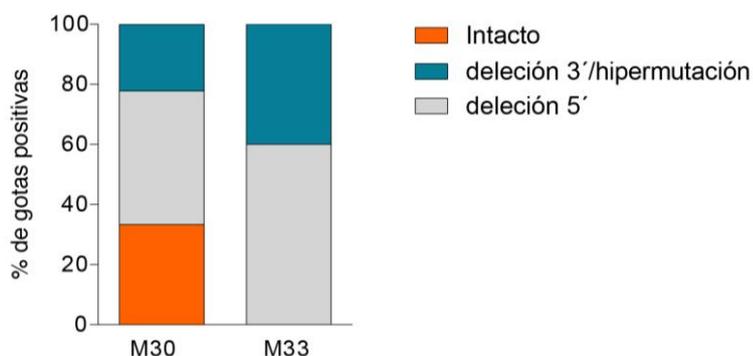
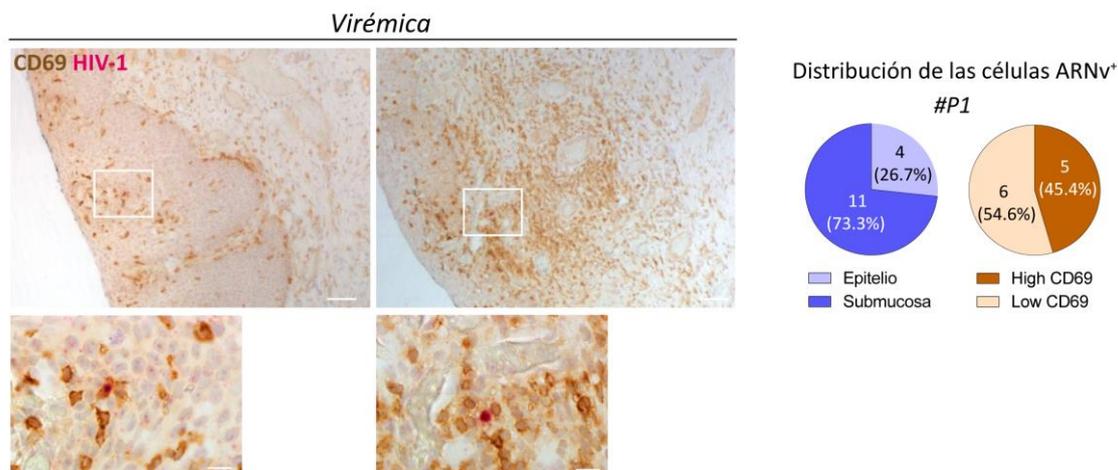


Figura 20. Porcentaje de gotas positivas para el VIH en las muestras analizadas. Los provirus intactos se corresponden con las gotas positivas para la amplificación de Psi y env y se representan en naranja, mientras que los provirus no intactos se representan en azul (delección/hipermutación en 3', positivos para Psi) o gris (delección/hipermutación en 5', positivos para env).

## 7. Localización de células ARN-VIH<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> en la mucosa cervicovaginal (RNA scope)

Por último, estudiamos la localización de estas células CD69<sup>+</sup> en el tejido cervical de pacientes VIH<sup>+</sup> mediante inmunohistoquímica, combinando esta detección con una técnica de hibridación *in situ* (ISH) para determinar si dicho tejido contenía también células positivas para ARN del VIH (ARNv<sup>+</sup>), lo que revelaría una transcripción activa del virus. Para ello, se examinaron muestras de seis mujeres en tratamiento antirretroviral y con carga viral indetectable en el momento de obtención de la muestra, y de una mujer virémica sin tratamiento. Como era de

esperar, en la mucosa cervical de la paciente virémica observamos células positivas para el ARN viral, las cuales se localizaban tanto en la submucosa (casi el 75%) como en el epitelio (figura 21). Además, varias de estas células ARNv<sup>+</sup> co-expresaban CD69 tanto en el epitelio como en la lámina propia.



*Figura 21. Imágenes representativas de la tinción de CD69 y ARN viral (ARNv<sup>+</sup>) en el cérvix de una paciente virémica VIH<sup>+</sup>. En detalle (imágenes inferiores, ampliación de los recuadros blancos), se muestran células co-expresando ambos marcadores en el epitelio (izquierda) y la submucosa (derecha) de la misma muestra. Las barras de escala representan 100 (arriba) y 20 (abajo)  $\mu\text{m}$ , respectivamente. El gráfico azul muestra la distribución de las células ARNv<sup>+</sup> identificadas ( $n=15$ ) entre el epitelio (azul claro) y la submucosa (oscuro) de esta paciente. El gráfico marrón ilustra la proporción de células ARNv<sup>+</sup> de la submucosa ( $n=11$ ) asociadas a regiones enriquecidas en CD69 (marrón oscuro) o en otras regiones (marrón claro).*

Lo más sorprendente fue descubrir que, en las muestras de pacientes virológicamente suprimidas, también encontramos células ARNv<sup>+</sup> que además expresaban CD69 en ambos compartimentos (figura 22), con una distribución similar a la observada en la paciente virémica. Pese a que la cantidad de células ARNv<sup>+</sup> por milímetro cuadrado de tejido era menor en las pacientes tratadas (0,059 células/ $\text{mm}^2$  frente a 0,106 células/ $\text{mm}^2$ ), resulta interesante constatar que existe una transcripción viral activa en los tejidos de estas mujeres pese a tener una carga viral indetectable en sangre. Además, esta transcripción estaba asociada tanto al epitelio como a la expresión de CD69 en algunos casos y, por tanto, a las células T<sub>RM</sub>.

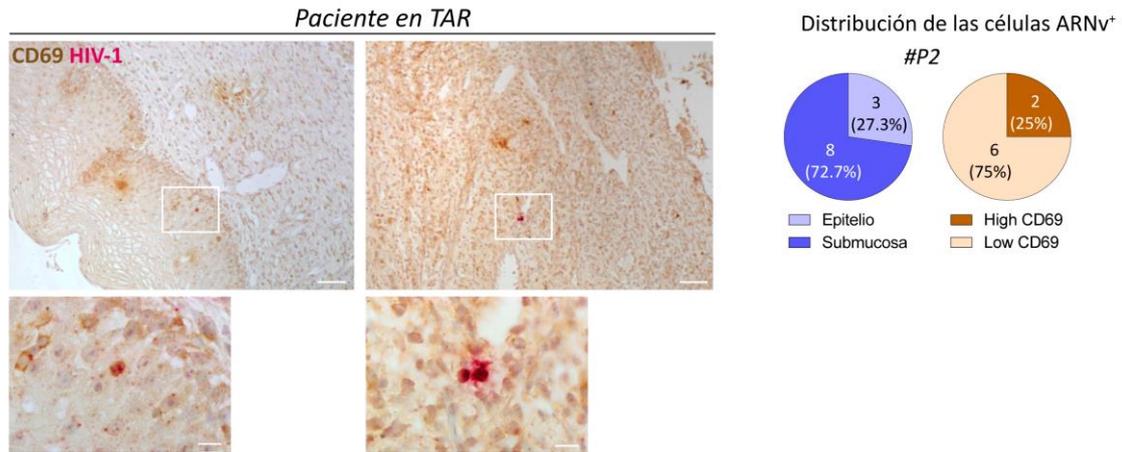


Figura 22. Imágenes representativas de la tinción de CD69 y ARN viral (ARNv<sup>+</sup>) en el cérvix de una paciente VIH<sup>+</sup> con carga viral indetectable y en TAR. En detalle (imágenes inferiores, ampliación de los recuadros blancos), se muestran células co-expresando ambos marcadores en el epitelio (izquierda) y la submucosa (derecha) de la misma muestra. Las barras de escala representan 100 (arriba) y 20 (abajo)  $\mu$ m, respectivamente. Los gráficos de la derecha muestran las mismas proporciones que los de la figura 21, siendo en este caso 11 las células ARNv<sup>+</sup> detectadas en el cérvix (8 de ellas en la submucosa).





## **Discusión**



El papel fundamental del sistema inmunitario es la protección del organismo frente a las amenazas que puedan comprometer su integridad. Gran parte de estas amenazas se dan en forma de agentes patógenos externos como bacterias, hongos o virus, causantes de la totalidad de las infecciones de transmisión sexual (ITS) que se conocen. La manera más eficaz de hacer frente a estas infecciones es atacarlas en el mismo punto de entrada, es decir, en el tejido genital, para evitar su diseminación. Al igual que el resto de mucosas, el tracto genital cuenta con una serie de poblaciones inmunitarias que residen allí con el fin de establecer una primera línea de defensa. A día de hoy, el conocimiento que tenemos acerca de la inmunidad de la mucosa en el tracto genital femenino es bastante limitado, por lo que la presente tesis se centra en estudiar el papel del sistema inmune frente a dos de las ITS con mayor prevalencia a día de hoy: el VIH y la clamidia. Para ello, hemos utilizado el explante cervicovaginal humano como modelo en el que estudiar la respuesta inmune residente, ya que mantiene la integridad del tejido y permite que las diferentes células que lo componen estén en contacto. Mediante este modelo hemos estudiado la actividad de las células inmunitarias desde dos puntos de vista diferentes pero relacionados entre sí: por un lado, como agentes neutralizantes de la infección, y por otro, como elementos que los patógenos pueden utilizar para establecer una infección crónica. En ambos casos, el objetivo final de estos estudios es generar conocimiento para poder modular estas células y potenciar una respuesta eficaz que elimine definitivamente ambos microorganismos e incluso impida la infección inicial.

## 1. Infección por *Chlamydia trachomatis*

En lo referente a *Chlamydia trachomatis*, se sabe que esta bacteria es capaz de infectar tanto a hombres como a mujeres. Sin embargo, en mujeres, hasta el 80% de los casos se desarrollan de manera asintomática, de modo que la infección puede ascender hasta el tracto genital superior y comprometer seriamente la fertilidad de la afectada, llegando incluso a causar esterilidad<sup>66</sup>. Por ello, y teniendo en cuenta el creciente número de cepas resistentes a los antibióticos de primera línea, la manera ideal de enfrentar este problema de salud pública sería la vacunación, pero a día de hoy no existe una vacuna eficaz y segura que pueda ser ampliamente administrada<sup>201</sup>. Una parte importante de esta vacuna son los adyuvantes, ya que éstos pueden ayudar a dirigir la respuesta inmune generada hacia el perfil más adecuado para hacer frente al patógeno en cuestión. En el caso de *Chlamydia trachomatis*, el perfil deseado es el Th1, caracterizado por la secreción de grandes cantidades de IFN- $\gamma$ . En este sentido, en ratones, se han estudiado diversas moléculas como potenciales adyuvantes para estas vacunas, todas ellas orientadas a estimular el sistema inmunitario a través de las vías de los TLRs<sup>83, 202, 203</sup>. No obstante, las diferencias que existen entre humanos y ratones implican que los avances realizados en la protección frente a *Chlymidia muridarum* (la cepa que infecta de forma natural a esta especie) no necesariamente puedan trasladarse a los humanos, por lo que se necesita más investigación con modelos relevantes como el de nuestro explante cervicovaginal.

Por estos motivos, en la presente tesis nos hemos centrado en el estudio de adyuvantes que actúan a través de la molécula CD1d del complejo mayor de histocompatibilidad: los glicolípidos. Esta estrategia cuenta con la ventaja de que, al estar CD1d tan conservado entre

individuos<sup>204</sup>, podría ser utilizado como adyuvante universal y eficaz en una muy elevada proporción de la población. Así, gracias a una colaboración con el Dr. Llebaría, químico del Instituto de Química Avanzada de Cataluña, hemos podido estudiar la actividad de diversos compuestos sintéticos desarrollados en su laboratorio y basados en la estructura de la  $\alpha$ -GalactosilCeramida ( $\alpha$ GC), el compuesto de referencia en la vía de presentación antigénica del CD1d.

### **1.1. Efecto de los glicolípidos sobre las células inmunitarias del tracto genital femenino**

El primer paso fue estudiar la capacidad de estos compuestos para inducir una secreción de citocinas, idealmente aquellas asociadas a un perfil tipo Th1. Por este motivo, nos centramos fundamentalmente en cuantificar la secreción de IFN- $\gamma$ . Para ello, realizamos un cribado de entre todos los compuestos disponibles mediante un co-cultivo de células HeLa e iNKT primarias en presencia de los diferentes candidatos. Estos experimentos, en combinación con los llevados a cabo por nuestros colaboradores, permitieron descartar una serie de glicolípidos por su baja capacidad de inducir esta secreción. A su vez, también mostraron que algunos de ellos generaban una respuesta similar o incluso superior a la producida por la  $\alpha$ GC, por lo que fueron seleccionados para los experimentos posteriores. Cabe destacar que, en algunos casos, estas respuestas fueron dispares entre los diferentes individuos y técnicas utilizadas, lo que podría explicarse debido a la relativa variabilidad que presenta en humanos el TCR de las células iNKT, responsable de la respuesta que se genera ante el antígeno presentado<sup>183</sup>.

Por otro lado, también determinamos la secreción de citocinas características de los diferentes perfiles Th en esos mismos sobrenadantes, para tener una visión más global del efecto de estos compuestos. Dichos análisis revelaron de nuevo una gran variabilidad entre individuos, y sirvieron para confirmar la criba realizada en base a la secreción de IFN- $\gamma$ . En general, vimos que la concentración de citocinas asociadas al perfil Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12) era considerablemente superior a la de las asociadas al perfil Th2 (IL-4, IL-13), lo que parece indicar que todos estos compuestos tienden a generar respuestas con un carácter Th1 más pronunciado. Por último, las cantidades de IL-17A detectadas en estos ensayos fueron mínimas en comparación con el resto de citocinas. Esta interleuquina es la principal representante del perfil Th17, el cual tiene especial relevancia en la mucosa y en la eliminación de la infección por clamidia en ratones, donde se ha asociado a una respuesta protectora más eficaz<sup>80, 82, 83</sup>. Aún así, el perfil Th17 también se ha asociado con patologías autoinmunitarias y daño tisular<sup>205</sup>, por lo que estos niveles aparentemente bajos de IL-17A podrían ser suficientes para potenciar una respuesta protectora frente a clamidia sin afectar a la integridad del tejido. En cualquier caso, es importante tener en cuenta que estos resultados se obtuvieron a partir de células aisladas de sangre, mientras que es en el tejido donde el perfil Th17 tiene mayor representación.

Una vez identificados los glicolípidos más prometedores, estudiamos su efecto sobre el tejido cervicovaginal. Para ello, el primer paso fue establecer la vía de administración más adecuada. Después de estudiar diferentes estrategias de distribución, llegamos a la conclusión de que la opción más eficaz era la atracción de las células de interés al medio de cultivo mediante una quimiocina (CCL19, también conocida como MIP-3- $\beta$ , reconocida por el receptor CCR7), puesto que esto permitía superar los problemas de penetración de los compuestos en el tejido, a la vez que fomentaba el contacto entre las células presentadoras de antígeno y las células diana (iNKT). Esta estrategia fue la que nos permitió observar un efecto más notorio en el tejido, ya que observamos una mayor frecuencia de: células iNKT, células NK activadas (mayor expresión de CD69) y células mieloides maduras con mayor expresión de CD40. Dichos experimentos confirmaron que la adición de  $\alpha$ GC a bloques de tejido cervicovaginal en cultivo tiene un efecto sobre las diferentes poblaciones que componen la inmunidad de la mucosa, creando un estado de activación y de maduración que podría conllevar una respuesta efectora más robusta.

Tal y como previamente hicimos con células sanguíneas, a continuación estudiamos la secreción de diferentes citocinas que estos glicolípidos inducían en las células de la mucosa genital femenina. En comparación con los resultados obtenidos a partir de células de la sangre, las concentraciones de IFN- $\gamma$  que observamos aquí fueron varios órdenes menores, lo que puede explicarse en base a que la frecuencia de células iNKT presentes en estos pequeños bloques de tejido es muy baja (en torno a un 0,1% del total de células T<sup>185</sup>), y ello supone una limitación técnica en dicho modelo, mientras que en los experimentos con células HeLa ambos tipos celulares se cultivaron en igualdad de número. Por esto, y debido a la baja reproducibilidad de los resultados (que podría deberse, en parte, a cierta variación interindividual en el TCR de las iNKT debida a la región de complementariedad 3 (CDR3) $\beta$ , que modula la afinidad del TCR por el complejo CD1d-glicolípido<sup>206</sup>), es difícil extraer conclusiones fiables.

Por su parte, los niveles de TNF- $\alpha$  que observamos sí que fueron de un orden similar a los observados en los experimentos con iNKTs circulantes, lo que puede explicarse porque esta es una citocina secretada por una gran cantidad de poblaciones inmunitarias y supone una de las primeras líneas de actuación en la gran mayoría de respuestas inmunes<sup>186</sup>. En base a estos resultados, los glicolípidos HS161, YHS-01-45, YHS-01-46 fueron los que mayor actividad presentaron, mientras que YHS-01-60, pese a generar cantidades significativas de IFN- $\gamma$ , apenas indujo secreción de TNF- $\alpha$ .

En relación con estos resultados, el estudio del efecto adyuvante que estos compuestos inducen en las diferentes poblaciones inmunitarias de interés presentes en la mucosa cervical (analizado en base a su fenotipo) no mostró diferencias significativas entre dichos compuestos. Nuevamente, la variabilidad de resultados entre unos individuos y otros fue muy elevada, lo que podría deberse a diferencias de edad y del estado del ciclo menstrual entre las donantes, ya que se sabe que estos factores están relacionados con cambios importantes a nivel hormonal, lo que

a su vez influye en el sistema inmunitario<sup>44, 185, 207</sup>. Las células mieloides se ven especialmente afectadas por estos factores, ya que en estudios anteriores con este mismo tejido hemos visto que la frecuencia de las células CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> y su capacidad de responder frente a estímulos externos depende del estado del ciclo menstrual de la donante, lo que incluye también la menopausia<sup>185</sup>. En este sentido, se ha descrito que tanto las células dendríticas como las células T<sub>RM</sub> CD8<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> disminuyen en el cérvix con la edad<sup>208</sup>, por lo que es posible que también pierdan capacidad de respuesta frente a estímulos externos. En el caso que nos ocupa, las donantes de estos experimentos se encontraban en estados muy diferentes entre sí (amenorrea, menopausia o fase proliferativa, entre otros), lo que sin duda influye en los resultados. Por último, conviene recordar que, en nuestros experimentos, las células mieloides presentan una baja frecuencia (en torno a un 10-20% del total de células CD45<sup>+</sup>, en general) y son menos viables en cultivo que el resto de poblaciones inmunitarias. Pese a todos estos *handicaps*, la incubación con HS161 y  $\alpha$ GC mostró una tendencia a aumentar la expresión de CD40 en las poblaciones mieloides analizadas, lo que indica un mayor estado de activación y maduración.

Este efecto adyuvante también se analizó en diferentes poblaciones linfocitarias. Por un lado, el estado de activación del total de linfocitos CD3 se estudió en base a su expresión de CD69 y HLA-DR pese a que, como se ha comentado, en el tejido, CD69 identifica mayoritariamente a linfocitos T de memoria residentes (células T<sub>RM</sub> tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>), también puede ser un indicador de activación, de manera similar a HLA-DR. Así, no observamos que la incubación con estos compuestos genere una mayor activación en general, si bien es cierto que, en el caso de las iNKT, su baja frecuencia en comparación con las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> hace que su variación quede diluida en el total de la población. En consecuencia, al estudiar estos marcadores en las iNKT de forma específica, los resultados se ven muy afectados por su bajo número, por lo que es difícil evaluar el efecto de estos compuestos sobre esta población. De forma complementaria, también estudiamos la frecuencia de las iNKT tras la administración de los diferentes compuestos, ya que se ha descrito que la administración de  $\alpha$ GC induce una expansión de esta población<sup>209, 210</sup>. Sin embargo, no vimos ningún indicio de proliferación, lo que seguramente se deba a que las células necesiten más de una noche para expandirse.

Por último, tampoco se observaron diferencias significativas en el nivel de activación de las células NK, aunque cabe destacar que los niveles de expresión de HLA-DR en esta población fueron muy inferiores a los de CD69, lo que probablemente se deba a que existen poblaciones de células NK residentes en el tejido, caracterizadas también por la expresión de CD69, entre otros<sup>187</sup>. En sangre, se ha descrito una pequeña población de células NK que expresa bajos niveles de HLA-DR (en torno al 4%), pero que presenta una potente actividad citolítica<sup>211, 212</sup>, por lo que sería interesante analizar la expresión de perforina y granzima en estas células para ver si se incrementa en respuesta a alguno de los compuestos de estudio, potenciando así la respuesta inmune. En cualquier caso, ninguno de los glicolípidos indujo una mayor activación en esta población. Una posible explicación para este fenómeno es que las células implicadas (NK y APC) no hayan podido entrar en contacto en el sobrenadante al tratarse de una placa de 12

pocillos, con una gran superficie. Sería también interesante estudiar si el cultivo de estos sobrenadantes en un volumen más reducido y concentrado, como el de una placa de 96, favorecería el encuentro entre estas dos poblaciones y mostraría cambios en sus niveles de activación. Por último, la adición de combinaciones de diferentes citocinas también podría tener un efecto sinérgico a la hora de atraer diferentes células al medio. Por ejemplo, se ha descrito que CXCL10 atrae un mayor número de células NK<sup>185</sup>, por lo que podría tener un efecto similar sobre las células iNKT.

## 1.2. Efecto de los glicolípidos en la infección por *Chlamydia trachomatis*

Una vez generado y titulado el stock infeccioso de esta bacteria, tratamos de infectar el tejido con este patógeno. Como ya se ha comentado en el apartado de *Resultados*, aún estamos trabajando en establecer un método eficaz para cuantificar el grado de infección del tejido. Los motivos que pueden estar detrás de estas dificultades son varios y se detallan a continuación.

1. Pese a que ya hemos probado variaciones en cuanto al tiempo de infección o la cantidad de inóculo a añadir, es posible que las condiciones de infección quizá no sean las más adecuadas, ya que existen otras variables tales como el pH, la composición del medio de cultivo (que podría incluir otros factores como el plasma seminal para facilitar la infección<sup>213</sup>) o la agitación del tejido durante el proceso que no hemos explorado tan en detalle. De la misma forma que la espinulación favorece la infección por VIH<sup>214</sup>, es posible que la cepa con la que trabajamos necesite unas condiciones concretas que aún no hemos sido capaces de establecer. En cualquier caso, también es importante tener en cuenta la falta de literatura sobre este modelo, ya que la inmensa mayoría de estudios acerca de la infección por clamidia se han llevado a cabo en líneas celulares o en ratón, y no existen protocolos optimizados para la infección del tejido cervicovaginal humano *ex vivo*.
2. La cepa con la que trabajamos es una cepa “de laboratorio”. Es posible que después de tantos pases en líneas celulares haya perdido parte de su infectividad original, no siendo capaz de infectar el tejido cervicovaginal de forma eficiente. Por ello, una de las estrategias que tenemos en mente para experimentos futuros es generar un nuevo stock infeccioso a partir de un aislado clínico, el cual debería mantener intacta su infectividad.
3. Teniendo en cuenta estas variables, es posible que todos los métodos y estrategias que hemos utilizado hasta ahora para cuantificar la infección no hayan sido exitosos simplemente porque no hay una infección en el tejido. Así, estaríamos ante una situación similar a la del dilema del huevo y la gallina: ¿no somos capaces de detectar infección porque las técnicas utilizadas no son lo suficientemente sensibles, o no detectamos infección porque realmente no la hay, pese a que las técnicas utilizadas son realmente adecuadas para este fin?

Por todo ello, decidimos valorar la capacidad protectora de los glicolípidos frente a *Chlamydia trachomatis* en un modelo *in vitro* relevante como son las células HeLa. Pese a que durante todo el trabajo nos hemos centrado en la secreción de IFN- $\gamma$  como el principal indicador de protección, es posible que existan otros factores que también confieran este efecto protector (por ejemplo, en ratones se ha descrito que la señalización vía IL-17 favorece la inmunización en el tracto genital<sup>80, 82, 83</sup>), por lo que decidimos probar los sobrenadantes de varios de los glicolípidos estudiados, no solo los de los más prometedores. Estos experimentos mostraron que la  $\alpha$ GC sola parece ser el estímulo con mayor capacidad protectora, mientras que la adición de MIP-3- $\beta$  disminuye este papel protector. Así, vemos que ninguno de los compuestos estudiados parece tener un efecto suficiente en la mucosa cervical para proteger frente a este patógeno. Este hecho puede deberse a una secreción insuficiente de IFN- $\gamma$  que se explicaría por el bajo número de las iNKT en las muestras de trabajo lo que, sumado a un *delivery* que podría ser mejorado para llegar a un mayor número de las células implicadas en este proceso, impide ver los resultados esperados. A este respecto, se ha descrito que la administración de células dendríticas pulsadas con  $\alpha$ GC promueve la proliferación de las células iNKT y un aumento en la secreción de IFN- $\gamma$  en pacientes con cáncer<sup>209</sup>, por lo que podría ser una buena estrategia para inducir también un efecto adyuvante. De hecho, en ratones, se ha descrito que la administración de DCs pulsadas con  $\alpha$ GC y antígenos proteicos a ratones induce una inmunización contra dichos antígenos que involucra a las células iNKT<sup>215</sup>.

Se ha descrito ampliamente que la activación de las células iNKT mediante glicolípidos tiene un efecto protector frente a diversas enfermedades como la malaria<sup>216</sup>, la hepatitis B<sup>217</sup> o la tuberculosis<sup>218</sup>. En el caso de clamidia, también se ha descrito la eficacia de esta estrategia para generar una inmunización contra este patógeno en el tracto genital de ratones<sup>31</sup>, por lo que cabe pensar que estos descubrimientos puedan trasladarse a humanos. Pese a que el modelo de explante cervicovaginal aporta información relevante sobre la inmunidad de la mucosa, tiene ciertas limitaciones como son el tamaño del tejido con el que se trabaja (que limita la cantidad de células presentes, lo que en este caso nos afecta especialmente debido a la baja frecuencia de las iNKT) o la falta de irrigación que permita la llegada de otras poblaciones inmunes o la migración a tejido linfóide secundario. Por ello, considero que nuestro modelo es útil y muy relevante para estudiar la infección de la mucosa genital femenina por clamidia, pero debemos mejorar las estrategias de *delivery* para asegurar que los estímulos que añadimos lleguen a las células de interés y que éstas entren en contacto con las diferentes poblaciones que participan en la respuesta inmunitaria.

Además, la utilización de compuestos derivados de la  $\alpha$ GC como adyuvantes permite que los resultados sean comparables entre especies, ya que el CD1d es una molécula altamente conservada en humanos y ratones, a diferencia de los adyuvantes que se han orientado, por ejemplo, a la activación de la vía de los TLR<sup>219</sup>. En este sentido, la gran mayoría de estudios en los que se evalúa la eficacia como adyuvante de otros compuestos análogos a la  $\alpha$ GC utiliza modelos de ratón<sup>169, 220</sup>, por lo que también sería interesante administrar a ratones los candidatos más prometedores de nuestro estudio para ver si, en un modelo *in vivo*, la actividad de estos compuestos se corresponde con los resultados obtenidos en los experimentos con células primarias sanguíneas.

### 1.3. Efecto de los glicolípidos en la infección por VIH

Dadas las limitaciones del modelo de infección con clamidia en el explante cervical, decidimos determinar el valor de la activación de las iNKT en otra de las infecciones de transmisión sexual con mayor tasa de prevalencia mundial: el VIH. En este caso, teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente, solo estudiamos la actividad del HS161 debido a la limitación que supone la disponibilidad de tejido.

De nuevo, en estos experimentos vemos resultados dispares en cuanto a la eficacia de HS161 a la hora de prevenir la infección, por lo que con la *n* del experimento, es difícil extraer conclusiones. Sin embargo, podemos ver que, en algunos casos, la administración del glicolípido antes o durante la infección con el virus muestra un cierto efecto protector, lo que se corresponde con el efecto esperado de una molécula adyuvante. Experimentos en modelos de ratón ya han mostrado la eficacia de la  $\alpha$ GC y derivados para potenciar la inmunogenicidad frente al virus en vacunas de ADN<sup>220, 221</sup>, en ambos casos mediada por CD1d y con participación de las iNKT. Así, estos estudios mostraron un aumento en el número de células CD8<sup>+</sup> y en el título de anticuerpos específicos contra el virus. En nuestro caso, la medida de p24 intracelular es una medida menos exhaustiva para establecer el efecto adyuvante de estas moléculas, por lo que también sería interesante probarlas en un modelo murino para poder llevar a cabo un análisis más completo de su actividad.

## 2. Células T de memoria residentes (T<sub>RM</sub>) en el tejido cervical como reservorios del VIH

En esta segunda parte del trabajo hemos estudiado otra población de células residentes en el tejido cervical más convencionales (células T CD4<sup>+</sup> de memoria residentes), las cuales soportan principalmente la infección viral productiva y persistente (reservorios). Esta población, caracterizada fundamentalmente por la expresión de CD69, se ha descrito en varios tejidos diferentes<sup>51</sup>, y nuestro análisis revela además que, en el tracto genital femenino, está enriquecida en varios marcadores que tradicionalmente se han asociado a una mayor susceptibilidad al VIH, así como en otros marcadores que permiten una larga vida de estas células en el tejido. Teniendo en cuenta que las células T<sub>RM</sub> suponen una alta proporción de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en un gran número de tejidos<sup>49, 51</sup>, estos resultados tienen un gran interés, puesto que ponen de manifiesto la existencia de una subpoblación de linfocitos especialmente susceptible a la infección por VIH y ampliamente distribuida a lo largo del organismo, sobre todo en las mucosas, que son la principal puerta de entrada del virus. De este modo, el análisis exhaustivo de la contribución de esta población al establecimiento de los reservorios virales supone una prioridad.

El fenotipado mediante citometría de flujo ha confirmado que la expresión de CD69 en la mucosa cervical humana se asocia a la expresión de ciertos marcadores que identifican a las *bona fide* T<sub>RM</sub><sup>191, 222</sup>, y lo que es más importante: que, tanto en el ectocérvix como en el endocérvix, esta población expresa una serie de marcadores asociados a una mayor susceptibilidad al VIH<sup>223, 224</sup>. Así, ya se había descrito que las células T CD4<sup>+</sup> del cérvix de mujeres VIH<sup>-</sup> que expresan  $\alpha 4\beta 7$ ,  $\alpha 4\beta 1$  o el propio CD69 son dianas preferentes del virus VIH<sup>223</sup>. Nuestro estudio amplía estos descubrimientos, demostrando que la mayoría de células T CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> pertenecen de hecho a la fracción T<sub>RM</sub> y están enriquecidas tanto en estas integrinas como en correceptores del virus como son CXCR4 y CXCR6<sup>225</sup>.

Nuestro trabajo también demuestra que esta población se infecta de manera preferencial en el modelo *ex vivo* de explante cervicovaginal, ya que estas células presentan mayores cantidades de ADN viral y se encuentran productivamente infectadas en mayor proporción que sus homólogas CD69<sup>-</sup> (no-T<sub>RM</sub>), en consonancia con los descubrimientos de Cavrois y colaboradores, quienes predecían que, en amígdala, las células consideradas precursoras de la infección por VIH tenían niveles de expresión similares a los de las células infectadas<sup>226</sup>. Este modelo de infección *ex vivo* nos ha aportado diversas pruebas que respaldan el importante papel de las células T CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> del tejido cervical en la infección por VIH: la infección preferente de esta población una vez aislada mediante citometría de flujo, el mantenimiento de los niveles de CD69 en la población CD69<sup>-</sup> tras la infección, la dinámica de la expresión de HLA-DR y CD69 a lo largo de la infección, los niveles de infección observados en las células T<sub>RM</sub> CD103<sup>+</sup> y la retención de la infección productiva dentro del tejido incluso tras la incubación del mismo con S1P y CCR7. En conjunto, estas medidas sugieren que las células T<sub>RM</sub> CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> suponen dianas preferentes para el VIH en la mucosa cervical, y potencialmente, en otras mucosas y tejidos linfoides periféricos donde estas células también se localizan<sup>227</sup>.

Por otro lado, el modelo de explante también ha proporcionado resultados interesantes respecto al papel de CD32 en la infección por VIH. Aunque asociado inicialmente a las células latentemente infectadas<sup>228</sup>, este marcador identifica en realidad a las células infectadas transcripcionalmente activas<sup>193, 229</sup>. En nuestros análisis del tejido cervical encontramos que una pequeña fracción de las T<sub>RM</sub> expresaban también este marcador, y que dicha población estaba incluso más enriquecida en gran parte de las moléculas estudiadas en relación a la susceptibilidad al VIH. También observamos una mayor presencia de ADN viral en esta fracción y una mayor expresión de CD32 en las células productivamente infectadas respecto de las T<sub>RM</sub> no infectadas, a la vez que una mayor expresión de HLA-DR, tal y como recientemente se ha publicado<sup>193</sup>. En general, nuestros resultados parecen indicar que la expresión de CD32 por parte de las células T CD4<sup>+</sup> identifica a una población altamente susceptible a la infección por VIH, por lo que sería interesante continuar estudiando esta fracción para conocer en detalle el papel de CD32 en la patogenia del virus y el establecimiento de reservorios.

Cabe destacar que la presencia crónica del VIH en el organismo afecta negativamente a la población de células CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> de la mucosa cervical. El cérvix de pacientes en TAR virológicamente suprimidas presenta menores frecuencias de células CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> del total de linfocitos CD45<sup>+</sup> en comparación con las mujeres no infectadas, mientras que presenta mayores niveles de expresión de HLA-DR.

En ratones, la protección frente al herpesvirus se ha asociado a la presencia de células CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> en el tracto genital<sup>45</sup>, las cuales se localizan en agrupaciones de linfocitos de memoria generadas tras una infección por vía vaginal<sup>45</sup>. Del mismo modo, la presencia de estas agrupaciones también se ha asociado con una protección frente a otros patógenos como clamidia<sup>48</sup>. Recientemente se ha descrito que, en la piel, estas poblaciones de diversas especificidades no desaparecen para albergar a las nuevas células de memoria que se generen, sino que todas ellas cohabitan en este tejido para mantener una vigilancia exhaustiva<sup>230</sup>. Así, las infecciones consecutivas contribuyen a aumentar la cantidad total de células T<sub>RM</sub>. Sin embargo, como hemos visto, estas células son más susceptibles a la infección por VIH, por lo que su acumulación en vías de entrada del virus, como la mucosa cervical, podría facilitar la patogenia del mismo. Así, lo que supone una barrera de protección frente a ciertos patógenos resulta a su vez una puerta de entrada para otros. En este sentido, el análisis de tejido cervical de pacientes VIH<sup>+</sup> virológicamente suprimidas reveló la presencia de agregados de células CD69<sup>+</sup> que podrían corresponderse con estas acumulaciones de T<sub>RM</sub>, las cuales contenían, a su vez, células transcripcionalmente activas pese al tratamiento antirretroviral. De esta forma, las infecciones de transmisión sexual, tanto las ya superadas como las concomitantes, pueden suponer un factor de riesgo que aumente la susceptibilidad al VIH y que incluso favorezca el establecimiento de reservorios virales.

Por último, pero no menos importante, independientemente del tiempo en supresión viral, encontramos una gran cantidad de ADN viral en las T<sub>RM</sub> del tejido cervical de pacientes VIH<sup>+</sup>, con unos valores similares a los descritos en biopsias de íleon<sup>231</sup> y lavados broncoalveolares<sup>232</sup> de pacientes en TAR, y superiores a los valores encontrados en las células sanguíneas de esas mismas pacientes. Se estima que, de todo el ADN viral que se localiza en sangre, entre el 2 y el 10% se encuentra intacto y es capaz de producir virus competentes<sup>181, 233</sup>, por lo que la mayor parte de ese ADN es defectivo. Cuando analizamos el estado del ADN viral en las células CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> cervicales mediante el método IPDA<sup>181</sup> también encontramos material genético intacto (un 33% del total) en una de las dos pacientes analizadas. Cabe destacar que esta técnica requiere un gran número de células iniciales, lo que limita considerablemente el número de muestras válidas para llevarla a cabo, por lo que es necesario analizar un mayor número de pacientes para confirmar que este tejido se encuentra enriquecido en ADN viral intacto con respecto a la sangre. En cualquier caso, estos resultados parecen indicar que el tejido cervicovaginal supone un reservorio de virus intactos y competentes que contribuyen al mantenimiento de la viremia, responsable del estado general de inflamación de las pacientes VIH<sup>+</sup> crónicas.

En conclusión, gracias a este trabajo hemos confirmado la existencia de un reservorio del VIH en el tejido cervical humano, ya que hemos sido capaces de detectar tanto ADN como ARN virales en la mucosa de pacientes VIH<sup>+</sup> con carga viral indetectable durante incluso 10 años. Además, nuestros resultados demuestran que las células T CD4<sup>+</sup> de memoria residentes en el tracto genital femenino (T<sub>RM</sub>) son las que sostienen principalmente dicho reservorio, el cual no había sido estudiado en detalle hasta ahora. Esta población se encuentra enriquecida en ciertos marcadores que aumentan considerablemente su susceptibilidad al VIH, lo que se ha confirmado mediante experimentos de infección *ex vivo*, en los que hemos visto que, en

comparación con sus homólogas CD69<sup>-</sup>, esta fracción presenta mayores tasas de infección productiva. Además, el hecho de que estas células se acumulen en una de las puertas de entrada del virus, como es la mucosa cervical, facilita a su vez la patogenia. Por último, las muestras de pacientes VIH<sup>+</sup> en TAR mostraron que las células CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> son las que presentan mayores cantidades de ADN viral en el tracto genital, lo que las identifica como los principales reservorios virales dentro del compartimento de células T. Su amplia distribución en los tejidos del organismo pone de manifiesto que las futuras terapias dirigidas a erradicar los reservorios virales deben hacer especial hincapié en eliminar el ADN que en ellas se esconde.

En los últimos años, el interés por las células T<sub>RM</sub> en general ha ido en aumento. Trabajos como el de Shin e Iwasaki<sup>35</sup> han demostrado el potencial que tiene esta población en novedosas estrategias de vacunación contra las ITS como la denominada “*prime and pull*”. Brevemente, este método combina la generación de una respuesta sistémica de células T específicas contra el patógeno en cuestión con la atracción, mediante quimiocinas, de esas células a la mucosa genital (la puerta de entrada del microbio), concentrando en dicho tejido una respuesta efectora específica que incluye, sobre todo, células T<sub>RM</sub>. Los experimentos llevados a cabo en ratón por estas dos investigadoras han demostrado que dicha respuesta se mantiene incluso hasta 12 semanas después de la aplicación local de quimiocinas, y resulta altamente eficaz para proteger a los ratones de la infección por el virus del herpes simple tipo 2. Así, esta estrategia podría aplicarse frente a otras ITS virales como el VIH, por lo que todo el conocimiento generado acerca de esta población será de gran utilidad en el futuro.





## **Conclusiones**



1. El tejido cervical alberga gran variedad de poblaciones inmunitarias en la mucosa. Entre ellas se encuentran las células de memoria residente ( $T_{RM}$ , las mayoritarias) y diversas células T no convencionales en menor frecuencia, incluyendo las células T *natural killer* invariantes (iNKT).
2. La distribución de las diversas poblaciones inmunitarias de células T analizadas no presenta diferencias significativas entre el ectocérvix y el endocérvix.
3. La población de células T  $CD4^+ CD69^+$  con fenotipo de células de memoria residente ( $T_{RM}$ ) está enriquecida en proteínas de superficie asociadas a longevidad y a una mayor susceptibilidad a la infección por VIH.
4. El modelo de explante cervicovaginal es un modelo válido para el estudio de la respuesta inmunitaria frente a diferentes estímulos en esta mucosa.
5. El modelo de infección *ex vivo* por *Chlamydia trachomatis* del explante cervical ha resultado ser un modelo dificultoso, ya sea bien por una baja susceptibilidad a la infección, o bien por las técnicas de detección. Este modelo requiere de más estudios para su optimización.
6. El modelo de infección *ex vivo* por VIH del explante cervical permite analizar los efectos de dicha infección sobre la inmunidad de la mucosa cervicovaginal, así como la susceptibilidad de los diferentes tipos celulares residentes.
7. La activación de las células iNKT de esta mucosa vía glicolípidos no parece tener un gran efecto protector frente a la infección por *Chlamydia trachomatis*, aunque sí tiene cierto efecto adyuvante.
8. La activación de las células iNKT vía HS161 o  $\alpha$ GC podría limitar la infección por VIH en la mucosa si se administran antes o durante la infección por el virus. Su valor como adyuvante en una estrategia profiláctica frente al VIH debería ser evaluado en detalle en estudios futuros.

9. *Ex vivo*, las células T<sub>RM</sub> se infectan de forma preferente por el VIH, por lo que podrían albergar los primeros reservorios.
  
10. En pacientes VIH<sup>+</sup>, esta población supone un reservorio del VIH en la mucosa genital femenina y alberga una mayor cantidad de material genético del virus que las células sanguíneas, el cual en algún caso incluye genomas intactos en gran proporción.
  
11. Pese al tratamiento antirretroviral, es posible detectar ARN vírico en el cérvix de pacientes VIH<sup>+</sup> con carga viral indetectable durante varios años. Estas pacientes arrastran otros signos del efecto de la infección crónica en este compartimento: disminución de la frecuencia de CD4<sup>+</sup> T<sub>RM</sub> e incremento generalizado de la activación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> en cérvix. Dicho ARN se localiza, en algunos casos, en regiones enriquecidas en la expresión de CD69 que incluyen el epitelio.





## **Anexos**

**Tabla anexa 1: Datos clínicos de las pacientes VIH+ incluidas en este estudio**

#Paciente	Análisis	Edad (años)	Años desde el diagnóstico del VIH	Carga viral (copias/ml)	Recuento de CD4 (células/ $\mu$ l)	Años en supresión viral (TAR)	Régimen de TAR
M01	Flow	51	3,41	<50	420	3	3TC+ABC+DTG
M02	ADN/Flow	52	27	<50	940	13,58	3TC+ABC+RAL
M03	ADN/Flow	54	16,58	<50	1260	16	TAF+FTC+EVG/c
M04	ADN/Flow	26	4	<50	520	3,67	3TC+ABC+DTG
M05	ADN/Flow	57	27	<50	1400	15,33	TDF+FTC+EVF
M11	Flow	44	13,16	<50	440	11,66	3TC+DRV/c
M15	Flow	48	29,50	<50	380	16,50	3TC+ABC+DTG
M16	Flow	49	30,50	<50	490	2,64	DRV/c+DTG
M17	Flow	47	26,58	<50	820	20,67	3TC+ABC+DTG
M18	Flow	63	19,54	<50	160	18,45	3TC+DTG
M19 <sup>A</sup>	Flow	51	31,50	<50	200	6,82	DRV/c+DTG
M20 <sup>A</sup>	ADN/Flow	53	29	<50	1257	1,46	ATV/r+3TC+ddI
M21	Flow	49	22,79	<50	850	14,66	3TC+ABC+NVP
M22	ADN/Flow	48	26,50	<50	850	2,55	3TC+ABC+DTG
M23 <sup>A</sup>	ADN/Flow	46	23,46	<50	2850	2,09	3TC+DTG
M25	ADN/Flow	48	17,62	<50	1040	13,87	EVG/c+FTC+TAF
M26	Flow	44	26	<50	511	>15	3TC+ABC+DTG
M27 <sup>A</sup>	Flow	54	34,39	<50	1380	0,71	DRV/c+RPV
M28	ADN	54	20	<50	750	4,5	3TC+ABC+DTG
M30	IPDA	46	24	<50	3070	>10	3TC+DTG
M33	IPDA	39	15	<50	440	10	TDF+FTC+NVP
P1	ARN	34	9,5	5100-10400	760	-	UNTREATED
P2	ARN	30	3,42	<50	380	3,16	3TC+ABC+DRV+RTV
P3	ARN	49	4,25	<50	910	4	3TC+ABC+DTG
P4	ARN	49	0,5	<50	280-350	0,25	TAF+FTC+EVG/c
P5 <sup>A</sup>	ARN	47	24,16	<25	811	4	EFV+FTC+TDF
P6	ARN	51	11,25	<25	215	2	EFV+FTC+TDF+EFV
P7	ARN	46	20,16	<25	828	5,5	DRV

<sup>A</sup> Todas las infecciones fueron diagnosticadas como transmisión heterosexual del VIH-1 excepto M19, M20, M23, M27 y P5, quienes eran usuarias de drogas de administración intravenosa. TDF, tenofovir disoproxil fumarato; FTC, emtricitabina; ETR, etravirina; 3TC, lamivudina; ABC, abacavir; DTG, dolutegravir; RAL, raltegravir; TAF, tenofovir alafenamida fumarato; EVG/c,

elvitegravir potenciado con cobicistato; EVF, efavirenz; NVP, nevirapina; DRV/c, darunavir potenciado con cobicistato; DRV, darunavir; RTV, ritonavir; RPV, rilpivirina; ATV, atazanavir; ddl, didanosina.

**Tabla anexa 2: Anticuerpos utilizados**

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Casa comercial
<b>Pruebas supervivencia</b>			
CD3	PerCP	SK7	BD Biosciences
CD45	Alexa Fluor 700	HI30	BioLegend
<b>Fenotipo basal</b>			
CD11c	PE-Cy7	B-ly6	BD Biosciences
CD14	V450	MØP9	BD Biosciences
CD16	BV786	3G8	BD Biosciences
CD1d	PE	CD1d42	BD Biosciences
CD3	eVolve 655	OKT3	eBioscience
CD45	Alexa Fluor 700	HI30	BioLegend
HLA-DR	PerCP-Cy5.5	G46-6	BD Biosciences
Va24-Ja18	APC	6B11	BioLegend
TCRgd	FiTC	11F2	Miltenyi Biotec
TCR-Va7.2	APC-Vio770	REA179	Miltenyi Biotec
<b>Aislamiento de iNKTs</b>			
CD3	eVolve 655	OKT3	eBioscience
Va24-Ja18	APC	6B11	BioLegend
<b>Fenotipo adyuvante</b>			
CD11c	PE-Cy7	B-ly6	BD Biosciences
CD14	V450	MØP9	BD Biosciences
CD16	BV786	3G8	BD Biosciences
CD161	VioBright FITC	REA631	Miltenyi Biotec
CD1d	PE	CD1d42	BD Biosciences
CD3	SuperBright 645 / eVolve 655	OKT3	Invitrogen / eBioscience
CD40	APC-Cy7	5C3	BioLegend
CD45	Alexa Fluor 700	HI30	BioLegend
CD69	PE-CF594	FN50	BD Biosciences
HLA-DR	PerCP-Cy5.5	G46-6	BD Biosciences
Va24-Ja18	APC	6B11	BioLegend
<b>Tinción intracelular de citocinas</b>			
CD16	BV786	3G8	BD Biosciences
CD3	PerCP	UCHT-1	ImmunoTools
CD45	BV605	HI30	BD Biosciences
IFN- $\gamma$	Alexa Fluor 700	B27	Invitrogen
IL-10	PE	JES3-19F1	BD Biosciences
IL-17	AF488	N49-653	BD Biosciences
IL-4	PE-Cy7	8D4-8	eBioscience
Va24-Ja18	APC	6B11	BioLegend

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Casa comercial
<b>Infección ex vivo del tejido (VIH)</b>			
CD103	FITC	BER-ACT8	BioLegend
CD14	APC-H7	MφP9	BD Biosciences
CD19	V500	HIB19	BD Biosciences
CD3	PerCP	SK7	BD Biosciences
CD32	PE-Cy7	FUN-2	BioLegend
CD4	BV605	RPA-T4	BD Biosciences
CD45	Alexa Fluor 700	HI30	BioLegend
CD69	PE-CF594	FN50	BD Biosciences
CD8	APC	RPA-T8	BD Biosciences
HLA-DR	BV421	G46-6	BD Biosciences
p24	PE	FH190-1-1	Beckman Coulter
<b>Infección de tejido con <i>Chlamydia trachomatis</i></b>			
CD45	Alexa Fluor 700	HI30	BioLegend
Clamidia (MOMP) CT602	-	MAb6ciii	Chlamydia biobank
HLA-DR	BV421	G46-6	BD Biosciences
<b>Efecto de los glicolípidos en la infección por VIH</b>			
CD3	PerCP	SK7	BD Biosciences
CD45	FiTC	HI30	BioLegend
CD8	APC	RPA-T8	BD Biosciences
p24	PE	FH190-1-1	Beckman Coulter
<b>Fenotipado inicial de las células T<sub>RM</sub></b>			
CD195/CCR5	APC-Cy7	2D7	BD Biosciences
CD103	FITC	BER-ACT8	BioLegend
CD19	V500	HIB19	BD Biosciences
CD3	PerCP	SK7	BD Biosciences
CD4	BV605	RPA-T4	BD Biosciences
CD45	Alexa Fluor 700	HI30	BioLegend
CD49a (α1)	PE	TS2/7	BioLegend
CD69	PE-CF594	FN50	BD Biosciences
Hobit	AF647	Sanquin-Hobit/1	BD Biosciences
T-bet	BV421	4B10	BioLegend
Eomes	PE-Cy7	WD1928	Thermo Fisher Scientific
CD363/S1PR1	eFluor 660	SW4GYPP	Thermo Fisher Scientific

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Casa comercial
<b>Fenotipo detallado de las T<sub>RM</sub> (panel general)</b>			
CD195/CCR5	APC-Cy7	2D7	BD Biosciences
CD14	V450	MØP9	BD Biosciences
CD163	BV786	GHI/61	BD Biosciences
CD19	V500	HIB19	BD Biosciences
CD3	SuperBright 645	OKT3	Invitrogen
CD3	eVolve 655	OKT3	eBioscience
CD32	PE-Cy7	FUN-2	BioLegend
CD4	BV605	RPA-T4	BD Biosciences
CD45	Alexa Fluor 700	HI30	BioLegend
CD69	PE-CF594	FN50	BD Biosciences
HLA-DR	PerCP-Cy5.5	G46-6	BD Biosciences
<b>Panel específico 1</b>			
CCR7	PE	3D12	BD Biosciences
CD103	FITC	BER-ACT8	BioLegend
CXCR6	APC	56811	R&D Systems
<b>Panel específico 2</b>			
β7	APC	FIB504	BD Biosciences
CD49a (α1)	PE	TS2/7	BioLegend
CD49d (α4)	FITC	9F10	BD Biosciences
<b>Panel específico 3</b>			
CCR2	PE	48607	R&D Systems
CD184	APC	12G5	BD Biosciences
CXCR3	FITC	G025H7	BioLegend
<b>Panel específico 4</b>			
CD122	APC	TU27	BioLegend
CD127 (IL-7Ra)	FITC	A019D5	BioLegend
CD132	PE	VI C-89	BioLegend
<b>Migración de células infectadas por VIH (transwell)</b>			
CD103	FITC	BER-ACT8	BioLegend
CD127 (IL-7Ra)	BV605	A019D5	BioLegend
CD19	V500	HIB19	BD Biosciences
CD3	PerCP	SK7	BD Biosciences
CD32	PE-Cy7	FUN-2	BioLegend
CD49a (α1)	APC-Vio770	REA1106	Miltenyi
CD45	Alexa Fluor 700	HI30	BioLegend
CD69	PE-CF594	FN50	BD Biosciences
CD8	APC	RPA-T8	BD Biosciences
HLA-DR	BV421	G46-6	BD Biosciences
p24	PE	FH190-1-1	Beckman Coulter

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Casa comercial
<b>Marcaje de pacientes VIH<sup>+</sup></b>			
CD103	FITC	BER-ACT8	BioLegend
CD14	APC-H7	MφP9	BD Biosciences
CD19	V500	HIB19	BD Biosciences
CD3	PerCP	SK7	BD Biosciences
CD32	PE-Cy7	FUN-2	BioLegend
CD4	BV605	RPA-T4	BD Biosciences
CD45	Alexa Fluor 700	HI30	BioLegend
CD69	PE-CF594	FN50	BD Biosciences
CD8	APC	RPA-T8	BD Biosciences
HLA-DR	BV421	G46-6	BD Biosciences

Antígeno	Fluorocromo	Clon, especie	Casa comercial	Dilución
LPS Chlamydia	FiTC	Policlonal, goat	Merck Millipore	1/200
Clamidia (MOMP) CT602	-	MAb6ciii, mouse	Chlamydia biobank	1/1000
Donkey anti mouse IgG (H+L)	Alexa Fluor 647		Jackson ImmunoResearch	1/1000

**Tabla anexa 3: Número de células recuperadas en los experimentos de *sorting***

#Paciente	T <sub>RM</sub> cervicales	No-T <sub>RM</sub> cervicales	Células T sanguíneas CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>-</sup> CD103 <sup>-</sup>	Células T sanguíneas CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	Células T sanguíneas CD4 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup>	Células T sanguíneas CD4 <sup>+</sup> CD32 <sup>+</sup>
M02	1816	218	508 573	8731	2588	8644
M03	532	85	500 000	6894	3700	7055
M04	556	618	500 000	75 102	25 736	81 149
M05	2110	777	500 000	75 514	25 537	171 805
M20	7928	4243	500 000	57 893	7289	2250
M22	4867	804	500 000	62,340	6873	8184
M23	3362	1605	500 000	51 051	19 058	10 513
M25	3664	492	500 000	170 765	22 306	23 033
M28	21 917	5244	500 000	26 271	7828	18 883
M30	40 303	5893	ND	ND	ND	ND
M33	7900	820	ND	ND	ND	ND

ND: no disponible





## **Agradecimientos**



Uf, creo que esta es la parte que más tiempo me va a llevar. Solo espero que nadie se me ofenda si no le menciono aquí... ni si le menciono en una posición que no le guste xD.

En primer lugar, indudablemente, quiero agradecer a Txell el haberme brindado esta oportunidad, el haber confiado en mí, el haber peleado por conseguir que este trabajo pudiera llevarse a cabo y que este doctorado pudiera ser una realidad, con o sin beca. Aunque es inevitable tener nuestros más y nuestros menos, fuiste la primera “persona adulta” que se preocupó por mí cuando vine a Barcelona: que si estaba a gusto en el trabajo, que si la convivencia iba bien en el piso, que si estaba aprovechando el máster, que si seguía viendo a ese arquitecto... Son tonterías a las que quizá no les dabas mucha importancia y simplemente eran parte de esa cotilla innata que llevas dentro, pero me gustaba sentir que mi jefa se interesaba por mí más allá de lo académico, y por eso siempre te he considerado un poco como mi “*ama* en Barcelona”. Espero que eso no te haga sentir más mayor (:P). De verdad, de corazón, muchísimas gracias por haber apostado por mí y por ser tan humana y cercana.

En segundo lugar, a mi gran pilar en Barcelona. Tampoco me quiero poner muy moñas porque esto lo va a leer mucha gente (espero) y tengo una imagen de tipo frío y distante que mantener, pero no hay palabras en castellano, euskera o catalán para agradecerte estos ~~cuatro~~ cinco años a mi lado. Por haberme aguantado cuando ni yo mismo me aguanto, por haberme subido otra vez el ánimo con cada beca fallida, por haberme sacado una sonrisa al llegar a casa después de cada día de trabajo eterno, por haberme escuchado cada vez que he necesitado desahogarme, por todas esas sorpresas que me has preparado y que tan poco te gusta recibir a ti, por haberme ayudado a tener una vida más allá del trabajo en esta ciudad tan difícil, por tantas y tantas razones con las que podría escribir otra tesis entera... GRACIAS. *Ilargiraino ta buelta.*

En tercer lugar, a mis aitas, porque sin vuestra ayuda, esta tesis no habría podido ni siquiera empezar. Si no me hubierais apoyado en mi decisión de venirme a Barcelona, con el esfuerzo económico, pero sobre todo emocional, que eso suponía para vosotros, no estaría donde estoy ahora. Sé que no os llamo tanto como os gustaría y que me veis mucho menos de lo que quisierais, pero podéis estar seguros de que no hay día que no piense en vosotros y os agradezca todo lo que habéis hecho por mí en estos 27 años y seguiréis haciendo. Espero seguir siendo ese hijo que tanto os hace presumir ante el resto de la familia, los amigos, los conocidos y los no tan conocidos. Os quiero con locura.

En cuarto lugar, al grupo. A María José, por habernos dado la oportunidad de incorporarnos al equipo para aportar todo lo que sabemos y darnos siempre otro punto de vista. A Vicenç, por habernos ayudado en todo lo que ha estado en su mano e integrarnos dentro del grupo de VIH de Vall d’Hebron. Pero sobre todo, a mis básicos. Por haberme enseñado lo que es tener un grupo de investigación más allá de tu jefa, por todas esas comidas de confidencias, por haber sido el lugar seguro donde ~~despotricar de las jef~~ desahogarnos en los malos momentos y sentir que ya no estaba solo, por toda la ayuda desinteresada en experimentos ajenos, por los congresos, por los días interminables en cultivos, por simplemente estar ahí. A Carla, por compartir tu experiencia, orientarme y aconsejarme en todo lo posible (;dale duro a esta nueva etapa!); a Núria, por tu alegría y tu paciencia a la hora de aprender de un

desastre como yo (estoy convencido de que vas a ser el mejor relevo que MIM podía tener :D); a Antonio, el *real fooder influencer*, por esos “momentos de chicos” que hemos tenido (las habitaciones compartidas, los ratos de gimnasio, los congresos románticos... De aquí a un par de años, ¡te quiero de portada del Men’s Health!); a Laura, por estar siempre disponible y ofrecerte a ayudar en todo lo imaginable, desde darle al palito hasta ir a buscar tejido (;necesitaría una página entera para agradecerte todo lo que me has ayudado!); a Judith, aka la Yudy, por haberme hecho sentir en casa desde el principio, por haberte leído no solo esta última parte, por todos los consejos, recomendaciones, sugerencias, desahogos y ayudas (y lo más importante, por los momentos fuera del laboratorio). A Maite, porque después de tantas horas de despacho compartido ya eres casi una más del grupo: muchas gracias por tu cercanía y por ser siempre tan atenta (;y por compartir todos esos cotilleos que te llegan! :P). Y tampoco quiero olvidarme de todos los estudiantes que han pasado por aquí: Albert, Miquel, Vicent, Daniela, Jenny y Óscar. De todos ellos he aprendido algo valioso.

En quinto lugar, a la familia de Barcelona. Sois tantos que no sé muy bien por dónde empezar.

A las pavas unidas, porque con vosotras empezó toda esta locura: Martita, la Mari colegueta, Nomei, la Yudy, Arny (estés donde estés cuando leas esto). Fuisteis los primeros amigos de verdad que hice en Barcelona, y gracias a vosotras pude soportar los días de prácticas y clases de máster infinitos, aún no sé cómo conseguimos sobrevivir a ese año. Estoy muy, muy agradecido de haberos encontrado, de todos esos ratos que hemos pasado juntos, de las partidas del Lobo, del Carnaval de Venecia, de los findes en Tárrega/Tarragona, en Montblanc, en Cabacés, en el pueblo de la Mari, de las inauguraciones de pisos, de los reencuentros en los que parece que nos hayamos visto el día anterior, de los planes *#improvisados*, de todas nuestras tonterías y bromas internas, de las fotos en la cámara trasera de un coche y de mil y una chorradas más que ya ni recuerdo. Suerte que siempre nos quedará Instagram y volver a leer todos los *hashtags* estúpidos para hacer memoria.

A mis secreteras, porque ya es como si os conociera de toda la vida. Gracias por todo vuestro interés en “mis chochos”, por todas las veces que habéis confundido clamidia con cándida, por todas las sonrisas que me habéis sacado, por las confesiones que hemos compartido, por los viajes de verano planificados en enero, por todo el chocolate que hemos comido juntos, gracias por esas cenas en p89, por esos viajes a Fallas, por toda la mierda que compartimos en guachap, por haberme hecho sentir en tan poco tiempo que tenemos algo tan especial y, en definitiva, por ser como sois.

A Bri, por la ayuda durante los primeros meses de adaptación a Barcelona pese a cómo nos conocimos. Nunca olvidaré ese primer viaje a Ikea en coche que me salvó la vida. Jamás pensé que llegaríamos juntos hasta aquí, pero sé que después de esto podemos llegar a donde sea. Me alegro muchísimo de tenerte en mi vida (;Gracias, Mikel! xD).

A mi *latin baby*, por haberme dejado conocer a María y a Isabel, aunque todavía no sepa a quién de las dos quiero más. Pero lo que sí sé es que siempre las voy a querer. ¡Por muchos años más de borracheras con tequila y temporadas de Paquita!

A las hienas, aunque pensé que jamás diría esto, pero en el fondo os hacéis querer. Gracias por esas tardes-noches de Champanillo y fritangas, por esas noches que nunca sabes dónde ni cómo van a acabar, por haberme dejado formar parte de vuestra manada, aunque sea una parte pequeñita, por haberos abierto contra todo pronóstico y dejarme cumplir mi sueño de tener un grupo de amigos mariquitas. Gracias.

A Kike, por haberte sumado siempre a todos los planes habidos y por haber, por tus meteduras de pata sociales, por tu buen humor permanente, por tu hospitalidad en Tokyo. Gracias por haber aparecido.

A Gonsi, porque aunque al principio no te quería, me alegraste cada uno de los días de convivencia que compartimos. Y me sigues alegrando cada vez que nos vemos. Porque nadie sabe valorar como tú la mierda que encuentro en tuitar, por haberme abierto la mente, por continuar con tus estudios a pesar de la fama. No dejes que te quiten nunca esa alegría (y deja ya de reírte por lo de iCarly, que te puedo imaginar jajaja).

A María, por mostrar siempre tanto interés por mí aunque no nos veamos muy a menudo.

A todas las chicas del IGTP: Noemí, Sara, Laura, Marina, Lucía, Eva, Gisela, Alfonsina, Marian, Anna, Marta, Silvia, Raquel, Maribel, Emi... Sin vuestra compañía y vuestros consejos no sé si habría aguantado durante esos tres años en medio de la montaña. A Dani, por compartir penurias y poyata; a Marco, por sus sabios consejos.

Y por último, a toda mi otra familia que me ha acompañado desde la distancia en este largo camino, la de Bilbao.

A Sonia, Ohiane, Coust, Jon, Duque, Laurel, Noe... Porque ya son tantos años juntos que no sé qué haría sin vosotras. Mil gracias por cada abrazo cuando he ido a Bilbao, por vuestras visitas aquí, por hacerme sentir como si nunca me hubiera ido de allí, y al mismo tiempo darme un montón de ganas de volver con cada finde que pasamos juntos. Ohana sigue viva.

A Rafa, por compartir penurias en este aparentemente eterno viaje que es la tesis doctoral. Por ser mi fuente inagotable de memes y conocimientos del mundo virtual, por esas referencias que nadie más entiende, por las visitas, por las fiestas en tu casa, por todas las carcajadas que me has sacado desde que te conozco y que me seguirás sacando durante mucho, mucho tiempo. Gracias.

A los cestarios, porque ninguno queríamos empezar una tesis y cinco años después prácticamente todos estamos metidos en este embolado. Gracias por esas comidas navideñas y quedadas veraniegas en las que ponernos al día y darnos ánimos mutuamente. Que la sabiduría de Goñi os ilumine.

A Lauri, porque estás loca del coño y eso te hace ser tan especial. Ya sabes que aunque sea un borde de mierda, tienes un hueco reservado en mi corazoncito.

A Nerea, porque no podría tener una prima mejor. No hay más que decir.

A Sty, Ángel y Andoni, por mantener viva la tradición de los viernes cualquier día de la semana. Siempre os tengo presentes.

A mis chicas del pueblo, a mis monitores, a Argia y Ainhoa y a todos los que cada vez que vuelvo me preguntan que qué tal llevo la tesis y que a ver cuándo vuelvo. Muchas gracias a todos y cada uno de vosotros.

A toda mi familia de sangre: tíos, tías, aitites, amamas, primo y prima, infinitas gracias por quererme tal y como soy y por haberme ayudado a llegar a donde estoy ahora.

Y, finalmente (ahora sí que sí), a mi yo del pasado. Por haber tenido los huevos de venirse a Barcelona. Por haber elegido el máster más duro que encontré. Por no haber tirado la toalla cada vez que le rechazaban en una beca. Por haber seguido intentándolo con cada experimento que salía mal. Por haber luchado a pesar de todo. Y porque sí, qué coño.





## **Bibliografía**

1. Trifonova RT, Lieberman J, van Baarle D. Distribution of immune cells in the human cervix and implications for HIV transmission. *American journal of reproductive immunology*. 2014;71(3):252-64.
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
3. Reis Machado J, da Silva MV, Cavellani CL, dos Reis MA, Monteiro ML, Teixeira Vde P, et al. Mucosal immunity in the female genital tract, HIV/AIDS. *BioMed research international*. 2014;2014:350195.
4. Rodriguez-Garcia M, Patel MV, Wira CR. Innate and adaptive anti-HIV immune responses in the female reproductive tract. *Journal of reproductive immunology*. 2013;97(1):74-84.
5. Amjadi F, Salehi E, Mehdizadeh M, Aflatoonian R. Role of the innate immunity in female reproductive tract. *Advanced biomedical research*. 2014;3:1.
6. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current opinion in immunology*. 1997;9(1):10-6.
7. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002;20:197-216.
8. Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Seminars in immunology*. 2009;21(5):265-72.
9. Plaks V, Birnberg T, Berkutzi T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(12):3954-65.
10. Nguyen PV, Kafka JK, Ferreira VH, Roth K, Kaushic C. Innate and adaptive immune responses in male and female reproductive tracts in homeostasis and following HIV infection. *Cellular & molecular immunology*. 2014;11(5):410-27.
11. Duluc D, Gannevat J, Anguiano E, Zurawski S, Carley M, Boreham M, et al. Functional diversity of human vaginal APC subsets in directing T-cell responses. *Mucosal immunology*. 2013;6(3):626-38.
12. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunological reviews*. 2005;206:306-35.
13. Wu R, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. Macrophage contributions to ovarian function. *Human reproduction update*. 2004;10(2):119-33.
14. Fuchs A, Colonna M. Natural killer (NK) and NK-like cells at mucosal epithelia: Mediators of anti-microbial defense and maintenance of tissue integrity. *European journal of microbiology & immunology*. 2011;1(4):257-66.
15. Mselle TF, Meadows SK, Eriksson M, Smith JM, Shen L, Wira CR, et al. Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract. *Clinical immunology*. 2007;124(1):69-76.

16. King A, Balendran N, Wooding P, Carter NP, Loke YW. CD3- leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56++ population. *Developmental immunology*. 1991;1(3):169-90.
17. Ivanova D, Krempels R, Ryfe J, Weitzman K, Stephenson D, Gigley JP. NK cells in mucosal defense against infection. *BioMed research international*. 2014;2014:413982.
18. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *Journal of reproductive immunology*. 2011;88(2):185-94.
19. Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity*. 2009;31(2):184-96.
20. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(3):233-42.
21. Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(5):336-45.
22. Strbo N, Alcaide ML, Romero L, Bolivar H, Jones D, Podack ER, et al. Loss of Intra-Epithelial Endocervical Gamma Delta (GD) 1 T Cells in HIV-Infected Women. *American journal of reproductive immunology*. 2016;75(2):134-45.
23. Alcaide ML, Strbo N, Romero L, Jones DL, Rodriguez VJ, Arheart K, et al. Bacterial Vaginosis Is Associated with Loss of Gamma Delta T Cells in the Female Reproductive Tract in Women in the Miami Women Interagency HIV Study (WIHS): A Cross Sectional Study. *PloS one*. 2016;11(4):e0153045.
24. Gibbs A, Leeansyah E, Introini A, Paquin-Proulx D, Hasselrot K, Andersson E, et al. MAIT cells reside in the female genital mucosa and are biased towards IL-17 and IL-22 production in response to bacterial stimulation. *Mucosal immunology*. 2017;10(1):35-45.
25. Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*. 2012;491(7426):717-23.
26. Le Bourhis L, Martin E, Peguillet I, Guihot A, Froux N, Core M, et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol*. 2010;11(8):701-8.
27. Sobkowiak MJ, Davanian H, Heymann R, Gibbs A, Emgard J, Dias J, et al. Tissue-resident MAIT cell populations in human oral mucosa exhibit an activated profile and produce IL-17. *European journal of immunology*. 2019;49(1):133-43.
28. Middendorp S, Nieuwenhuis EE. NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal immunology*. 2009;2(5):393-402.
29. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(2):101-17.
30. Lindqvist M, Persson J, Thorn K, Harandi AM. The mucosal adjuvant effect of alpha-galactosylceramide for induction of protective immunity to sexually transmitted viral infection. *Journal of immunology*. 2009;182(10):6435-43.

31. Wang H, Zhao L, Peng Y, Liu J, Qi M, Chen Q, et al. Protective role of alpha-galactosylceramide-stimulated natural killer T cells in genital tract infection with *Chlamydia muridarum*. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2012;65(1):43-54.
32. Piccinni MP. T cell tolerance towards the fetal allograft. *Journal of reproductive immunology*. 2010;85(1):71-5.
33. Hu T, Yang P, Zhu H, Chen X, Xie X, Yang M, et al. Accumulation of invariant NKT cells with increased IFN-gamma production in persistent high-risk HPV-infected high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Diagnostic pathology*. 2015;10:20.
34. Johansson M, Lycke NY. Immunology of the human genital tract. *Current opinion in infectious diseases*. 2003;16(1):43-9.
35. Shin H, Iwasaki A. A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature*. 2012;491(7424):463-7.
36. Russell MW, Mestecky J. Humoral immune responses to microbial infections in the genital tract. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2002;4(6):667-77.
37. Shrier LA, Bowman FP, Lin M, Crowley-Nowick PA. Mucosal immunity of the adolescent female genital tract. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine*. 2003;32(3):183-6.
38. Kutteh WH, Moldoveanu Z, Mestecky J. Mucosal immunity in the female reproductive tract: correlation of immunoglobulins, cytokines, and reproductive hormones in human cervical mucus around the time of ovulation. *AIDS research and human retroviruses*. 1998;14 Suppl 1:S51-5.
39. Givan AL, White HD, Stern JE, Colby E, Gosselin EJ, Guyre PM, et al. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *American journal of reproductive immunology*. 1997;38(5):350-9.
40. Kamat BR, Isaacson PG. The immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *The American journal of pathology*. 1987;127(1):66-73.
41. Johansson EL, Rudin A, Wassen L, Holmgren J. Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina. *Immunology*. 1999;96(2):272-7.
42. Yeaman GR, Collins JE, Fanger MW, Wira CR, Lydyard PM. CD8+ T cells in human uterine endometrial lymphoid aggregates: evidence for accumulation of cells by trafficking. *Immunology*. 2001;102(4):434-40.
43. Yeaman GR, Guyre PM, Fanger MW, Collins JE, White HD, Rathbun W, et al. Unique CD8+ T cell-rich lymphoid aggregates in human uterine endometrium. *Journal of leukocyte biology*. 1997;61(4):427-35.
44. White HD, Crassi KM, Givan AL, Stern JE, Gonzalez JL, Memoli VA, et al. CD3+ CD8+ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. *J Immunol*. 1997;158(6):3017-27.
45. Iijima N, Iwasaki A. T cell memory. A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. *Science*. 2014;346(6205):93-8.

46. Johnson RM, Brunham RC. Tissue-Resident T Cells as the Central Paradigm of Chlamydia Immunity. *Infection and immunity*. 2016;84(4):868-73.
47. Saba E, Grivel JC, Vanpouille C, Brichacek B, Fitzgerald W, Margolis L, et al. HIV-1 sexual transmission: early events of HIV-1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized ex vivo model. *Mucosal immunology*. 2010;3(3):280-90.
48. Turner DL, Farber DL. Mucosal resident memory CD4 T cells in protection and immunopathology. *Frontiers in immunology*. 2014;5:331.
49. Wong MT, Ong DE, Lim FS, Teng KW, McGovern N, Narayanan S, et al. A High-Dimensional Atlas of Human T Cell Diversity Reveals Tissue-Specific Trafficking and Cytokine Signatures. *Immunity*. 2016;45(2):442-56.
50. Cauley LS, Lefrancois L. Guarding the perimeter: protection of the mucosa by tissue-resident memory T cells. *Mucosal immunology*. 2013;6(1):14-23.
51. Kumar BV, Ma W, Miron M, Granot T, Guyer RS, Carpenter DJ, et al. Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell reports*. 2017;20(12):2921-34.
52. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2014. Disponible en: <http://www.cdc.gov/std/stats14/surv-2014-print.pdf>2015 [Visitado el 02/01/2019].
53. Amin A GMC. Addressing gender-based violence to reduce risk of STI and HIV. *Sex Transm Infect* 2013; 89: A8 [Visitado el 08/01/2019]. Available from: [http://sti.bmj.com/content/sextrans/89/Suppl\\_1/A8.2.full.pdf](http://sti.bmj.com/content/sextrans/89/Suppl_1/A8.2.full.pdf).
54. Pearson WS, Peterman TA, Gift TL. An increase in sexually transmitted infections seen in US emergency departments. *Preventive medicine*. 2017;100:143-4.
55. Koedijk FD, van Benthem BH, Vrolings EM, Zuilhof W, van der Sande MA. Increasing sexually transmitted infection rates in young men having sex with men in the Netherlands, 2006-2012. *Emerging themes in epidemiology*. 2014;11:12.
56. Abara WE, Hess KL, Neblett Fanfair R, Bernstein KT, Paz-Bailey G. Syphilis Trends among Men Who Have Sex with Men in the United States and Western Europe: A Systematic Review of Trend Studies Published between 2004 and 2015. *PloS one*. 2016;11(7):e0159309.
57. Ramchandani MS, Golden MR. Confronting Rising STIs in the Era of PrEP and Treatment as Prevention. *Current HIV/AIDS reports*. 2019;16(3):244-56.
58. Soriano V, Romero JD. Rebound in Sexually Transmitted Infections Following the Success of Antiretrovirals for HIV/AIDS. *AIDS reviews*. 2018;20(4):187-204.
59. Saba E, Origoni M, Taccagni G, Ferrari D, Doglioni C, Nava A, et al. Productive HIV-1 infection of human cervical tissue ex vivo is associated with the secretory phase of the menstrual cycle. *Mucosal immunology*. 2013;6(6):1081-90.
60. Allers K, Hutter G, Hofmann J, Loddenkemper C, Rieger K, Thiel E, et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(10):2791-9.

61. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppia D, Salgado M, et al. HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*. 2019.
62. UNAIDS. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Progress Report Summary 2018: Global HIV/AIDS update. 2018;Geneva((Switzerland)).
63. Ward V. Chlamydia. Disponible en: <http://www.austincc.edu/microbio/2704u/ct> [Visitado el 28/03/2019].
64. Budai I. Chlamydia trachomatis: milestones in clinical and microbiological diagnostics in the last hundred years: a review. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 2007;54(1):5-22.
65. O'Connell CM, Ferone ME. Chlamydia trachomatis Genital Infections. *Microbial cell*. 2016;3(9):390-403.
66. Workowski KA, Bolan GA, Centers for Disease C, Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports*. 2015;64(RR-03):1-137.
67. Buckner LR, Amedee AM, Albritton HL, Kozlowski PA, Lacour N, McGowin CL, et al. Chlamydia trachomatis Infection of Endocervical Epithelial Cells Enhances Early HIV Transmission Events. *PloS one*. 2016;11(1):e0146663.
68. Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2014;289(4):715-23.
69. Mestrovic T, Ljubin-Sternak S. Molecular mechanisms of Chlamydia trachomatis resistance to antimicrobial drugs. *Frontiers in bioscience*. 2018;23:656-70.
70. Unemo M, Del Rio C, Shafer WM. Antimicrobial Resistance Expressed by Neisseria gonorrhoeae: A Major Global Public Health Problem in the 21st Century. *Microbiology spectrum*. 2016;4(3).
71. Farris CM, Morrison RP. Vaccination against Chlamydia genital infection utilizing the murine *C. muridarum* model. *Infection and immunity*. 2011;79(3):986-96.
72. Perry LL, Feilzer K, Caldwell HD. Immunity to Chlamydia trachomatis is mediated by T helper 1 cells through IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Immunol*. 1997;158(7):3344-52.
73. Johnson AP, Taylor-Robinson D. Chlamydial genital tract infections. Experimental infection of the primate genital tract with Chlamydia trachomatis. *The American journal of pathology*. 1982;106(1):132-5.
74. Patton DL, Halbert SA, Kuo CC, Wang SP, Holmes KK. Host response to primary Chlamydia trachomatis infection of the fallopian tube in pig-tailed monkeys. *Fertility and sterility*. 1983;40(6):829-40.
75. Perry LL, Feilzer K, Hughes S, Caldwell HD. Clearance of Chlamydia trachomatis from the murine genital mucosa does not require perforin-mediated cytolysis or Fas-mediated apoptosis. *Infection and immunity*. 1999;67(3):1379-85.

76. Morrison RP, Feilzer K, Tumas DB. Gene knockout mice establish a primary protective role for major histocompatibility complex class II-restricted responses in *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. *Infection and immunity*. 1995;63(12):4661-8.
77. Morrison SG, Su H, Caldwell HD, Morrison RP. Immunity to murine *Chlamydia trachomatis* genital tract reinfection involves B cells and CD4(+) T cells but not CD8(+) T cells. *Infection and immunity*. 2000;68(12):6979-87.
78. Brunham RC, Rey-Ladino J. Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(2):149-61.
79. Maxion HK, Kelly KA. Chemokine expression patterns differ within anatomically distinct regions of the genital tract during *Chlamydia trachomatis* infection. *Infection and immunity*. 2002;70(3):1538-46.
80. O'Meara CP, Armitage CW, Harvie MC, Andrew DW, Timms P, Lycke NY, et al. Immunity against a *Chlamydia* infection and disease may be determined by a balance of IL-17 signaling. *Immunology and cell biology*. 2014;92(3):287-97.
81. Zhang X, Gao L, Lei L, Zhong Y, Dube P, Berton MT, et al. A MyD88-dependent early IL-17 production protects mice against airway infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia muridarum*. *J Immunol*. 2009;183(2):1291-300.
82. Scurlock AM, Frazer LC, Andrews CW, Jr., O'Connell CM, Foote IP, Bailey SL, et al. Interleukin-17 contributes to generation of Th1 immunity and neutrophil recruitment during *Chlamydia muridarum* genital tract infection but is not required for macrophage influx or normal resolution of infection. *Infection and immunity*. 2011;79(3):1349-62.
83. Yu H, Jiang X, Shen C, Karunakaran KP, Jiang J, Rosin NL, et al. *Chlamydia muridarum* T-cell antigens formulated with the adjuvant DDA/TDB induce immunity against infection that correlates with a high frequency of gamma interferon (IFN-gamma)/tumor necrosis factor alpha and IFN-gamma/interleukin-17 double-positive CD4+ T cells. *Infection and immunity*. 2010;78(5):2272-82.
84. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(8):556-67.
85. Darville T, Andrews CW, Jr., Sikes JD, Fraley PL, Rank RG. Early local cytokine profiles in strains of mice with different outcomes from chlamydial genital tract infection. *Infection and immunity*. 2001;69(6):3556-61.
86. Aflatoonian R, Fazeli A. Toll-like receptors in female reproductive tract and their menstrual cycle dependent expression. *Journal of reproductive immunology*. 2008;77(1):7-13.
87. Prebeck S, Kirschning C, Durr S, da Costa C, Donath B, Brand K, et al. Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in *Chlamydia pneumoniae*-induced activation of dendritic cells. *J Immunol*. 2001;167(6):3316-23.
88. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annual review of immunology*. 1996;14:275-300.
89. Su H, Messer R, Whitmire W, Fischer E, Portis JC, Caldwell HD. Vaccination against chlamydial genital tract infection after immunization with dendritic cells pulsed ex vivo with nonviable *Chlamydiae*. *J Exp Med*. 1998;188(5):809-18.

90. Rey-Ladino J, Koochesfahani KM, Zaharik ML, Shen C, Brunham RC. A live and inactivated *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis strain induces the maturation of dendritic cells that are phenotypically and immunologically distinct. *Infection and immunity*. 2005;73(3):1568-77.
91. Grayston JT, Wang SP. The potential for vaccine against infection of the genital tract with *Chlamydia trachomatis*. *Sexually transmitted diseases*. 1978;5(2):73-7.
92. Lausen M, Christiansen G, Bouet Guldbaek Poulsen T, Birkelund S. Immunobiology of monocytes and macrophages during *Chlamydia trachomatis* infection. *Microbes and infection*. 2019;21(2):73-84.
93. Tietzel I, Quayle AJ, Carabeo RA. Alternatively Activated Macrophages Are Host Cells for *Chlamydia trachomatis* and Reverse Anti-chlamydial Classically Activated Macrophages. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:919.
94. Herweg JA, Rudel T. Interaction of Chlamydiae with human macrophages. *The FEBS journal*. 2016;283(4):608-18.
95. Moore T, Ananaba GA, Bolier J, Bowers S, Belay T, Eko FO, et al. Fc receptor regulation of protective immunity against *Chlamydia trachomatis*. *Immunology*. 2002;105(2):213-21.
96. Igietseme JU, Eko FO, He Q, Black CM. Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert review of vaccines*. 2004;3(1):23-34.
97. Ficarra M, Ibane JS, Poretta C, Ma L, Myers L, Taylor SN, et al. A distinct cellular profile is seen in the human endocervix during *Chlamydia trachomatis* infection. *American journal of reproductive immunology*. 2008;60(5):415-25.
98. Joyee AG, Yang X. Role of toll-like receptors in immune responses to chlamydial infections. *Current pharmaceutical design*. 2008;14(6):593-600.
99. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, Shen L, Zhang YX, Anderson DJ, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(1):77-87.
100. Agrawal T, Gupta R, Dutta R, Srivastava P, Bhengraj AR, Salhan S, et al. Protective or pathogenic immune response to genital chlamydial infection in women--a possible role of cytokine secretion profile of cervical mucosal cells. *Clinical immunology*. 2009;130(3):347-54.
101. Kiviat NB, Wolner-Hanssen P, Eschenbach DA, Wasserheit JN, Paavonen JA, Bell TA, et al. Endometrial histopathology in patients with culture-proved upper genital tract infection and laparoscopically diagnosed acute salpingitis. *The American journal of surgical pathology*. 1990;14(2):167-75.
102. Kelly KA, Natarajan S, Ruther P, Wisse A, Chang MH, Ault KA. *Chlamydia trachomatis* infection induces mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1, providing an immunologic link between the fallopian tube and other mucosal tissues. *The Journal of infectious diseases*. 2001;184(7):885-91.
103. Kiviat NB, Paavonen JA, Wolner-Hanssen P, Critchlow CW, Stamm WE, Douglas J, et al. Histopathology of endocervical infection caused by *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex virus, *Trichomonas vaginalis*, and *Neisseria gonorrhoeae*. *Human pathology*. 1990;21(8):831-7.

104. Barteneva N, Theodor I, Peterson EM, de la Maza LM. Role of neutrophils in controlling early stages of a *Chlamydia trachomatis* infection. *Infection and immunity*. 1996;64(11):4830-3.
105. Yasin B, Pang M, Wagar EA. A cumulative experience examining the effect of natural and synthetic antimicrobial peptides vs. *Chlamydia trachomatis*. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*. 2004;64(2):65-71.
106. Ramsey KH, Miranpuri GS, Sigar IM, Ouellette S, Byrne GI. *Chlamydia trachomatis* persistence in the female mouse genital tract: inducible nitric oxide synthase and infection outcome. *Infection and immunity*. 2001;69(8):5131-7.
107. Ramsey KH, Sigar IM, Schripsema JH, Shaba N, Cohoon KP. Expression of matrix metalloproteinases subsequent to urogenital *Chlamydia muridarum* infection of mice. *Infection and immunity*. 2005;73(10):6962-73.
108. Lorenc A, Ananthavarathan P, Lorigan J, Jowata M, Brook G, Banarsee R. The prevalence of comorbidities among people living with HIV in Brent: a diverse London Borough. *London journal of primary care*. 2014;6(4):84-90.
109. Navon L. Hospitalization Trends and Comorbidities Among People With HIV/AIDS Compared With the Overall Hospitalized Population, Illinois, 2008-2014. *Public health reports*. 2018;133(4):442-51.
110. Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity*. 2013;39(4):633-45.
111. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*. 1997;89(2):263-73.
112. Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(6):780-7.
113. Li WH, Tanimura M, Sharp PM. Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Molecular biology and evolution*. 1988;5(4):313-30.
114. L. Fainboim JG. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). *Introducción a la Inmunología Humana*. Capítulo 20. Editorial panamericana. 6ª edición. 2011.
115. Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, Doms RW, et al. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nature immunology*. 2002;3(10):975-83.
116. Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*. 2002;16(1):135-44.
117. McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science*. 2003;300(5623):1295-7.
118. Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, Sattentau QJ. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med*. 2004;199(2):283-93.

119. Puigdomenech I, Massanella M, Izquierdo-Useros N, Ruiz-Hernandez R, Curriu M, Bofill M, et al. HIV transfer between CD4 T cells does not require LFA-1 binding to ICAM-1 and is governed by the interaction of HIV envelope glycoprotein with CD4. *Retrovirology*. 2008;5:32.
120. Wang JH, Kwas C, Wu L. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), but not ICAM-2 and -3, is important for dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Virol*. 2009;83(9):4195-204.
121. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000;100(5):587-97.
122. Izquierdo-Useros N, Lorizate M, McLaren PJ, Telenti A, Krausslich HG, Martinez-Picado J. HIV-1 capture and transmission by dendritic cells: the role of viral glycolipids and the cellular receptor Siglec-1. *PLoS pathogens*. 2014;10(7):e1004146.
123. Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Puertas MC, Rodriguez-Plata MT, Zangger N, Erikson E, et al. Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides. *PLoS biology*. 2012;10(12):e1001448.
124. Perez-Zsolt D, Cantero-Perez J, Erkizia I, Benet S, Pino M, Serra-Peinado C, et al. Dendritic Cells From the Cervical Mucosa Capture and Transfer HIV-1 via Siglec-1. *Frontiers in immunology*. 2019;10:825.
125. Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, et al. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood*. 2004;103(6):2170-9.
126. Hu Q, Frank I, Williams V, Santos JJ, Watts P, Griffin GE, et al. Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *J Exp Med*. 2004;199(8):1065-75.
127. Izquierdo-Useros N, Blanco J, Erkizia I, Fernandez-Figueras MT, Borrás FE, Naranjo-Gomez M, et al. Maturation of blood-derived dendritic cells enhances human immunodeficiency virus type 1 capture and transmission. *J Virol*. 2007;81(14):7559-70.
128. Ganor Y, Real F, Sennepin A, Dutertre CA, Prevedel L, Xu L, et al. HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nature microbiology*. 2019;4(4):633-44.
129. Chang JJ, Altfield M. Innate immune activation in primary HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202 Suppl 2:S297-301.
130. Granot T, Senda T, Carpenter DJ, Matsuoka N, Weiner J, Gordon CL, et al. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity*. 2017;46(3):504-15.
131. Peng G, Lei KJ, Jin W, Greenwell-Wild T, Wahl SM. Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J Exp Med*. 2006;203(1):41-6.
132. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*. 2003;424(6944):99-103.

133. Tomescu C, Chehimi J, Maino VC, Montaner LJ. NK cell lysis of HIV-1-infected autologous CD4 primary T cells: requirement for IFN-mediated NK activation by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2007;179(4):2097-104.
134. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, et al. HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(6):2709-14.
135. Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Munoz A, Saah AJ, et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med.* 1996;2(4):405-11.
136. Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet.* 2002;359(9308):727-32.
137. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science.* 1999;283(5403):857-60.
138. Goonetilleke N, Liu MK, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Gansarov VV, et al. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2009;206(6):1253-72.
139. Khaitan A, Unutmaz D. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Current HIV/AIDS reports.* 2011;8(1):4-11.
140. Ortiz AM, Klatt NR, Li B, Yi Y, Tabb B, Hao XP, et al. Depletion of CD4(+) T cells abrogates post-peak decline of viremia in SIV-infected rhesus macaques. *The Journal of clinical investigation.* 2011;121(11):4433-45.
141. Chevalier MF, Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood.* 2013;121(1):29-37.
142. Munier CM, Kelleher AD, Kent SJ, De Rose R. The role of T cell immunity in HIV-1 infection. *Current opinion in virology.* 2013;3(4):438-46.
143. Hartigan-O'Connor DJ, Abel K, Van Rompay KK, Kanwar B, McCune JM. SIV replication in the infected rhesus macaque is limited by the size of the preexisting TH17 cell compartment. *Science translational medicine.* 2012;4(136):136ra69.
144. Gosselin A, Monteiro P, Chomont N, Diaz-Griffero F, Said EA, Fonseca S, et al. Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *J Immunol.* 2010;184(3):1604-16.
145. Craigie R, Bushman FD. HIV DNA integration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2012;2(7):a006890.
146. Sheth PM, Sunderji S, Shin LY, Rebbapragada A, Huibner S, Kimani J, et al. Coinfection with herpes simplex virus type 2 is associated with reduced HIV-specific T cell responses and systemic immune activation. *The Journal of infectious diseases.* 2008;197(10):1394-401.
147. Kumar A, Abbas W, Herbein G. HIV-1 latency in monocytes/macrophages. *Viruses.* 2014;6(4):1837-60.

148. Coleman CM, Wu L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology*. 2009;6:51.
149. Lee GQ, Lichterfeld M. Diversity of HIV-1 reservoirs in CD4+ T-cell subpopulations. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2016;11(4):383-7.
150. Murray AJ, Kwon KJ, Farber DL, Siliciano RF. The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence. *J Immunol*. 2016;197(2):407-17.
151. Roberts L, Liebenberg L, Barnabas S, Passmore JA. Vaginal microbicides to prevent human immunodeficiency virus infection in women: perspectives on the female genital tract, sexual maturity and mucosal inflammation. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2012;26(4):441-9.
152. Masson L, Passmore JA, Liebenberg LJ, Werner L, Baxter C, Arnold KB, et al. Genital inflammation and the risk of HIV acquisition in women. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;61(2):260-9.
153. Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(6):447-57.
154. Carias AM, McCoombe S, McRaven M, Anderson M, Galloway N, Vandergrift N, et al. Defining the interaction of HIV-1 with the mucosal barriers of the female reproductive tract. *J Virol*. 2013;87(21):11388-400.
155. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1:4680-7.
156. Beagley KW, Gockel CM. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2003;38(1):13-22.
157. Mestecky J, Fultz PN. Mucosal immune system of the human genital tract. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179 Suppl 3:S470-4.
158. Wang X, Meng D. Innate endogenous adjuvants prime to desirable immune responses via mucosal routes. *Protein & cell*. 2015;6(3):170-84.
159. Kwok R. Vaccines: The real issues in vaccine safety. *Nature*. 2011;473(7348):436-8.
160. Gutjahr A, Tiraby G, Perouzel E, Verrier B, Paul S. Triggering Intracellular Receptors for Vaccine Adjuvantation. *Trends in immunology*. 2016;37(9):573-87.
161. Aoshi T. Modes of Action for Mucosal Vaccine Adjuvants. *Viral immunology*. 2017;30(6):463-70.
162. Gallichan WS, Woolstencroft RN, Guarasci T, McCluskie MJ, Davis HL, Rosenthal KL. Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. *Journal of immunology*. 2001;166(5):3451-7.
163. Anderson BL, Teyton L, Bendelac A, Savage PB. Stimulation of natural killer T cells by glycolipids. *Molecules*. 2013;18(12):15662-88.

164. Peng Y, Zhao L, Shekhar S, Liu L, Wang H, Chen Q, et al. The glycolipid exoantigen derived from *Chlamydia muridarum* activates invariant natural killer T cells. *Cellular & molecular immunology*. 2012;9(4):361-6.
165. Moll M, Andersson SK, Smed-Sorensen A, Sandberg JK. Inhibition of lipid antigen presentation in dendritic cells by HIV-1 Vpu interference with CD1d recycling from endosomal compartments. *Blood*. 2010;116(11):1876-84.
166. Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, et al. CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *Journal of virology*. 2010;84(22):11614-23.
167. Subrahmanyam PB, Sun W, East JE, Li J, Webb TJ. Natural killer T cell based Immunotherapy. *Journal of vaccines & vaccination*. 2012;3:144.
168. Hung JT, Huang JR, Yu AL. Tailored design of NKT-stimulatory glycolipids for polarization of immune responses. *Journal of biomedical science*. 2017;24(1):22.
169. Kerzerho J, Yu ED, Barra CM, Alari-Pahissa E, Girardi E, Harrak Y, et al. Structural and functional characterization of a novel nonglycosidic type I NKT agonist with immunomodulatory properties. *J Immunol*. 2012;188(5):2254-65.
170. Crough T, Purdie DM, Okai M, Maksoud A, Nieda M, Nicol AJ. Modulation of human Valpha24(+)Vbeta11(+) NKT cells by age, malignancy and conventional anticancer therapies. *British journal of cancer*. 2004;91(11):1880-6.
171. Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, Ruijter R, Nishi N, Peters M, et al. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(12):3702-9.
172. Kunii N, Horiguchi S, Motohashi S, Yamamoto H, Ueno N, Yamamoto S, et al. Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer science*. 2009;100(6):1092-8.
173. Hung JT, Tsai YC, Lin WD, Jan JT, Lin KH, Huang JR, et al. Potent adjuvant effects of novel NKT stimulatory glycolipids on hemagglutinin based DNA vaccine for H5N1 influenza virus. *Antiviral research*. 2014;107:110-8.
174. Padte NN, Boente-Carrera M, Andrews CD, McManus J, Grasperge BF, Gettie A, et al. A glycolipid adjuvant, 7DW8-5, enhances CD8+ T cell responses induced by an adenovirus-vectored malaria vaccine in non-human primates. *PloS one*. 2013;8(10):e78407.
175. Grivel JC, Margolis L. Use of human tissue explants to study human infectious agents. *Nature protocols*. 2009;4(2):256-69.
176. Cantero J, Genesca M. Maximizing the immunological output of the cervicovaginal explant model. *Journal of immunological methods*. 2018;460:26-35.
177. Grivel JC, Margolis L. Use of human tissue explants to study human infectious agents. *Nat Protoc*. 2009;4(2):256-69.

178. Anderson RJ, Tang CW, Daniels NJ, Compton BJ, Hayman CM, Johnston KA, et al. A self-adjuvanting vaccine induces cytotoxic T lymphocytes that suppress allergy. *Nature chemical biology*. 2014;10(11):943-9.
179. Moorman DR, Sixbey JW, Wyrick PB. Interaction of *Chlamydia trachomatis* with human genital epithelium in culture. *Journal of general microbiology*. 1986;132(4):1055-67.
180. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*. 2014;32:659-702.
181. Bruner KM, Wang Z, Simonetti FR, Bender AM, Kwon KJ, Sengupta S, et al. A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature*. 2019;566(7742):120-5.
182. Vasquez JJ, Hussien R, Aguilar-Rodriguez B, Junger H, Dobi D, Henrich TJ, et al. Elucidating the Burden of HIV in Tissues Using Multiplexed Immunofluorescence and In Situ Hybridization: Methods for the Single-Cell Phenotypic Characterization of Cells Harboring HIV In Situ. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2018;66(6):427-46.
183. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(2):101-17.
184. Cavallari M, Stallforth P, Kalinichenko A, Rathwell DC, Gronewold TM, Adibekian A, et al. A semisynthetic carbohydrate-lipid vaccine that protects against *S. pneumoniae* in mice. *Nature chemical biology*. 2014;10(11):950-6.
185. Cantero J, Genesca M. Maximizing the immunological output of the cervicovaginal explant model. *Journal of immunological methods*. 2018.
186. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
187. Rebuli ME, Pawlak EA, Walsh D, Martin EM, Jaspers I. Distinguishing Human Peripheral Blood NK Cells from CD56(dim)CD16(dim)CD69(+)CD103(+) Resident Nasal Mucosal Lavage Fluid Cells. *Scientific reports*. 2018;8(1):3394.
188. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(15):8869-73.
189. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*. 2009;15(8):893-900.
190. Pallikkuth S, Sharkey M, Babic DZ, Gupta S, Stone GW, Fischl MA, et al. Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral Therapy. *J Virol*. 2015;90(6):2718-28.
191. Topham DJ, Reilly EC. Tissue-Resident Memory CD8(+) T Cells: From Phenotype to Function. *Frontiers in immunology*. 2018;9:515.
192. Margolis L, Shattock R. Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved? *Nature reviews Microbiology*. 2006;4(4):312-7.

193. Abdel-Mohsen M, Kuri-Cervantes L, Grau-Exposito J, Spivak AM, Nell RA, Tomescu C, et al. CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Science translational medicine*. 2018;10(437).
194. Bertagnolli LN, White JA, Simonetti FR, Beg SA, Lai J, Tomescu C, et al. The role of CD32 during HIV-1 infection. *Nature*. 2018;561(7723):E17-E9.
195. Osuna CE, Lim SY, Kublin JL, Apps R, Chen E, Mota TM, et al. Publisher Correction: Evidence that CD32a does not mark the HIV-1 latent reservoir. *Nature*. 2018;563(7733):E33.
196. Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B, Butcher EC. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol*. 1994;152(7):3282-93.
197. Kader M, Wang X, Piatak M, Lifson J, Roederer M, Veazey R, et al. Alpha4(+)beta7(hi)CD4(+) memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection. *Mucosal immunology*. 2009;2(5):439-49.
198. Michel N, Allespach I, Venzke S, Fackler OT, Keppler OT. The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Current biology : CB*. 2005;15(8):714-23.
199. Ford N, Meintjes G, Vitoria M, Greene G, Chiller T. The evolving role of CD4 cell counts in HIV care. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2017;12(2):123-8.
200. Gibbs A, Hirbod T, Li Q, Bohman K, Ball TB, Plummer FA, et al. Presence of CD8+ T cells in the ectocervical mucosa correlates with genital viral shedding in HIV-infected women despite a low prevalence of HIV RNA-expressing cells in the tissue. *J Immunol*. 2014;192(8):3947-57.
201. de la Maza LM, Zhong G, Brunham RC. Update on Chlamydia trachomatis Vaccinology. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2017;24(4).
202. Cheng C, Jain P, Bettahi I, Pal S, Tifrea D, de la Maza LM. A TLR2 agonist is a more effective adjuvant for a Chlamydia major outer membrane protein vaccine than ligands to other TLR and NOD receptors. *Vaccine*. 2011;29(38):6641-9.
203. Cheng C, Pal S, Tifrea D, Jia Z, de la Maza LM. A vaccine formulated with a combination of TLR-2 and TLR-9 adjuvants and the recombinant major outer membrane protein elicits a robust immune response and significant protection against a Chlamydia muridarum challenge. *Microbes and infection*. 2014;16(3):244-52.
204. Van Rhijn I, Moody DB. CD1 and mycobacterial lipids activate human T cells. *Immunological reviews*. 2015;264(1):138-53.
205. Peters A, Lee Y, Kuchroo VK. The many faces of Th17 cells. *Current opinion in immunology*. 2011;23(6):702-6.
206. Mallevaey T, Scott-Browne JP, Matsuda JL, Young MH, Pellicci DG, Patel O, et al. T cell receptor CDR2 beta and CDR3 beta loops collaborate functionally to shape the iNKT cell repertoire. *Immunity*. 2009;31(1):60-71.
207. Ho HN, Chao KH, Chen CK, Yang YS, Huang SC. Activation status of T and NK cells in the endometrium throughout menstrual cycle and normal and abnormal early pregnancy. *Human immunology*. 1996;49(2):130-6.

208. Rodríguez-García M, Fortier JM, Barr FD, Wira CR. Aging impacts CD103(+) CD8(+) T cell presence and induction by dendritic cells in the genital tract. *Aging cell*. 2018;17(3):e12733.
209. Chang DH, Osman K, Connolly J, Kukreja A, Krasovsky J, Pack M, et al. Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J Exp Med*. 2005;201(9):1503-17.
210. Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M, Steinman RM. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol*. 2002;3(9):867-74.
211. Burt BM, Plitas G, Nguyen HM, Stableford JA, Bamboat ZM, Dematteo RP. Circulating HLA-DR(+) natural killer cells have potent lytic ability and weak antigen-presenting cell function. *Human immunology*. 2008;69(8):469-74.
212. Evans JH, Horowitz A, Mehrabi M, Wise EL, Pease JE, Riley EM, et al. A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *European journal of immunology*. 2011;41(7):1924-33.
213. Introini A, Bostrom S, Bradley F, Gibbs A, Glaessgen A, Tjernlund A, et al. Correction: Seminal plasma induces inflammation and enhances HIV-1 replication in human cervical tissue explants. *PLoS Pathog*. 2017;13(7):e1006492.
214. O'Doherty U, Swiggard WJ, Malim MH. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J Virol*. 2000;74(21):10074-80.
215. Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J Exp Med*. 2003;198(2):267-79.
216. Gonzalez-Aseguinolaza G, de Oliveira C, Tomaska M, Hong S, Bruna-Romero O, Nakayama T, et al. alpha-galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(15):8461-6.
217. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med*. 2000;192(7):921-30.
218. Venkataswamy MM, Baena A, Goldberg MF, Bricard G, Im JS, Chan J, et al. Incorporation of NKT cell-activating glycolipids enhances immunogenicity and vaccine efficacy of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol*. 2009;183(3):1644-56.
219. O'Meara CP, Andrew DW, Beagley KW. The mouse model of Chlamydia genital tract infection: a review of infection, disease, immunity and vaccine development. *Current molecular medicine*. 2014;14(3):396-421.
220. Li X, Fujio M, Imamura M, Wu D, Vasan S, Wong CH, et al. Design of a potent CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(29):13010-5.
221. Huang Y, Chen A, Li X, Chen Z, Zhang W, Song Y, et al. Enhancement of HIV DNA vaccine immunogenicity by the NKT cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Vaccine*. 2008;26(15):1807-16.
222. Beura LK, Wijeyesinghe S, Thompson EA, Macchietto MG, Rosato PC, Pierson MJ, et al. T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells. *Immunity*. 2018;48(2):327-38 e5.

223. Joag VR, McKinnon LR, Liu J, Kidane ST, Yudin MH, Nyanga B, et al. Identification of preferential CD4+ T-cell targets for HIV infection in the cervix. *Mucosal immunology*. 2016;9(1):1-12.
224. Perciani CT, Jaoko W, Farah B, Ostrowski MA, Anzala O, MacDonald KS, et al. alphaEbeta7, alpha4beta7 and alpha4beta1 integrin contributions to T cell distribution in blood, cervix and rectal tissues: Potential implications for HIV transmission. *PloS one*. 2018;13(2):e0192482.
225. Gorry PR, Ancuta P. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Current HIV/AIDS reports*. 2011;8(1):45-53.
226. Cavois M, Banerjee T, Mukherjee G, Raman N, Hussien R, Rodriguez BA, et al. Mass Cytometric Analysis of HIV Entry, Replication, and Remodeling in Tissue CD4+ T Cells. *Cell reports*. 2017;20(4):984-98.
227. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity*. 2014;41(6):886-97.
228. Descours B, Petitjean G, Lopez-Zaragoza JL, Bruel T, Raffel R, Psomas C, et al. CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature*. 2017;543(7646):564-7.
229. Badia R, Ballana E, Castellvi M, Garcia-Vidal E, Pujantell M, Clotet B, et al. CD32 expression is associated to T-cell activation and is not a marker of the HIV-1 reservoir. *Nature communications*. 2018;9(1):2739.
230. Park SL, Zaid A, Hor JL, Christo SN, Prier JE, Davies B, et al. Local proliferation maintains a stable pool of tissue-resident memory T cells after antiviral recall responses. *Nat Immunol*. 2018;19(2):183-91.
231. Yukl SA, Shergill AK, Ho T, Killian M, Girling V, Epling L, et al. The distribution of HIV DNA and RNA in cell subsets differs in gut and blood of HIV-positive patients on ART: implications for viral persistence. *The Journal of infectious diseases*. 2013;208(8):1212-20.
232. Costiniuk CT, Salahuddin S, Farnos O, Olivenstein R, Pagliuzza A, Orlova M, et al. HIV persistence in mucosal CD4+ T cells within the lungs of adults receiving long-term suppressive antiretroviral therapy. *Aids*. 2018;32(16):2279-89.
233. Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DI, et al. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*. 2013;155(3):540-51.