RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Pereyra, Erica Vanesa

Desarrollo de una vacuna génica contra el virus de la fiebre aftosa utilizando adyuvantes moleculares y químicos. Evaluación de la respuesta inmune inducida

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Pereyra, E. (2018). Desarrollo de una vacuna génica contra el virus de la fiebre aftosa utilizando adyuvantes moleculares y químicos. Evaluación de la respuesta inmune inducida. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/803

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad
Nacional
de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Pereyra, Erica, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
diciembre de 2015, pp. 141,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencias Básicas y Aplicadas

Desarrollo de una vacuna génica contra el virus de la fiebre aftosa utilizando adyuvantes moleculares y químicos. Evaluación de la respuesta inmune inducida

TESIS DOCTORAL

Erica Pereyra
ervape17685@yahoo.com.ar

Resumen

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad aguda, febril, contagiosa y económicamente importante, que afecta principalmente a animales de pezuña hundida. El agente etiológico, el virus de la fiebre aftosa (VFA) posee un ácido ribonucleico ARN (+) monocatenario, que proporciona la información para la producción de las proteínas no estructurales y una poliproteína estructural, P1, cuya proteólisis da lugar a las proteínas de la cápside proteica icosaédrica VP1, VP2, VP3 y VP4. La vacuna utilizada para controlar el VFA contiene virus inactivo con un adyuvante oleoso, la producción de VFA inactivo (VFAi) requiere un alto costo en instalaciones de contención con un riesgo permanente de fuga del virus. Por lo cual, en los últimos años se han probado diferentes vacunas alternativas, entre ellas se ha propuesto, el uso de vacunas génicas que resultan más seguras y fáciles de producir. En este trabajo de tesis, se propuso como vacuna génica a los vectores plasmídicos que poseen la secuencia que codifica para la proteína VP1 (pVP1) y para la poliproteína P1 y las proteinasas 2A y 3C (pP) del VFA de la cepa O1 Campos junto a un adyuvante químico ESSAI 95201 (Ady101) y plásmidos que codifican para moléculas que potencian la respuesta inmune como ser las moléculas co-estimuladoras del receptor T, CD40L y RANKL, o IL15. Se pudo demostrar que las formulaciones que incluyeron la proteína VP1 ya sea en su forma citosólica o secretada no indujeron una buena respuesta protectora en los ratones desafiados con el VFA O1Campos. Por el contrario, se obtuvo una respuesta protectora total en el 80% de los ratones en el grupo de pP+pIL15+Ady101 y del 60 % de los ratones del grupo pP+ pCD40L+Ady101. Todos los grupos vacunados con estas vacunas génicas indujeron una respuesta inmune humoral, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el título de anticuerpos (acs) anti-VFA inducido por las diferentes formulaciones. Además, no se encontraron diferencias significativas en el título de los isotipos de las inmunoglobulinas, ni en la avidez con respecto al grupo pP y tampoco se indujeron en los ratones inmunizados con esta vacunas acs seroneutralizantes (SN). Por otro lado, se pudo demostrar que en los ratones inmunizados tanto con pP+pCD40L+Ady101 y pP+pIL15+Ady101 tienen un número mayor de células secretoras de IFNγ que el grupo pP. Por lo cual, la protección podría deberse a la actividad antiviral de esta citoquina, como la activación de los linfocitos T (LT) CD8, células *Natural Killer* (NK) y macrófagos (MO). Asimismo, en el grupo pP+pIL15+Ady101 se observó un incremento significativo de linfocitos B (LB) y LT CD4, LT CD8, MO y células NK con respecto al grupo pP. Por lo cual, IL15 además de inducir la actividad antiviral de IFNγ, induciría la proliferación de estas poblaciones. Finalmente, para mejorar la respuestas protectoras de estas vacunas, se reemplazó el último refuerzo con una dosis subinmunizante de VFAi logrando el 100 % de protección en el grupo pP+pIL15+Ady101 y un 80% en el grupo pP +pCD40L+ Ady101 y en el pP y sólo un 20 % en los grupos VFAi y pCI-neo.

Directora: Dra. Claudia Mongini
Co-Directora: Dra. Patricia I. Zamorano
Consejera de estudios: Graciela Glickman
Lugar de trabajo: Instituto de Virología – CICVyA - INTA Castelar.

A mi mamá, que me da las fuerzas a seguir adelante todos los días. Por su amor, su comprensión y apoyo incondicional.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que, en distintos ámbitos hicieron posible la concreción de este trabajo de Tesis:
.

- A mi directora de tesis, la Dra. Claudia Mongini, y a mi co-directora la Dra. Patricia Zamorano por haberme concedido la oportunidad de realizar mi tesis de doctorado y por todo el apoyo en estos 6 años de trabajo.

- Al CONICET, al FONCyT y al Instituto de Virología de INTA Castelar por brindarme los medios para realizar esta tesis de doctorado.

- A mi grupo de trabajo, a los cuales estimo con todo mi corazón y voy a extrañar verlos todos los días

- Gracias Vicky por bancarme todos los días y sacarme una sonrisa cuando los experimentos no me salían como quería, no podría tener una mejor compañera de escritorio, te voy a extrañar mucho.

- Gracias Iva por ayudarme con los experimentos. Sos una gran mamá y espero que encuentres tu camino, que sea lo que sea te va ir bien porque sos un excelente profesional.

- Gracias Vale y Ce por tus consejos tanto para el laboratorio como para la vida. Son granes personas y grandes científicos.

- Gracias Marie por pasarme las células en el citómetro, aunque sean como 300 muestras.
- Gracias a los Sebas por darme a la bienvenida en el laboratorio y hacerme sentir como una más ni bien ingrese al laboratorio. Gracias por sus consejos y charlas

- A todo el grupo humano del Instituto de Virología de INTA Castelar, desde los jefes, técnicos, choferes, secretarias por su ayuda a nivel administrativo y humano.

- A todos los becarios del Instituto de Virología de INTA Castelar. Son excelentes personas, que me ayudaron dándome consejos y prestándome reactivos cuando más lo necesitaba. Nunca los voy a olvidar.

- A Marta y Pame por lavarme y autoclavarme el extenso material que usaba para mis bacterias.

- A Osvaldo por tus consejos y por producirme las células, a pesar de que a veces no te las pedía a tiempo.

- A Fátima por cuidar a mis animales y por escucharme cuando las cosas no funcionaban tan bien.

- A Marian y Ailin, que además de ser buenas amigas, me escucharon siempre y me bancaron cada vez que tenía que salir tarde del laboratorio.

- A toda mi familia y amigos que no me dejaron bajar los brazos e hicieron que la siga peleando.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Índice

ABREVIATURAS.....9

INTRODUCCIÓN.....13

1. La Fiebre Aftosa.....13

1.1. Enfermedad y patogenia de la Fiebre Aftosa.....13

1.2. Importancia económica.....14

1.3. Antecedentes de FA y situación actual en América del Sur.....15

1.3.1. Antecedentes de FA y situación actual en la Argentina.....15

1.4. Organización genómica y proteínas codificadas por el VFA.....16

1.5. Sitios antigénicos del VFA.....18

1.6. Respuesta inmune contra el VFA.....19

1.7. Respuesta inmune en el modelo murino.....20

1.7.1. Diferencias entre animales infectados y vacunados en el modelo murino.....22

2. Vacunas contra VFA.....24

2.1. Vacunas tradicionales.....24

2.2 Vacuna para FA usada actualmente.....24

2.3. Diferentes estrategias para el desarrollo de vacunas contra el VFA 26

2.3.1. Vacunas a subunidades proteicas o a subunidades peptídicas o extractos de plantas que contienen el ADN que codifican para proteínas del VFA.....26

2.3.2. Partículas similares a Virus de la Fiebre Aftosa (VLP).....27

2.3.3. Plataformas con vectores virales.....29

2.3.4. Vacunas a microorganismos vivos modificados.....29

2.3.5. Vacuna contra el VFA derivada de una plataforma de ADNc modificado.....30

3. Vacuna génica.....30

3.1. Respuesta inmune inducida por las vacunas a ADN.....30

3.2. Vacunas génicas veterinarias.....34

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.3 Vacunación génica contra VFA.....34

4. Adyuvantes 38

4.1. Clasificación de los adyuvantes.....38

4.2. Adyuvantes moleculares.....40

4.2.1. CD40L/RANKL.....40

4.2.2. Interleuquina 15 (IL15).....42

4.3. Adyuvante polimérico.....43

HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....45

MATERIALES Y METODOS.....46

1. Animales.....46

2. Líneas celulares.....46

3. Virus.....46

4. Inmunizaciones.....47

5. Vectores de expresión.....47

5.1 Construcción de pVP1c, pVP1c-CD40L, pVP1c-RANKL.....47

5.2 Construcción pVP1s 47

5.3 Construcción pP.....48

5.4 Vectores que codifican para las moléculas coestimuladoras 48

6. Caracterización de los plásmidos obtenidos por restricción enzimática y secuenciación.....48

7. Verificación de la expresión de la proteínas VP1 y de la poliproteína P1 *in vitro* por transfección en células BSR y análisis por Western Blot.....48

7.1. Transfección de los plásmidos en células BSR.....48

7.2. Western Blot.....49

8. Verificación de la expresión de las moléculas coestimuladoras por citometría.....49

9. Verificación de la expresión de IL15 por ELISA.....49

10. Amplificación y purificación de los plásmidos.....50

11. Titulación viral por el método de punto final.....50

12. Desafío en el modelo murino.....51

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

13. Seroneutralización para la determinación de la presencia de acs SN contra el VFA en muestras de sueros murinos .....……..51

14. ELISA para detección de anti IgG totales e isotipos murinos…...….…..51

15. ELISA para evaluación de Avidez en murinos……..…….…..52

16. Obtención de células murinas……..……...53

17. ELISA para la determinación de la concentración de IFNγ e IL4 en sobrenadantes de cultivos de células murinas……..……...53

18. Análisis de la expresión de moléculas de superficie de células murinas mediante citometría de flujo……..……..…….…..…53

19. Análisis de la expresión de IFNγ intracelular…….....…….….....54

20. Análisis estadístico de los datos……..……...…54

21. Medidas de bioseguridad……....……....54

RESULTADOS…….……..…..55

1. 1. Construcción de los plásmidos que portan los genes de los antígenos del VFA y de las moléculas coestimuladoras CD40L y RANKL…….....……55

1.1 Construcción de pVP1c, pVP1c-CD40L, pVP1c-RANKL ……..……55

1.2. Construcción de pVP1s…….…….....…....…58

1.3. Construcción de pP……..……59

1.4. Amplificación y caracterización de los plásmidos que codifican para las moléculas inmunomoduladoras……...……..……60

2. Expresión de los genes que codifican para los inmunógenos VP1 y P1 y las moléculas inmunomoduladoras CD40L, RANKL e IL5……..…….....……62

2.1. Expresión de los genes que codifican para los inmunógenos ……...62

2.2. Expresión de las moléculas CD40L y RANKL……..…….63

2.3. Expresión de IL15……...…..……...64

3. Selección de las vacunas génicas por su capacidad de inducir una respuesta inmune humoral protectora frente al VFA…….....…….....……65

3.1. Esquema de inmunización……..……..……..…65

3.2. Vacuna génica pVP1c……...……....……..…..66

3.3. Vacuna génica pVP1s……...……..……..67

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.4. Vacuna génica pP……..…….……..…….68

4. Respuesta inmune inducida en ratones inmunizados con pP+pIL15+Ady101, o pP+pCD40L+Ady101…….....72

4.1. Inmunidad humoral inducida por la vacunación…….…..…...……72

4.2. Inmunidad celular inducida por la vacunación……..75

4.2.1. Análisis Fenotípico de las Poblaciones celulares de los bazos de los ratones vacunados….……....……..75

4.2.2. Los ratones inoculados con pP+pIL15+Ady101 presentan un incremento en el número de LT y LB …….....76

4.2.3. Los ratones inoculados con pP+pIL15+Ady101 presentan un incremento en el número de células NK……...….……79

4.2.4. Los ratones inoculados con pP+pIL15+Ady101 presentan un incremento en el número de MO…….....…….……81

4.2.5. Los ratones inoculados con pP+pIL15+Ady101 presentan un incremento en el número de células de neutrófilos …….....….……82

4.2.6 Estudio de las citoquinas secretadas por los ratones de los diferentes tratamientos…….……..84

4.2.7. Incremento en la secreción de IFNγ en los grupos pP+pCD40L+Ady101 y pP+pIL15+Ady101……...……85

4.2.8. Incremento en el porcentaje de células secretoras de IFNγ en los grupos pP + pCD40L+ Ady101 y pP + pIL15+ Ady101……...……86

4.2.9. Incremento en el porcentaje de células CD4 secretoras de IFNγ en el grupo pP + pIL15+ Ady101……...……..…87

4.2.10. Porcentaje de los LT CD8 secretoras de IFNγ en el grupo pP + pIL15+ Ady101……..…….....88

5. Determinación de la respuesta inmune de memoria inducida por las vacunas génicas……...…….....…….....……88

5.1 Determinación de la dosis subinmunizante de VFAi…….....…..89

5.2. Esquemas de vacunación prime and boost con virus inactivo con menor dosis de vacuna génica y con una dosis subinmunizante de VFAi.....90

5.3. Esquema de inmunización con 3 dosis de vacuna génica (50 μg/dosis) y refuerzo on VFAi (0,1 μg/dosis).....91

5.4. Esquema de inmunización con 2 o 1 dosis de vacuna génica (50 μg) y refuerzo con VFAi (0,1 μg/dosis)……95

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

5.5. Esquema de inmunización con una dosis de vacuna génica (50 μg) y refuerzo con VFAi (0,1 μg/dosis)……98

DISCUSIÓN……..…….....101

Estrategias de tipo *prime-and-boost* heterólogo……....…….114

CONCLUSIONES.....……...……..117

BIBLIOGRAFÍA.…….…….119

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt
Acs: Anticuerpos
ABAC: Asociación Banco Argentino de Células
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN copia
Ad: Adenovirus
Amp: Ampicilina
Antisense: primer reverso
APC: Allophycocyanin
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido Ribonucleico mensajero
ASA: sitio antigénico "A", el principal sitio antigénico en la proteína capsidal VP1 del virus de la fiebre aftosa
ATCC: American Type Culture Collection,
BCR: receptor del linfocito B
BEI: etilenimina binaria
BHK-21: Fibroblastos adherentes obtenidos de riñón de hámster lactante
BSR: Línea celular derivada de un clon de BHK-21
Buffer: solución de sustancias químicas que mantienen constante su pH
BSA: seroalbúmina bovina
ºC: grados centígrados
CCDA: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
CD: Célula dendrítica
CDd: Célula dendrítica de la dermis
CD-ln: Célula dendrítica de la dermis langerina +
CEE: Comunidad Económica Europea
CICUAE: Comisión de Ética de INTA Castelar
CL: Célula de Langerhans
cm2: centímetro cuadrado
Cm: Cloranfenicol
CMV: Citomegalovirus
CPA: célula presentadora de antígeno
Cpg:
CO2: dióxido de carbono
ConA: Concanavalina A
CTL: linfocitos T citotóxicos
DITC50/ml: dosis infectivas cultivo de tejido 50%/mililitro
DLRL50/ml: dosis letales ratón lactante 50%/mililitro
DMEM: medio esencial mínimo de Dulbecco
dNTPs :deoxinucleótidos
DO: Densidad óptica
dpi: días post infección
dpub: días post último refuerzo
dpv: días post vacunación
dpuv: Días post última vacunación
DS: Desvío standard
ECP: efecto citopático
EDTA: Ácido etilenamido tetra-acético
EI: etilenimina
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay. Inmunoensayo con revelado enzimático
ELISA-FL: Inmunoensayo con revelado enzimático, en fase líquida.
etc: etcétera
f: forward primer

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

FA: Fiebre Aftosa
Fc: Fase constante
FcR: receptores para la porción Fc de anticuerpos
FITC: isotiocianato de fluoresceína
Fig. Figura
FSC: Forward scatter
g: gramo
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP: proteína verde fluorescente
G418: Antibiótico Geneticina 418
G-MEM: Medio Esencial Mínimo Glasgow
GM-CSF: Factor de estimulación de colonias de granulocitos-MOs.
pGM-CSF: GM-VSF porcino
H2O2: Peróxido de hidrógeno
h: horas
HEPES: ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico
HmLu: células de pulmón de hámster
hpi: horas post infección
hpt: horas post transfección
HSV-1: Herpes Simplex tipo 1
Hrp: horseradish peroxidase peroxidasa de rábano
IBRS2: células de riñón de cerdo
IA: índice de avidez
Id: intradérmica
ID 50: Dosis infectiva 50%;
Id: intradérmica
IE: índices de estimulación
IFI: immunofluorescencia indirecta
IFN: Interferón
Ig: Inmunoglobulina
IL: Interleuquina
INP: Información no provista
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
im: intramuscular
ip: intraperitoneal
in: intranasal
IP: Inmunoprecipitación
IPTG: isopropil-Beta-D-Tiogalactopiranosido
IU: Unidades Infecciosas
IRES: Sigla en inglés para "sitio interno de unión a los ribosomas"
Kan: kanamicina
Kb: kilo base
kDa: kilo Daltons
l: litro
LT: Linfocito T
LB: Linfocito B
lb: Luria-Bertani, medio rico nutricional utilizado para el crecimiento de bacterias
Log: Logaritmo en base 10
M: Molar
mAbs: anticuerpos monoclonales
µl: microlitro
µg microgramo
mg: miligramo
MHC: complejo principal de histocompatibilidad
ml: mililitro

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

mM: milimolar
min: minuto
MO: Macrófago
MOI: multiplicidad de infección
MTT: metiltiazoltetrazolio
N: Normal
ng: nanogramo
NIL2: células de embrión de hamster
NLs: Nódulo Linfático
nm: nanómetros
NK: Natural Killer
nm: nanómetro
nt: nucleótidos
OIE: Organización Internacional de Epizootias
OPD: o-fenilendiamino.
ON: Over Night
ORF: marco de lectura abierto
p: Plásmido
pA: señal de poliadenilación
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
PANAFTOSA: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
pb: pares de bases
PBS: phosphate buffered saline: solución salina de fosfatos
PD50: Prueba Dosis media de Protección
PBST-OVA: buffer fosfato Tween ovoalbúmina
PBST: buffer fosfato Tween
PE: ficoeritrina
PEG: polietilenglicol
PFU: Unidades formadoras de placas
PLG: poly-lactido co-glycolido
PM: Peso molecular
Pellet: precipitado luego de la centrifugación
pmol: picomoles
pH: Potencial hidrógeno
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
primers: oligonucleótidos iniciadores
PRRs: receptores de reconocimiento de patrones
rev: reverse primer
RGD: Motivo que constituyen los aminoácidos arginina – glicina -ácido aspártico
rpm: revoluciones por minuto
RT-PCR: Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
S: Coeficiente de sedimentación
SDS: dodecyl sulfato de sodio. Detergente de acción desnaturalizante
SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal
Sense: primer forward
SFB: Suero Fetal Bovino
SFV: Semliki Forest Virus
SN: Seroneutralizantes
SNC: Suero Normal de Conejo
sc: subcutánea
SSC: Side scatter
TA: Temperatura Ambiente
Taq Pol: ADN polimerasa obtenida de Thermophilus aquaticus

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

TCID50: Dosis infectiva de cultivo 50%
TD: timo dependiente
TMB: 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine
Th1: linfocitos T colaboradores tipo 1
Th2: linfocitos T colaboradores tipo 2
TI: timo independiente
TLR: receptores tipo Toll
Tc: Linfocitos T-citotóxicos
Th: Linfocitos T-colaboradores
UT: Unidades de Transducción
UTR: Untranslated region. Región no codificante
UFP: Unidades formadoras de placas
UV: luz Ultravioleta
VFA Virus de la fiebre aftosa
VFAi : Virus de la fiebre aftosa inactivado
VIAA: Antígeno asociado a la infección viral
VLPs: partículas virales vacías
VP: Proteínas de la cápside de VFA. Se indican con números “VP1”, “VP2”, "VP3", "VP4"
Vtf7-3: Virus vaccinia recombinante que expresa la polimerasa del bacteriofago T7
ZM: zona marginal
%: porcentaje
µg: microgramos

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

INTRODUCCIÓN

1. La Fiebre Aftosa

1.1. Enfermedad y patogenia de la Fiebre Aftosa

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad viral altamente contagiosa cuyo agente causal, llamado virus de la fiebre aftosa (VFA) fue identificado por Loeffler y Frosch en 1897 (Grubman and Baxt, 2004). Esta enfermedad es inmunológicamente compleja, con un amplio rango de hospedadores y genera un estado portador muy perjudicial para su control. Afecta a los artiodáctilos, incluyendo rumiantes domésticos, como bovinos, ovinos, caprinos y cerdos, así como a más de 70 especies silvestres tales como: bisontes, jabalíes, camellos, llamas, vicuñas, guanacos, antílopes, ciervos, venados, búfalos, erizos, nutrias, elefantes y carpinchos (Alexandersen et al., 2003). Las tres especies principales involucradas en un brote de FA son el ovino como huésped de mantenimiento principalmente, el porcino que juega un papel importante en la cadena epidemiológica de la FA por ser un gran amplificador del virus luego de ser infectado (Donaldson and Ferris, 1980; Donaldson et al., 1987), y el bovino como indicador de la presencia del virus; esta última es la especie más importante en la diseminación y mantenimiento de la cadena epidemiológica de la transmisión (House and Mebus, 1998).

La enfermedad se caracteriza por la aparición de fiebre y lesiones vesiculares localizadas fundamentalmente en la cavidad bucal, lengua y alrededor de las pezuñas, y en algunos casos también lesiones en el epitelio del hocico, ollares, pezones, ubres y pilares del rumen. El contagio está determinado por tres aspectos esenciales: la cantidad de virus eliminada por el animal infectado, la supervivencia del virus afuera del animal y la cantidad de virus requerida para comenzar la enfermedad en el animal susceptible (Sellers et al., 1971). Muchos trabajos indican que el área de la faringe es el sitio habitual de infección primaria, a menos que el virus haya entrado por lesiones en la piel o mucosas. El VFA replica durante un periodo que se extiende de uno a tres días en el epitelio del techo de la faringe y en la superficie dorsal del paladar blando, tanto en bovinos como en cerdos (Oleksiewicz et al., 2001; Alexandersen et al., 2001), mientras que en los ovinos serían las tonsilas las que juegan un rol de importancia en la infección inicial (Burrows, 1968). La viremia generalmente dura entre 3 y 5 días en bovinos. La principal amplificación del virus en este momento ocurre en el epitelio escamoso estratificado cornificado de la piel, especialmente alrededor de las pezuñas, en glándula mamaria y boca, incluyendo la lengua.

En los bovinos, los primeros síntomas de la enfermedad aparecen tras un período de incubación de 2 a 8 días. Estos son fiebre, anorexia y disminución de la producción láctea; desarrollo de vesículas o aftas en la mucosa bucal, espacios interdigitales y epitelio de los pezones (Schudel et al., 1986). Las vesículas generan áreas de daño epitelial, que de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

acuerdo a su ubicación, producen salivación abundante o complicaciones para caminar; en consecuencia, se dificulta la alimentación, el ordeñe y la lactancia (Shahan et al., 1962). Todo esto redunda en una rápida pérdida de peso del animal y en una acentuada baja en la producción de leche.

En los animales más jóvenes, esta infección viral puede producir miocarditis y la tasa de mortalidad puede elevarse entonces hasta un 50%. Sin embargo, en animales adultos la mortalidad por la FA es inferior al 6%, y los tejidos dañados se regeneran rápidamente. Si bien los adultos se sobreponen sin mayores inconvenientes, existe un número variable de animales que se convierten en portadores asintomáticos de la enfermedad, transformándose en verdaderos reservorios del virus. La importancia del estado portador radica no solo en la permanencia del virus en el campo, sino que se ha sugerido también que podrían aparecer variantes debido a cambios durante su replicación persistente (Fagg and Hyslop, 1966; Gebauer et al., 1988).

1.2. Importancia económica

La OIE (Organización Internacional de Epizootias) ha identificado los siguientes conceptos como los patrones de enfermedad de mayor importancia: la alta transmisibilidad, la rápida difusión, las consecuencias graves para la economía o para la salud pública y la importancia en el comercio internacional de animales y productos animales. Entre las enfermedades animales que reúnen las características mencionadas, excepto la de ser de riesgo para la salud pública, se encuentra la FA. El VFA ha causado los mayores perjuicios económicos relacionados con el ganado en el mundo y en nuestro país.

El alto grado de morbilidad, las pérdidas de productividad y las lesiones asociadas a infecciones secundarias, constituyen un problema importante para los productores ganaderos e industrias relacionadas (Morgan et al., 1980). Cada episodio de FA representa considerables pérdidas económicas tanto a nivel local como nacional (Doel et al., 2003). A nivel local la infección del ganado resulta invariablemente en: pérdidas de hasta un 25% en la producción láctea anual del ganado lechero; reducción en la velocidad de crecimiento y producción de carne, reportándose hasta un 20% de tiempo extra necesario para alcanzar la madurez en bovinos y una reducción del 20% en la producción anual de carne porcina; reducción en la fertilidad debido a abortos y retrasos en la concepción; altos índices de mortalidad en animales jóvenes; costos por el descarte de animales improductivos y crónicamente infectados e interrupción de las actividades en los establecimientos afectados, con disminución de los ingresos económicos, pérdida de stock genético e interrupción de programas de mejoramiento genético.

A nivel nacional los efectos de la enfermedad son: interrupción de la producción ganadera afectando la disponibilidad y los precios de productos pecuarios en el mercado

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

local, llevando en algunos casos a recurrir a la importación de alguno de esos productos; cierre de mercados de exportación impuesto por los países importadores y finalmente los costos directos e indirectos del control y erradicación de la enfermedad como ser compensación a los ganaderos, salarios a veterinarios y personal operacional y de soporte, interrupción de negocios en general, etc.

En los últimos años, tanto países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo, libres de la enfermedad, han sufrido la reintroducción del virus, perdiendo y recuperando alternativamente el reconocimiento de país libre de FA, con las consecuencias económicas que esto implica. Por lo tanto, consolidar el uso de las herramientas y metodologías apropiadas ya existentes, generar nuevos conocimientos en el área de FA y mejorar o desarrollar nuevas vacunas contra el VFA, con el objetivo de contribuir a mantener la situación sanitaria actual y/o adquirir una categoría superior, constituyen para los países afectados por el VFA prioridades fundamentales tanto para las instituciones públicas como para el sector productivo.

1.3. Antecedentes de FA y situación actual en América del Sur

El primer reporte de la enfermedad fue descripto en 1870 en el Cono Sur, que incluye a la Argentina, Brasil, Chile y Uruguay (Correa Melo et al., 2002). La presencia de la enfermedad con el concomitante cierre de mercados para el comercio internacional de productos ganaderos y el compromiso político de los diferentes países para controlar y erradicar la enfermedad del continente dieron pie a la implementación en el año 1988 del Plan Hemisférico de Erradicación de Fiebre Aftosa (PHEFA). Desde entonces, avances muy significativos se han logrado en el control de la enfermedad, principalmente en el Cono Sur, pero también en algunos países de la región Andina. Como resultado de estas acciones coordinadas el *status* sanitario de la mayoría de los países o regiones reconocidos por la OIE es Libre de FA con o sin vacunación, siendo Argentina, país libre con vacunación al norte del paralelo 42º y sin vacunación al sur.

1.3.1 Antecedentes de FA y situación actual en la Argentina

En los Anales de la Sociedad Rural Argentina, del año 1870, se alude a noticias de que en San José de Flores y Lomas de Zamora, Provincia de Buenos Aires, aparecieron focos de FA (Pecker et al., 2007). Desde entonces ha sido la enfermedad con más relevancia que ha afectado la producción animal. La superficie total de la Argentina es de 2.780.199 km^2, contando con aproximadamente 50 millones de cabezas de ganado vacuno y 14 millones de ovejas. El sistema de producción y los movimientos usuales de ganado vacuno dentro de estas extensas áreas geográficas dificulta el manejo y la contención de brotes de FA. Históricamente los brotes han ocurrido dos veces al año, con

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

picos en los meses de mayo/junio, y septiembre/octubre, debido al mayor movimiento de animales y la presencia de ganado vacuno con bajo niveles de acs, ya sea por el destete reciente o por el comienzo de las campañas de vacunación (Pizzi etal., 1998).

El Programa Argentino de Control de Fiebre Aftosa desarrollado entre los años 1990-1997 llevó al control y erradicación de la enfermedad logrando en 1997 el *status* oficial otorgado por la OIE de país libre de FA con vacunación. En 1999 se reconoció por parte de la OIE como país libre de FA sin vacunación (Mattion et al., 2004).

En julio del 2000, reaparecieron focos de FA en el país. El serotipo O fue responsable de unos pocos brotes al comienzo de la epidemia, mientras que el serotipo A circuló hasta enero de 2002 (Mattion et al., 2004). Las medidas tomadas por el Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (SENASA), incluyeron junto con otras medidas preventivas, rifle sanitario, vacunación en anillo, restricción del movimiento de animales y la incorporación de la nueva cepa circulante a la vacuna. En julio de 2003 la Argentina fue reconocida nuevamente por la OIE como país libre de FA con vacunación, *status* que se perdió luego de detectarse la enfermedad en febrero de 2006 en el Departamento de San Luis del Palmar en la provincia de Corrientes. Cabe destacar que a lo largo de todos estos acontecimientos se mantuvo el *status* libre de FA sin vacunación de la región patagónica, al sur del paralelo 42, otorgado en mayo de 2002.

Luego de intensos trabajos tanto de la comunidad ganadera, servicios privados y oficiales de salud animal se logró nuevamente a principios de 2007 el reconocimiento de la OIE de país libre de FA con vacunación al norte del paralelo 42.

Todo lo planteado justifica la inversión en el desarrollo de nuevas vacunas que sean efectivas y seguras, y de amplio espectro, que permitan cubrir las variantes que puedan surgir. Resultaría estratégico que la nueva generación de inmunógenos contra la FA, fuesen de bajo costo y fácil administración, siendo que se busca una estrategia de vacunación masiva y que permita diferenciar fácilmente animales vacunados de infectados. Para ello, se han investigado diferentes tipos de vacunación alternativa que se describen en posteriores secciones.

1.4. Organización genómica y proteínas codificadas por el VFA

El genoma del VFA tiene una organización básica similar a otros miembros de la familia Picornaviridae. El ácido ribonucleico (ARN) viral es traducido en un único marco abierto de lectura que resulta en una poliproteína, la cual luego de una serie de clivajes proteolíticos postraduccionales da origen a los productos intermedios y finalmente a las proteínas maduras, tanto capsidales como no capsidales (Grubman et al., 1984; Robertson et al., 1985; Rueckert and Wimmer, 1984). Además de la región codificante, el genoma presenta regiones 5’ y 3’ no codificantes. (5´UTR y 3´UTR) (Fig1).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

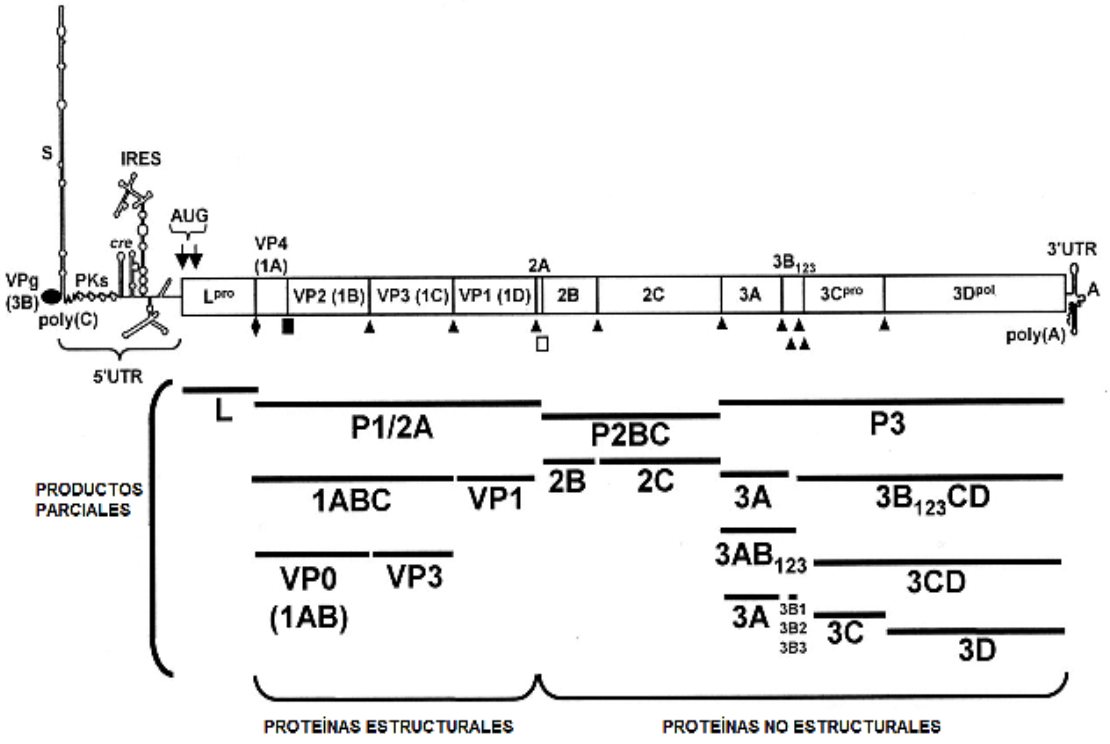


Fig. 1: **Organización genómica del VFA** El marco abierto de lectura se indica como el área rectangular central. Los nombres de las proteínas codificadas en cada sector del segmento codificante están indicados. También se muestran los elementos funcionales del genoma, tales como el IRES en el extremo 5´no traducido y la región 3´no traducida. Los sitios de escisión de las diferentes proteasas se indican con los siguientes símbolos: ♦, proteasa L pro; □, proteasa 2A; ▲, proteasa 3Cpro; ■, proteasa no identificada. (*Adaptado de Grubman y col., 2004*).

El ARN genómico que se muestra en la Fig. 1 es poliadenilado en su extremo 3´ y presenta en el extremo 5' una proteína codificada por él mismo, denominada VPg (*virion protein genome*) que juega un rol importante en la iniciación de la síntesis del ARN viral (Paul et al., 1998; Ferrer-Orta et al., 2006a). La replicación del ARN está catalizada por una ARN polimerasa ARN-dependiente (3D) codificada por la región P3 del genoma. La baja fidelidad de copia de esta proteína es el origen de la variabilidad genética del VFA (Ferrer-Orta et al ., 2006b).

Dentro de la región codificante del ARN genómico, en la porción 5´ se localiza la región Lider (L), que codifica el componente N-terminal de la poliproteína y presenta dos codones de iniciación AUG que resultan en la traducción de las proteínas L (L y L´). Esta proteína tiene actividad de proteasa, que se cliva en su extremo C terminal en una reacción de tipo autocatalítica. A continuación de la región L se encuentra la región P1 que codifica las cuatro proteínas de la cápside del virus (VP4, VP2, VP3 y VP1, también denominadas 1A, 1B, 1C y 1D, respectivamente). El precursor VP0 origina VP4 y VP2, posteriormente a la incorporación del ARN genómico. Luego de la región P1, está la región P2, que codifica tres proteínas no capsidales 2A (que presenta actividad de proteasa y se autocliva de la poliproteína), 2B, y 2C, y por último la región P3, que codifica la proteína 3A, tres copias de VPg (3B), $3C^{pro}$ (proteasa) y $3D^{pol}$ (RNA polimerasa RNA dependiente).

Por otra parte, la cápside proteica del VFA está formada por sesenta copias de los polipéptidos principales denominados VP1, VP2, VP3 y VP4. El peso molecular de VP1, VP2 y VP3 se encuentra entre 27 y 30 kDa, mientras que el de la proteína VP4 está entre 9 y 10 kDa. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 tienen localización externa y la proteína VP4 está miristilada y se localiza completamente en el interior de la cápside (Boothroyd et al., 1982; Curry et al., 1997) (Fig. 2).

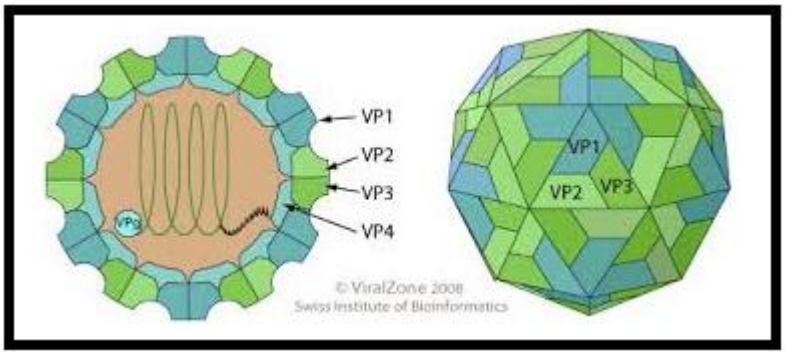


Fig. 2: **Organización estructural de la partícula del VFA** Representación de la estructura tridimensional de la cápside viral con el bucle GH. VP1 (azul), VP2 (verde claro) y VP3 (verde oscuro). http://viralzone.expasy.org/all_by_species/98.html.

En su interior la cápside aloja dos proteínas minoritarias VP0, precursor de VP2 y VP4 de 40 kDa (Woude, 1972) y la polimerasa viral 3D de 52 kDa (Sangar et al., 1976). Las proteínas VP1, VP2 y VP3 adoptan una configuración espacial muy semejante (Acharya et al., 1989). Durante el ensamblaje de la partícula viral, una copia de VP1, una de VP0 y una de VP3 se agrupan para formar un protómero; cinco protómeros se agrupan a su vez, formando un pentámero (Curry et al., 1997). Estos pentámeros con coeficiente de sedimentación 12S, se denominan unidades 12S y forman las caras del icosaedro (Burroughs et al., 1971). Doce pentámeros se asocian con una molécula de ARN para formar la cara externa de la partícula viral (Talbot et al., 1973) (Fig. 2).

1.5. Sitios antigénicos del VFA

De las cuatro proteínas capsidales, VP1 es aquella que exhibe la mayor frecuencia de variabilidad. Esta proteína tiene mucha importancia en la topografía de la superficie viral y también en la antigenicidad, unión a receptores y, probablemente, en el desarmado viral y liberación del ARN luego de la entrada del virus a la célula blanco. Wild y Brown en 1967 determinaron que la antigenicidad del VFA se reduce enormemente si el virus es tratado con tripsina, y que la única proteína afectada por este tratamiento es VP1 (Wild and Brown, 1967). Por este motivo se asumió que los epítopes inmunodominantes se encontraban en la secuencia de esta proteína capsidal. Posteriormente, y mediante hidrólisis de VP1 (serotipo O) con bromuro de cianógeno o con enzimas proteolíticas, Stromahier y colaboradores señalaron que las regiones correspondientes a los residuos 146-154 y 200-213 serían las inductoras de acs neutralizantes (Strohmaier et al., 1982). Otro grupo comparó las secuencias aminoacídicas de la proteína VP1 del VFA de varios serotipos europeos y encontraron zonas hipervariables entre los aminoácidos 130-160 y 190-213,

atribuidas a regiones de interacción con acs neutralizantes (Bittle et al., 1982). Estudios posteriores de cristalografía con rayos X demostraron que estas zonas están expuestas sobre la superficie del virión (Acharya et al., 1989). Muchas de las variaciones en la secuencia de VP1 ocurren en los *loops* que conectan las estructuras de láminas β y emergen de la superficie del virión. Se ha demostrado también que sustituciones aminoacídicas puntuales, aún fuera de los sitios antigénicos, afectan la topología de los viriones y llevan a la diversificación antigénica (Feigelstock et al., 1992). En el VFA, el principal sitio antigénico, llamado sitio antigénico A (ASA) es un estrecho segmento de VP1, comprendido por la secuencia aminoacídica 140-160 del *loop* βG - βH que no solo contiene los epítopes más relevantes para la inducción de acs neutralizantes sino que además constituye el sitio de unión a los receptores celulares. La localización de los sitios antigénicos varía según los serotipos y han sido descriptos tanto para la proteína VP1 como para las proteínas estructurales VP2 y VP3 (Kitson et al., 1990)

1.6. Respuesta inmune contra el VFA

El VFA desencadena una rápida respuesta humoral, en animales infectados, caracterizada por altos niveles séricos de acs específicos con actividad neutralizante, los cuales persisten hasta 18 meses pos-infección (Wigdorovitz and Sadir, 1996). Una respuesta inmune específica con la presencia de inmunoglobulina M (IgM) se puede observar entre los 4 y 5 días pos-infección. En bovinos la respuesta por IgG1 predomina sobre la IgG2 (Lavoria et al., 2012). Entre los 7 y 14 días pos-infección se puede observar una buena inmunidad protectora, ya sea en animales que reciben vacunas de alta calidad inmunogénica o infectados. La respuesta es dirigida a los epítopes de las tres proteínas de la cápside externa, lo que explica que la protección por acs es serotipo específica.

La neutralización del virus dentro del animal puede ocurrir por mecanismos similares a los que acontecen en la neutralización *in vitro* (McCullough, et al., 1992), aunque hay sugerencias que los MOs podrían tener una acción clarificadora del virus por mecanismos de opsonización (McCullough et al., 1988; Quattrocchi et al., 2011).

La protección frente a la infección por el VFA ha sido siempre relacionada con la presencia de acs neutralizantes específicos, sin embargo, es posible encontrar animales protegidos con bajos niveles de acs neutralizantes (Sobrino et al., 2001), lo que sugiere que la protección estaría mediada además, por otros componentes del sistema inmune. Por lo cual, se han estudiado en los últimos años, otros parámetros inmunológicos que podrían presentar alguna asociación con la protección.

Eble P.L. y colaboradores reportaron en cerdos que recibieron vacunas con alta concentración de VFA inactivado, que la inducción de IgA presenta correlación con la protección (Eble P.L. et al., 2007). Asimismo, Cubillos C. y colaboradores trabajaron en

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

esta misma especie con una vacuna a péptidos contra aftosa y postulan una correlación entre IgA y la protección inducida (Cubillos C. et al., 2008).

Por otro lado, está descripto que ovejas vacunadas y desafiadas con el VFA presentan interferón gamma (IFNγ) circulante en un nivel que se relaciona con la carga antigénica (Barnett P. V. et al., 2004). Conjuntamente, han sugerido que la respuesta IFNγ sistémica podría ser un indicador de la habilidad de una vacuna VFA de gatillar inmunidad en la que se prevenga la infección subclínica. La producción temprana de IFNγ probablemente se deba a células NK activadas por citoquinas derivadas de MOs como parte de la respuesta inmune innata.

Parida S. y colaboradores encontraron que la combinación del título de acs SN y la producción de IFNγ podría correlacionar mejor con el control de replicación viral en bovinos que sólo los niveles de acs SN ya que si bien estos acs son el principal componente que influye en la protección contra el VFA, la cantidad de IFNγ producida post vacunación correlaciona con la capacidad de los animales vacunados de controlar la replicación viral en faringe luego del desafío (Parida S. et al., 2006). Por otro lado, Lavoria y colaboradoes, plantean que la avidez y la proporción de isotipos específicos contra VFA podrían servir para discriminar animales que están protegidos de los que no lo están (Lavoria et al., 2012).

1.7. Respuesta inmune en el modelo murino

Si bien las diferencias que existen entre los ratones y los hospedadores naturales, en cuanto a forma de infección y curso de la enfermedad, son numerosas, se han podido establecer paralelismos entre el modelo murino y los bovinos (Borca et al., 1986; Borca et al.,1993; Fernandez et al., 1986; Lopez et al., 1990; Piatti et al., 1991; Ostrowski et al., 2007; Zamorano et al., 1998; Dus Santos et al., 2000) como así también entre murinos y cerdos (Eble et al., 2004; Song et al., 2005). La infección por el VFA está descripta y caracterizada en cepas de ratones CH3, *Swiss*, BALB/c y *nude* inoculando el virus por vía intraperitoneal (ip) (Fernandez et al., 1986, Collen et al., 1989). Esta comprende una importante replicación viral en el páncreas mientras que la enfermedad cursa de forma subclínica. Durante las primeras 48-72 h de la infección, se produce una viremia de alto título ~10^5-10^6 DLRL50/ml (dosis letales raton lactante 50%/mililitro), la cual es rápidamente controlada por acs SN (Fernandez et al., 1986). Ante la imposibilidad de producir acs SN, como sucede luego del tratamiento inmunosupresor con ciclofosfamida, los ratones infectados con VFA presentan una viremia persistente, indicando el papel central desempeñado por el sistema inmune adaptativo en el control de esta infección (Borca et al., 1986). Una vez superada la fase aguda de la infección, los títulos séricos de acs SN se mantienen elevados por largos períodos de tiempo (López et al., 1990).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Algunos trabajos indican que la importancia de los acs podría residir más en su capacidad opsonizante que en la neutralizante. Experimentos realizados *in vivo* en el modelo de ratón lactante demostraron que era posible obtener protección inoculando acs monoclonales de moderado título neutralizante previamente al desafío viral y que era la opsonización de los viriones lo que correlacionaba con la protección más que la neutralización de la infectividad (Mc Cullogh et al., 1986). La seroprotección resultaba efectiva solo si se mantenían intactas tanto las porciones Fc (fase constante) de los acs como las funciones de fagocitosis de los ratones inoculados. En este sentido los autores discuten que es probable que la protección observada en este modelo, requiera que los acs opsonicen los viriones para que luego los complejos virus-anticuerpo sean fagocitados. Más tarde este mismo grupo de trabajo (Mc Cullogh et al., 1988) corroboró, utilizando células peritoneales murinas, que la fagocitosis del VFA opsonizado por parte de células que expresan el receptor para el fragmento Fc (FcR), como son los monocitos y los MOs, constituye la defensa inmune efectora más importante en el modelo utilizado.

Por otra parte, el desarrollo de una enfermedad aguda y una infección clínicamente manifiesta producida por VFA en ratones, ha sido descripta por Salguero y colaboradores (Salguero et al., 2005) en las cepas *Swiss*, BALB/c y C57/BL6 infectados experimentalmente con VFA de los serotipos C-S8c1 o SAT-1. La enfermedad se caracteriza clínicamente por apatía, pelo erizado, lomo encorvado y moderada pérdida de peso a las 24 h post infección. Subsiguientemente, se observa sintomatología neurológica, manifestada principalmente por el desarrollo de ataxia del tren posterior. Microscópicamente, se detectan importantes alteraciones en el estrato espinoso en la piel de la almohadilla plantar. En un primer momento se observa degeneración de este estrato de la epidermis, seguido luego de edema intercelular y formación de microvesículas, localizadas fundamentalmente cerca de la membrana basal. Salguero y colaboradores en ratones C57BL/6 infectados con VFA C-S8c1 demostraron que el virus se propaga en casi todos los órganos analizados, causando una infección sistémica (Salguero et al., 2005). Los animales mostraron una linfopenia severa, así como lesiones microscópicas en varios órganos similares a los descritos en los huéspedes naturales.

La infección de ratones adultos con VFA es dependiente de un número de variables, incluyendo la dosis, la vía de inoculación y la genética del ratón. Está descripto que los ratones *Swiss* son menos susceptibles al virus C-S8c1 que los ratones C57BL/6 y los ratones BALB/c. La vía de inoculación es otro determinante importante de los resultados en las infecciones virales (Turner and Moyer., 2002). Las inoculaciones subcutáneas (almohadilla de la pata) y las inoculaciones intraperitoneales de ratones C57BL/6 con VFA fueron letales, aunque la inoculación intraperitoneal causó una muerte más rápida. Este resultado no es sorprendente ya que con la inoculación subcutánea generalmente se

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

produce una replicación más lenta, que puede permitir al hospedador disponer de suficiente tiempo para activar los mecanismos de defensa.

Una diferencia importante entre las vías de infección subcutánea e intraperitoneal que puede explicar las diferencias en el resultado es las poblaciones de células presentadoras de antígenos (CPA) implicadas en la iniciación de la respuesta inmune. Las diferencias en la cinética viral entre las dos rutas de infección puede ser debida a las diferencias en las poblaciones de las CPA o al entorno de citoquinas asociadas con las CDs y los MOs peritoneales (Banchereau et al., 2000; Pulendran et al., 2001).

La inoculación oronasal, sin embargo, no condujo a la muerte en ratones C57BL/6 aunque desarrollaron lesiones microscópicas. La resistencia mostrada por los ratones C57BL/6 al virus cuando son inoculados por vía oronasal se compara con la resistencia que los cerdos muestran a la infección con VFA en aerosol (Alexandersen at al., 2002). Por todo ello, podría ser posible que el virus se propague más lento después de la inoculación oronasal y esto posibilita el control de la replicación viral antes de que el virus cause una infección sistémica.

1.7.1. Diferencias entre animales infectados y vacunados en el modelo murino

Las respuestas contra el VFA infeccioso o inactivado no solo presentan diferencias en la duración de la inmunidad generada, sino que además difieren en la dependencia de colaboración de LT para inducir la producción de acs. Mientras que el virus infeccioso se comporta como un antígeno T independiente, el virus inactivado inoculado a bajas dosis se comporta como un típico antígeno T dependiente, requiriendo de colaboración T para inducir acs (Piatti et al., 1991). En experimentos de transferencia adoptiva de linfocitos a ratones receptores vírgenes irradiados y luego infectados, se observó que la transferencia de LB provenientes de dadores infectados 8 días antes, rápidamente generaba una respuesta neutralizante. Por el contrario, la transferencia de LB provenientes de dadores vacunados con VFA inactivado era incapaz de generar una respuesta de acs SN. En cambio, si conjuntamente con los LB provenientes de animales inmunizados se transferían LT, la respuesta era inducida. De modo que el mecanismo de eliminación del virus continuaba siendo mediado por LB, ya que la transferencia exclusiva de LT no inducía inmunidad. Por lo tanto, cuando se realiza la inmunización con virus inactivado, la inducción de una respuesta de acs SN requiere colaboración T. Por el contrario, la respuesta generada luego de la infección, no precisa de LT para ser inducida (Piatti et al., 1991). Pérez Filgueira y colaboradores han reportado sobre las diferencias cualitativas en el tipo de respuesta inducida por el virus infeccioso e inactivado, también han demostrado que pueden ser evidenciadas por el perfil de isotipos que se produce en cada caso. En ratones infectados, a partir de los siete días post infección (dpi) es posible detectar en

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

suero, además de la IgM neutralizante producida ya desde el tercer dpi, a los isotipos IgG1 e IgG3. Desde el día 14, IgG2a e IgG2b siendo IgG1 e IgG2b los isotipos predominantes a partir de los 14 dpi. Por el contrario, en ratones vacunados con vacunas convencionales (hidróxido de aluminio o emulsión de agua en aceite) IgG1 e IgG2a son los sub-isotipos que predominan, acompañados de bajos niveles de IgG2b. La subclase IgG3 no se detecta en animales vacunados (Perez Filgueira et al., 1995).

Ha sido demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que las CDs juegan un rol fundamental en la respuesta inmune de los murinos hacia el VFA. Ostrowsky y colaboradores demostraron que estas células se infectan de forma abortiva con el VFA, lo que induce una diferenciación hacia un fenotipo macrofágico que resulta en una falla en el desarrollo de la respuesta T dependiente durante la infección aguda. También se demostró que esta falla de las CDs en la estimulación de la respuesta T está asociada con la producción de IL10. La inhibición de la respuesta T por IL10 está caracterizada (De Waal Malefyt et al., 1998) y ha sido reportada en otras infecciones virales (Granelli et al., 2004).

Los autores discuten que la respuesta de acs contra el VFA infeccioso parece proceder en dos fases. En la fase temprana, durante la primer semana de infección, se desarrolla una producción rápida, T independiente, de acs SN los cuales son suficientes para eliminar el virus en aproximadamente 3 días. Seis días luego de la infección, se produce la segunda fase de la respuesta inmune que depende de colaboración T. Como resultado de esta segunda fase se produce la secreción de acs por largos períodos de tiempo, el cambio del isotipo de los acs y se establece la memoria inmunológica. Por el contrario el VFA inactivado estimula a las CDs para producir una respuesta de acs de tipo T dependiente.

En 2007, Ostrowsky y colaboradores, demostraron que la modulación de las CDs mediada por el VFA infeccioso, es clave para el desarrollo de la respuesta inmune temprana contra el virus, dado que son estas CDs infectadas las que estimulan a los LB de la zona marginal (ZM) del bazo, para producir los acs de forma T independiente (Ostrowsky et al., 2007). También reportaron que el principal órgano donde tiene lugar esta producción de acs, es el bazo mientras que los nódulos linfáticos no participan de forma alguna (Langellotti et al., 2014).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2. Vacunas contra VFA

2.1. Vacunas tradicionales.

La primera fuente de antígeno viral utilizado como vacuna contra el VFA, conocida como vacuna Schmidt-Waldman, fue obtenida de lesiones linguales de bovinos infectados. En 1951, ésta fue reemplazada por una vacuna que contenía a un antígeno producido *in vitro* a gran escala en cultivos primarios del epitelio lingual bovino (Frenkel et al., 1947). Las partículas virales eran cosechadas, clarificadas, filtradas, inactivadas con formaldehído y adsorbidas con hidróxido de aluminio. El sistema presentaba ventajas importantes como la simpleza de su ejecución, los altos y constantes niveles de producción de antígeno viral y no requería adaptación del virus al cultivo celular. Este método fue rápidamente comercializado en Francia y Argentina, y facilitó la introducción de programas generales de vacunación en muchos países europeos (Rosenbusch et al., 1948). A partir de 1960 comenzaron a desarrollarse métodos de producción de virus en cultivos celulares. Inicialmente, se utilizaron cultivos primarios de riñón bovino o porcino que fueron reemplazados más tarde por cultivos de células de riñón de hámster, *Baby Hamster Kidney Cells-21* (BHK-21) clon 13, crecidas en monocapa o en suspensión (Radlett et al., 1985). Otras líneas celulares han sido adaptadas para el crecimiento en suspensión y son eficientes productoras de VFA; entre ellas se conocen las líneas de células de riñón de cerdo (IBRS2), de células de pulmón de hamster (HmLu) y de células de embrión de hámster (NIL2).

2.2 . Vacuna para FA usada actualmente

En la actualidad, los antígenos virales utilizados en las vacunas contra VFA, se producen a escala industrial en células BHK-21, cultivadas en suspensión. Los sobrenadantes de los cultivos se clarifican por filtración para eliminar restos celulares y se concentran por precipitación del virus con polietilenglicol (PEG) o por ultrafiltración. Originalmente, el virus era inactivado con formaldehído. Sin embargo, la inactivación a través de este tratamiento presentaba el riesgo de permanencia de actividad infectiva residual y de pérdida de potencial inmunizante de la preparación. En la actualidad es obligatoria la utilización de inactivantes de primer orden como las aziridinas. La inactivación del VFA se realiza usualmente por tratamiento con etilenimina (EI) en la forma de etilenimina binaria (BEI) (Bahnemann et al., 1975; Doel and David, 1984).

La integridad de las partículas 140S es crucial para la eficacia de las vacunas. El medio ambiente altamente heterogéneo que constituyen los lisados vacúnales, favorece la degradación de las partículas y la aglomeración. Incluso un aumento en la temperatura por

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

sobre los 15ºC, lleva a la ruptura progresiva de las mismas, generando partículas 12S (pentámeros de VP1, VP2 y VP3) con muy baja actividad inmunogénica.

El virus inactivado posee baja inmunogenicidad por lo que se utilizan sustancias adyuvantes que actúan como vehículos y como inmunoestimuladores. Las primeras vacunas que se emplearon se preparaban a partir de soluciones acuosas formuladas con saponina e hidróxido de aluminio. Sin embargo, los animales vacunados con las vacunas acuosas resultaban protegidos por un período de cuatro meses. Posteriormente, se utilizaron adyuvantes oleosos lo que significó el alcance de estados de protección más duraderos.

En nuestro país vacunas oleosas se formulan con mezclas de aceites minerales. Debido al sistema de liberación lenta del antígeno inactivado las emulsiones oleosas brindan mayores niveles de inmunidad duradera y efectiva (Spath et al., 1995), permitiendo espaciar hasta 12 meses las re-vacunaciones.

Existen algunos inconvenientes asociados a la producción de las vacunas antiaftosa inactivadas:

- El alto costo de producción en contención de bioseguridad NBS3 A.
- La naturaleza misma del proceso de inactivación viral, a escala industrial, no descarta completamente la existencia de infectividad residual en las diferentes partidas de vacunas comerciales, y la potencialidad de originar nuevos focos a partir de los mismos animales vacunados (Brown et al., 1993), o de escapes de las plantas productoras.
- La necesidad ineludible de mantener una cadena de frío para conservar la estabilidad de la vacuna, ya que un aumento de la temperatura lleva a la fragmentación de las partículas 140S, las que son imprescindibles para lograr una respuesta protectora.
- La composición química indefinida en cuanto al contenido del antígeno vacunal y la presencia de contaminantes celulares, relacionado en algunos casos, con shocks anafilácticos en los animales vacunados (Barteling and Vreeswijk, 1991).
- En muchos casos puede resultar difícil diferenciar entre los animales infectados naturalmente y aquellos vacunados, ya que éstos últimos también pueden adquirir proteínas no estructurales, como parte de los contaminantes del lisado de células infectadas.
- La necesidad de incluir más de una cepa de cada serotipo, ya que en la mayoría de los casos no ofrecen protección cruzada
- Estas vacunas inactivadas brindan un corto tiempo de salvaguarda, obligando a realizar esquemas periódicos de vacunación (Doel et al., 2003).

Debido a estas desventajas de las vacunas convencionales y a que la enfermedad no ha sido aún erradicada en el mundo, se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar vacunas alternativas contra el VFA.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2.3. Diferentes estrategias para el desarrollo de vacunas contra el VFA

2.3.1. Vacunas a subunidades proteicas o a subunidades peptídicas o extractos de plantas que contienen el ADN que codifican para proteínas del VFA

Esta estrategia consiste en la inoculación de proteínas inmunogénicas producidas por técnicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante. Se utilizan proteínas relevantes, desde el punto de vista inmunológico, abriendo la posibilidad de contar con vacunas químicamente definidas, que faciliten además la diferenciación inequívoca entre animales vacunados e infectados. Inicialmente se pensó que el virus inactivado podía reemplazarse directamente por la proteína VP1, (Strohmaier et al., 1982), producida en grandes cantidades en un sistema heterólogo de expresión. Por otro lado, Broekhuijsen y colaboradores desarrollaron proteínas de fusión con una o múltiples copias de determinantes antigénicos de VFA del serotipo O (aminoácidos 137-152 y 199-213) insertadas en el extremo amino terminal de la β-galactosidasa de E.coli. En este caso, la presencia de dos o cuatro copias en tándem, indujo una respuesta protectora en cobayos. (Broekhuijsen et al., 1986). Sin embargo, en otro trabajo realizado por Huang y col. (Huang, 2000), en el cual se inocularon bovinos con una proteína recombinante de fusión, conteniendo el gen de la β-galactosidasa y repeticiones en tándem del epítope principal de VFA (ASA o equivalente), solamente se indujo una protección parcial.

Asimismo, se han evaluado vacunas compuestas por extractos de hojas transformadas de Arabidopsis thaliana que expresan la proteína VP1. En este trabajo, se vio que dicha vacuna indujo una respuesta protectora frente a la exposición del virus en los ratones vacunados (Carrillo et al., 1998). Se han reportado estudios similares donde se utilizan extractos de plantas de papas que contiene en su ADN el transgén VP1 (Carrillo C et al., 2001) o plantas de alfalfa que tienen en su ADN los transgenes P1 y 3C (Dus Santos MJ., et al 2005) alcanzado una respuesta protectora de los animales vacunados en ambos casos. El último trabajo reportado, utilizando esta técnica es el trabajo de Wang (Wang et al 2012), en éste infectaron plantas de arroz con agrobacterium, el cual contiene ADN que codifica para la poliproteína P12A3C del VFA, luego se inmunizaron ratones vía intraperitoneal (ip) y oral con el extracto proteico de la planta de arroz. Con este procedimiento se logró inducir en los animales una respuesta en acs SN específicos contra VFA capaz de eliminar totalmente el virus en los ratones desafiados con VFA cuando se los inmunizó por la vía ip y en forma parcial cuando se los inmunizó por la vía oral.

Por otra parte, para incrementar la respuesta inmune inducida por este tipo de vacunación se utilizaron *nano-beads* dirigidas a las CDs (Deanne et al., 2008) y nano-partículas de oro como *carrier* de péptidos antigénicos (Chen et al., 2010). De esta forma se logró incrementar la respuesta inmune humoral y celular en ovejas y la respuesta humoral en ratones, respectivamente.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Por último, se han desarrollado péptidos dendriméricos que contienen epítopes B y T del VFA, (Cubillos et al., 2008; Blanco et al., 2013). En el trabajo del grupo de Cubillos, se inmunizaron vía intramuscular cerdos con un péptido dendrimérico que contenía una copia de un epítope T (3A 21 a 35) y 4 copias de un epítope B (VP1 136 a 154). En estos animales no se observó que desarrollaran signos clínicos después del desafío con VFA ni replicación del virus en vía sistémica o vía de mucosas ni hubo transmisión por contacto a cerdos no infectados. Por otra parte, el grupo de la Dra. Blanco estudió la relevancia de la multivalencia de los epítopes B en los péptidos, inmunizando a ratones con péptidos dendriméricos que contenían 2 copias (B2T) o 4 copias (B4T) del epítope B, resultando que el B2T induce en los ratones una similar o mejor respuesta inmune específica que el B4T. Además, en este estudio se encontró que es importante para la respuesta inmune la posición del epítope T en el péptido dendrimérico.

2.3.2. Partículas similares a Virus de la Fiebre Aftosa (VLP)

Durante la infección viral es posible aislar partículas vacías enteras, en diferente proporción según la cepa (Rweyemamu et al., 1979). Las cápsides vacías naturales son capaces de unirse a células susceptibles y han demostrado ser capaces de inducir acs neutralizantes (Rowlands et al., 1975; Rweyemamu et al., 1979).

Las VLPs (Partículas similares a Virus de la Fiebre Aftosa) son partículas no patógenas que tienen características estructurales y antigenicidad similar al virus parental, son similares en conformación a viriones intactos y están formados por el auto-ensamblaje de las proteínas de la cápside procesadas. Un factor crítico de las vacunas VLPs contra VFA es la capacidad de procesar la poliproteína de la cápside viral (P1) en productos escindidos que luego pueden ensamblarse en VLP. Por otro parte, han sido estudiados diferentes caminos de procesamiento de proteínas para la inclusión de proteínas virales no estructurales 2A, 2B y proteinasa 3C (Grubman MJ et al., 2003; Mayr G A et al., 1999; Pena L et al., 2008). Existen varios sistemas de expresión para la producción de VLPs, incluyendo:

• Varias líneas celulares de mamíferos que han sido transfectadas o transducidas ya sea de forma transitoria o estable con vectores de expresión virales (Ren X et al., 2009; Li J, et al., 2008; Migniaqui et al., 2013)

• El baculovirus / células de insectos y sistemas de larvas (Li Z et al., 2010; Cao et al., 2009; Li Z et al., 2008; Ruiz et al., 2014)

• Varias especies de levaduras incluyendo *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastori* (Balamurugan V et al., 2003)

• *Escherischia coli* y otras bacterias (Li YG et al., 2007; Bachrach et al., 1975; Vidal et al., 1991).

A continuación se describen algunos ejemplos:

Utilizando una plataforma que utiliza levaduras se desarrolló una vacuna experimental formulada con VLP contra la FA expresada en *Pichia pastori.* Con esta vacuna, se indujo en cobayos una respuesta humoral con producción de acs SN y protección frente al desafío con virus homólogo (Balamurugan et al., 2003). Asimismo, para mejorar las respuestas inmunes mediadas por células en ratones y la seroneutralización inducidas por este tipo de vacuna, se utilizó la co-expresión de adyuvantes moleculares como la citoquina bovina recombinante IFNγ (Shi et al., 2006), IL-18 (Shi XJ et al., 2007) o HSP-70 (Shi XJ et al., 2007) junto con las cápsides.

Las vacunas que utilizan VLPs experimentales derivadas de baculovirus contra el VFA han inducido en cerdos una cierta protección contra la enfermedad clínica, pero no lograron proteger frente a la replicación viral. Por otro lado en vacas, se han reportado 2 trabajos de vacunas VLPs expresadas en baculovirus, el de Li (Li et al., 2010) y el de Subramanian (Subramanian et al., 2012). En el primer estudio, se inmunizaron vacas con una vacuna a VLP que contenía las secuencias de la cápside y la proteína 3C del VFA del serotipo de AsiaI/HNK/CHA/05. En estos animales se observó una respuesta protectora frente a un virus homólogo a los 28 días post vacunación. En el segundo trabajo, se vacunaron vacas con VLPs que contienen la poliproteína P1 del serotipo O1 de Malasia junto al adyuvante ISA 206. Esta vacunación indujo en el ganado un valor PD50 (Prueba Dosis media de Protección) de 5.01 y la mayoría de los animales exhibieron títulos de acs SN después de 2 inmunizaciones. Por último, en el 2013 se reportó un trabajo en el que utilizaban este sistema de expresión para una vacuna VLP (O/IND/R2/75), que tenía la proteína 3C mutada para aumentar la producción de la proteína. Esta vacuna fue evaluada en cobayos, induciendo en estos animales una repuesta protectora en la que el 70 % de los cobayos estaban protegidos frente al desafío con VFA (Bhat et al., 2013).

Con respecto a la expresión de VLPs en células de mamíferos, en un trabajo se utilizó como sistema de expresión a células de mamíferos crecidas en suspensión sin suero para las VLPs de A2001. Éstas VLPs fueron inoculadas en ratones induciendo en estos una respuesta protectora total frente al desafío viral. (Mignaqui et al., 2013)

Por otro lado, se ha desarrollado un sistema de expresión que fusiona epítopes inmunogénicos a la proteína del core de la hepatitis B. Esta última tiene la capacidad de autoensamblarse en partículas de 27nm cuando son expresadas en *E. coli*. Estas partículas estables se purifican y son altamente inmunogénicas en animales de laboratorio. Este sistema de expresión fue empleado para fusionar la región inmunogénica principal del VFA (aminoácidos 142-160 de la proteína VP1 del serotipo O1 Kaufbeuren) al extremo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

amino terminal de la mencionada proteína del *core* de la hepatitis B. Se reportó que la inmunogenicidad obtenida por estas VLPs fue semejante a la producida por las partículas intactas del VFA (Clarke et al., 1987).

2.3.3. Plataformas con vectores virales

Los vectores virales han sido utilizados con éxito para transferir secuencias que codifican para las proteínas de la cápside del VFA en animales. Hay varios ejemplos de vectores virales incluyendo *Herpes virus* (pseudo rabia), poxvirus y vectores adeno-virus. Sin embargo, la plataforma mejor documentada y más eficaz es el adenovirus hAd5-FA. Estas vacunas contra el VFA fueron ampliamente probadas y se ha demostrado que pueden ser tan eficaces como la vacuna inactivada contra el VFA (Moraes et al., 2002; Pacheco et al., 2005). Se están desarrollando protocolos para la producción escalable de esta vacuna molecular antiaftosa para obtener la licencia, aprobación y disponibilidad por parte del Departamento de Agricultura de EEUU para incluirla a la Reserva Veterinaria Nacional de ese país (Grubman MJ et al., 2010). Estos nuevos candidatos de vacuna molecular antiaftosa están siendo actualmente fabricados en lotes experimentales y probados en el ganado en el territorio continental de Estados Unidos como parte del proceso para la obtención de la autorización por los organismos de regulación veterinario (Grubman MJ et al., 2010).

Por otra parte, en estos últimos años se han evaluado otros tipos de virus para ser usados como *carriers*: el virus de la enfermedad hemorrágica de conejo (RHDV), que indujo en cerdos inoculados por vía intramuscular con esta vacuna junto con el adyuvante ISA 206 una respuesta a acs IgG e IgA específica contra VFA y secreción de IFNγ (Crisci et al., 2012) y el virus de la viruela caprina que si bien en ratones inmunizados con esta vacuna se obtuvieron altos títulos de acs SN no fue efectiva en ovejas (Ma et al., 2014).

2.3.4. Vacunas a microorganismos vivos modificados

El desarrollo de vacunas a microorganismos vivos atenuadas contra la FA ha tenido un éxito limitado debido a varios factores: que la atenuación sea incompleta y reversible, a que la atenuación sea efectiva en una especie y en la otra no (por ejemplo, atenuada en bovinos, pero no en porcinos), o a que las vacunas fueron incapaces de inducir una respuestas inmunes protectora consistente (Mowat GNet al., 1962; Mowat GN et al., 1969; Brown CC et al., 1996). Sin embargo, el advenimiento de las nuevas tecnologías, como el desarrollo de sistemas de ADN copia (ADNc) y de genética reversa para el VFA proporciona nuevas oportunidades para la identificación de determinantes de virulencia en el genoma del VFA. A medida que se identifiquen nuevos factores determinantes de virulencia, surgirán nuevas posibilidades para las vacunas atenuadas. Para ello, se

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

necesitará la comprensión detallada de la interacción virus-huésped y de los mecanismos de patogénesis, con el fin de abordar las preocupaciones sobre la atenuación completa en todas las especies susceptibles, e incluso eliminando la posibilidad de reversión a la virulencia.

2.3.5. Vacuna contra el VFA derivada de una plataforma de ADNc modificado

Las vacunas contra el VFA derivada de una plataforma de ADNc modificado se basa en la utilización de ADNc del VFA que no contiene la secuencia L (secuencia líder de la proteinasa) la cual está implicada en la patogénesis del VFA "*in vivo*". Este ADNc ha sido tomado como una plataforma segura para la producción de vacunas atenuadas (Piccone et al., 1995; Mason et al., 1997; Chinsangaram et al., 1998). En un estudio piloto, esta plataforma viral ha demostrado ser completamente atenuada en el ganado en base a la ausencia de lesiones en la lengua luego de la inoculación directa en bovinos susceptibles (Mason PWet al., 1997). Más recientemente, se ha mejorado mediante la adición de sitios de enzimas de restricción para el rápido intercambio de la secuencias de la cápside y también para la supresión de epítopes específicos de las proteínas no estructurales (NSP) 3B y 3D, lo que permite las pruebas serológicas DIVA (ELISA que discrimina entre animales infectados de los vacunados) (Uddowla S .et al., 2012).

Uno de los últimos trabajos reportado que ha utilizado esta plataforma fue el de Segundo (Segundo et al., 2012). En este estudio se ha evaluado en cerdos una vacuna atenuada, en la cual se mutó un dominio conservado de la proteína L, evitando que la proteína sea retenida en el núcleo de las células de los animales vacunados y la degradación del factor nuclear_κB. Los cerdos inmunizados con esta vacuna no tuvieron signos clínicos de la enfermedad, ni viremia frente al desafío viral.

3. Vacuna génica

3.1. Respuesta inmune inducida por las vacunas a ADN

Las vacunas de ADN tienen una gama de beneficios con respecto a las preparaciones de las vacunas convencionales. Este tipo de vacuna no son infecciosas, tienen buena estabilidad térmica y son fáciles de manipular (Gurunathan et al., 2000), permiten la incorporación de los genes marcadores y la co-expresión de múltiples antígenos. Además, entre las principales ventajas de la inmunización con ADN son la simplicidad de la administración, la producción en masa rápida y barata, y la facilidad de preparación (Liu and Ulmer, 2005).

La inmunización con ADN plasmídico que codifica un antígeno inmunogénico representa un nuevo y prometedor método en la investigación en el desarrollo de vacunas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Un número de estudios han demostrado que después de la inmunización con ADN desnudo, el antígeno expresado es naturalmente procesado y presentado a los LT en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y de clase II, induciendo una amplia gama de respuestas inmunes, incluyendo la producción de acs y la activación de los LT citotóxicos CD8 y de los LT *helper* CD4 (Donnelly et al., 1997; Feltquate et al., 1997; Somasundaram et al., 1999). Asimismo, la vacunación con ADN induce la respuesta inmune innata (Yankauckas MA et al., 1993; Klinman DM et al., 2004).

Las vacunas de ADN pueden administrarse usando 3 diferentes mecanismos físicos; la inoculación por aguja; pistola de genes (biobalística, un dispositivo utilizado para la propulsión del ADN unido a partículas de oro, las cuales ingresan directamente en las células vivas), técnica por la cual el ADN ingresa directamente en el citoplasma de las células y la electroporación, mecanismo en el cual se crean poros temporales en las membranas celulares para permitir que el ADN pueda pasar al citoplasma. De estas 3 técnicas la inoculación por aguja es la más versátil y económica y menos dañina para los animales. En este trabajo, se eligió este mecanismo de inoculación, en forma intradérmica. Se cree que el ADN inoculado con aguja por esta vía es tomado por las células de la piel, a través de endocitosis mediada por macropinocitosis dependiente de proteoglicano. Una vez ingresado el ADN en la célula, este entra en el núcleo por medio de un complejo de poros nucleares que permite el transporte selectivo de macromoléculas en ambos sentidos, en el núcleo se produce el ARNm, el cual es transportado al citoplasma, en donde se inicia la traducción a proteína. Posteriormente, en muchos casos el antígeno puede ser secretado desde las células de la piel o puede ser liberado desde células muertas que han expresado el antígeno. Luego, el antígeno secretado o liberado es tomado por las CDs; procesado y presentado por moléculas del MHCII (respuesta T *helper*) (Elnekabe et al., 2011). Alternativamente, si el antígeno es expresado directamente en las CDs, éste puede ser procesado intracelularmente y presentado por el MHCI (respuesta-T Citotóxica). Después, las señales estimuladoras inducidas por la inyección en sí misma y por el plásmido, generan la maduración de las CDs de la piel, y su migración a los nódulos linfáticos (NLs) en los siguientes días-semanas. En los nódulos linfáticos las CDs que presentan a los antígenos por la vía del MHCII, estimulan y activan a los LT *helper* CD4 y las que presentan a los antígenos por la vía del MHCI, estimulan y activan a los LT CD8+. Además, en los NLs se estimulan y activan los LB. Por otro lado, cuando los LT CD4 activados interactúan con los LB, se secretan citoquinas y las moléculas coestimuladoras de los LT CD4 interactúan con los receptores de LB. (Elnekabe et al., 2011) (Fig. 3).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

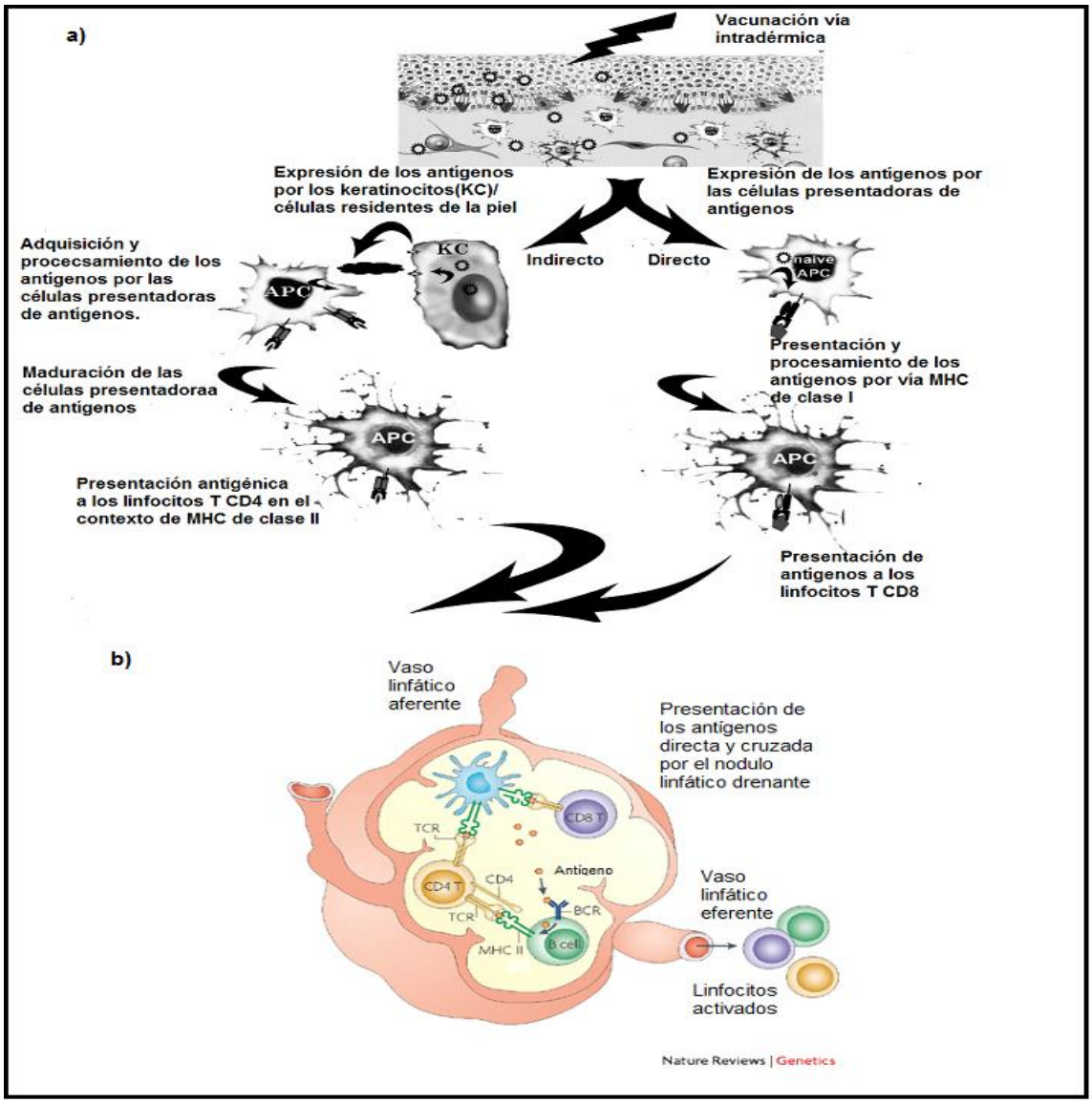


Fig. 3: Mecanismos inmunológicos desencadenados por la inoculación de los plásmidos por vía intradérmica. a) Presentación antigénica. Dibujo extraído de http://www.intechopen.com/books/melanoma-from-early-detection-to-treatment/recombinant-dna-technology-in-emerging-modalities-for-melanoma-immunotherapy. b) Activación de los linfocitos en el nódulo linfático. Dibujo adaptado del trabajo Michele et al., 2008.

En estudios recientes, a través de técnicas inmunológicas y nuevos modelos de ratones se ha facilitado el estudio *in vivo* que ha provisto de una nueva visión en el desarrollo y la funcionalidad de las CDs. Estos estudios demostraron que las CDs de la dermis (CDd), tanto las CD de Langerhans (CL) como las CD derivadas de tejido median la presentación antigénica o la transferencia de antígenos a CDs residentes de los nódulos linfáticos (CD-LN) para la presentación antigénica. Además, se ha identificado una nueva subpoblación de CDd que expresan langerina (CD-ln+), un receptor que se pensaba que sólo se expresaba en CL. Las CL y las CD-ln+ tienen diferencias en las capacidades migratorias y funcionales. Bajo condiciones inflamatorias las células CD-ln+ migran rápidamente a los NLs y residen en la paracorteza con el fin de presentar a los antígenos a

las LT. Por otro lado, las CL arriban a los NLs más gradualmente y su acumulación máxima puede ser encontrada a los 2-4 días posteriores. Este patrón de la migración apoya el concepto de que las CD-ln+ en lugar de las CL de la epidermis son las CPAs clave en la generación de LT específicas de antígeno. Además de las CDs, los queratinocitos localizados en la epidermis pueden facilitar la discriminación entre una sustancia inocua a una sustancia peligrosa. Los queratinocitos expresan receptor tipo toll (TLR) 9 endosómico, que puede reconocer las secuencias no metiladas CpG estimuladoras presentes en el plásmido de ADN. La activación de estos TLR-dependiente de los queratinocitos promueve la producción de interferones de tipo I y el desarrollo de respuestas inmunes de tipo Th1. Los queratinocitos también pueden ser inducidos a producir diversas citoquinas, entre ellas IL1, que desempeña un papel importante en la activación de LT y los CD.

Por otra parte, Elnekave y colaboradores han reportado que durante los primeros días postinmunización con una vacuna génica, las CDsd que fueron transfectadas de forma directa presentan eficientemente el antígeno a los LT CD4 y a los LT CD8 del NL al tener la capacidad de presentación cruzada; subsiguientemente, con un ligero retraso, se produce la presentación directa por las CD Ln+ (CDs langerinas +) estimulando mayormente a los LT CD8 vírgenes. Luego, las CD residente de los NL, activadas por las CDd, mantienen su capacidad de estimular a los mencionados LT; sin embargo la contribución de esta presentación tardía frente a la activación total de los LT CD8 es mínima (Elnekave et al., 2011) (Fig. 4).

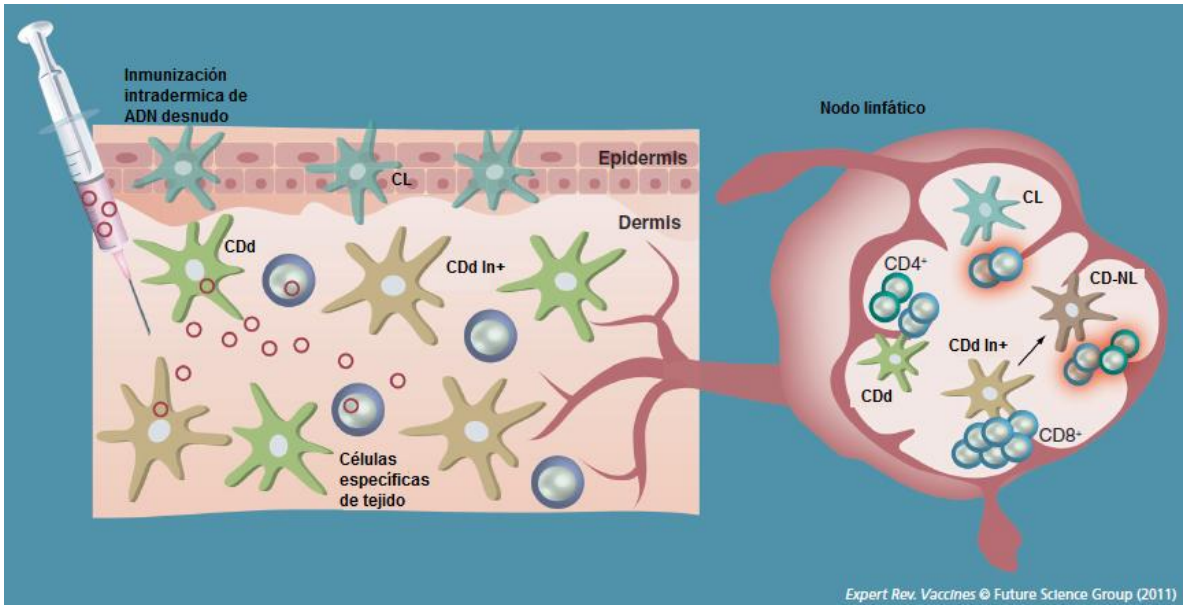


Fig. 4: Células involucradas en la inmunización intradérmica. Extraído de Elnekave et al 2011

3.2. Vacunas génicas veterinarias

Por otro lado, los primeros estudios de vacunación génica examinaron la eficacia de ésta en modelos de animales pequeños contra patógenos humanos importantes tales como el virus de la inmunodeficencia humana (VIH) (Wang et al., 1993) virus de la hepatitis (He et al., 1997; Schirmbeck et al., 1995), virus del herpes (Ghias H et al., 1995; McClements WL et al., 1996), el virus de la influenza (Robinson HL et al., 1993; Ulmer JG et al., 1993; Webster RG, Fuller DH et al., 1993; Fynan EF et al 1993; Montgomery DL et al 1993) y el virus del sarampión (Fooks et al., 1996). La ventaja de hacer estudios preliminares en estos animales, hizo que la investigación de este tipo de vacuna, progresara rápidamente al campo de las vacunas veterinarias. En la década de 1990, se iniciaron los primeros estudios sobre vacunas génicas contra influenza aviar A (H7N7) (Robinson HL et al., 1993; Fynan EF et al., 1993) y el virus del herpes bovino de tipo 1 (Cox GJ et al., 1993). De hecho, en esa década surgió una gran cantidad de candidatas a vacunas veterinarias, dirigidas a más de 30 virus animales, pero el progreso en la concesión de licencias y comercialización de vacunas de ADN es lento, y por eso a pesar de los más de 20 años de investigación, sólo hay cuatro vacunas de ADN veterinarios patentados: para el virus del Nilo Occidental en equinos (West Nile Innovator®, Fort Dodge) (Davidson AH, et al., 2005), el virus de la necrosis hematopoyética en el salmón (APEX®-NHI, Novartis) (Garver KA et al., 2005), una vacuna génica contra el melanoma en los perros (ONCEPTO ™ Canine Melanoma Vacuna Merial) (Bergman PJ et al., 2006) y una vacuna génica que contiene un vector que codifica para una hormona de crecimiento para cerdas en edad de reproducción (GHRH LifeTide® SW 5), la cual permite una disminución significativa de la mortalidad y morbilidad perinatal, lo que resulta en un aumento en la productividad de cerdas y el número de crías por cerda (Khan et al., 2005).

3.3. Vacunación génica contra VFA

Las vacunas génicas contra VFA se ha estudiado en ratones, cobayos, cerdos desde finales de 1980 (Brown F. et al 1987, Brown F. et al 1992) y en vacas desde el 2005 (Jin et al., 2005) evaluando la respuesta inmune humoral, celular y protectora.

Con respecto a las vacunas génicas contra VFA estudiadas en ratón o cobayos, se ha evaluado la respuesta inmune estimulada por plásmidos que codifican para la proteína VP1 (debido a sus antigenicidad y características previamente descriptas) y por plásmidos que codifican para la poliproteína P1. Ambos plásmidos, solos o con adyuvantes, indujeron respuestas inmunes celulares y humorales específicas contra el virus y con algunas se ha alcanzado la protección frente al desafío en los animales vacunados. De esta forma se demuestra que ambos son buenos antígenos para ser utilizados como vacuna génica contra el VFA.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Con el fin de potenciar la respuesta inducida por las vacunas a ADN se han incorporado a la formulación vacunal, adyuvantes moleculares. En estudios realizados en ratón o cobayo, se ha probado la vacuna génica contra VFA combinada con: IL1 (Shao et al., 2005); IL2 (Zhang et al., 2008); IL6 o TNF alfa (Su et al., 2008); IL9 (Zou et al., 2010); IL18 (Xia et al., 2007), IL15 (Wang et al., 2008), OX40L (Xia et al., 2007), CD40L (Xiu et al., 2010), GMCSF (Sedeh et al., 2012) y la conjunción de varias citoquinas (Su et al., 2012). Todos estos adyuvantes moleculares, si bien han incrementado la respuesta humoral y celular de la vacunación génica que contienen vectores que codifican para VP1 o P1 o epítopes del VFA, en ninguno de estos trabajos se describe una respuesta protectora total en ratón o cobayo frente a un desafío viral.

Además, en un reporte se han evaluado diferentes adyuvantes químicos como buvicaine, Tween 80, levamisole, una formulación salina y etanol (Jin et al., 2004). Solo el levamisole estimuló una respuesta tipo LT colaboradores tipo1 (Th1), incrementando los niveles de IFNγ más de 100 veces comparada con la solución salina.

Por otro lado, en estos animales se han evaluado otras alternativas para aumentar la respuesta inmune inducida, mejorando la entrega *(delivery)* de la vacuna a ADN mediante la inmunización vía electroporación (Kim et al., 2006); o el recubrimiento con polientelilglicol (PLG) (Choudary et al., 2008); o mediante la adsorción del ADN a macropartículas catiónicas (Jadav et al., 2011) o a nanopartículas (Joyappa et al., 2009), también se utilizaron el ADN junto a partículas de quitosano y a una proteína de membrana de *Salmonella typhimurium*, que se utilizó como ligando de TLR (Nanda RK et al., 2014) . En todas estas investigaciones, se ha logrado incrementar la respuesta protectora, siendo relevante que en el trabajo reportado por Joyappa (Joyyapa et al., 2009) y en el de Namada (Namada et al., 2014) las vacunas indujeron una respuesta protectora total frente al desafío viral.

Además, de mejorar el *delivery* del ADN, se ha evaluado la estrategia de la inmunización *prime-boost* para mejorar la respuesta inmune humoral y celular inducida por la vacunación génica (Shieh et al., 2001; Bae et al., 2009).

Con respecto a las vacunas génicas contra VFA evaluadas en vacas, existen pocos trabajos. Jin y colaboradores estudiaron la respuesta inmune generada por una vacunación con una vacuna génica con un vector que codifica para VP1 de VFA y utilizando como refuerzo al antígeno inactivado 146S del VFA induciendo un incremento en la respuesta humoral y celular (Jin et al., 2005). Naranjam y colaboradores en el 2011, describieron la respuesta inducida por un vector que codifica para la replicasa del virus *Sindbis* bajo el promotor CMV, la cual permite que el ADN se pueda replicar sin usar la replicasa de las células de los animales inmunizados. Asimismo P1 del VFA, fue clonada bajo un promotor subgenómico y río arriba una secuencia no traducible (UTR) del VFA para aumentar los niveles de expresión del gen clonado. Esta vacuna sorprendentemente

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

indujo en las vacas una inmunosupresión en el título de Ac SN contra VFA (Naranjam et al., 2011)

En bovinos también se evaluó la respuesta inmune inducida por una vacunación *prime-boost,* adicionando con el factor de crecimiento de MOs (GM-CSF), utilizando el mecanismo de electroporación y recubriendo el ADN con macropartículas de PLG (poly-lactido co-glycolido) para mejorar el *delivery* del ADN. Se utilizó para sensibilizar (*prime)* un vector pCDNA3.1 que codifica para P1-2A 3C 3D y el refuerzo (*booster*) fue con VFAi y la proteína no estructural 3D. El 75% de las vacas inmunizadas con este tipo de vacunación estuvieron protegidas frente a un desafío viral. (Fowler et al., 2012)

Asimismo en ovinos, se ha reportado un trabajo similar en el que se observo una protección total, inoculando un plásmido que codifica para P12A3CD junto con otro que codificaba GM-CSF y utilizando PLG para mejorar la transfección (Niborski et al., 2006)

Con respecto a las vacunas génicas contra VFA evaluadas en cerdos se ha descripto diferentes trabajos que se muestran en la tabla 1.

Vacuna génica (proteínas o péptidos codificadas por los plásmidos)	**Delivery**	**Dosis**	**Vía**	**Desafío viral por:**	**Protección**	**Referencia**
Construcción que implica a todo el genoma del virus menos el sitio de unión al receptor de células	ADN desnudo	200 µg x 4 (semanas 0,2,4,8)	Im	Contacto directo (7dpuv)	Parcial	Ward et al 1997
Construcción que implica a todo el genoma del virus menos el sitio de unión al receptor de células	ADN desnudo	200 µg x 4 (semanas 0,2,4,8)	Id Oreja	Contacto directo (7dpuv)	Parcial	Ward et al., 1997
P12A3C plus intron	Gene gun	3µg x 4 (semanas 0,3,5,8)	INP	Contacto directo (28dpuv)	No	Beard et al.,1990
P12A3C	Gene gun	3µg x 4 (semanas 0,3,5,8)	INP	Contacto directo (28dpuv)	No	Beard et al., 1990
Secuencia de VP1 (141-160 y 200-213) fusionada con su propia IgG (pCEIS)	Gene gun	1µg x 2 (semanas 0,4)	Id Oreja	$50ID_{50}$ en el cuello (10dpuv)	Total	Wong et al., 2000
VP1 de O1 Gehure combinada con VP1 de Asia Shamir y 3C	Gene gun	5µg x 2 (semanas 0,3)	INP	50IU en el rodeo coronario (23dpuv)	No	Benvenisti et al., 2001
P12A3CD y EMCV IRES	Gene gun	5µg x 2 (semanas 0,3)	INP	50IU en el rodeo coronario (23dpuv)	Parcial	Benvenisti et al., 2001

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

P12A3CD y pGMCSF	ADN desnudo	300µg de P12A3CD y 200 µg de pGMCSF x 3 (semanas 0,3,6)	Im, Id Oreja	$10^{5,5}$ $TCID_{50}$ en el rodeo coronario (18-20 dpuv)	Total	Cedillo-Barron et al., 2001
P12A3CD	ADN desnudo	300µg de P12A3CD (semanas 0,3,6)	Im, Id Oreja	$10^{5,5}$ $TCID_{50}$ en el rodeo coronario (18-20 dpuv)	Parcial	Cedillo-Barron et al., 2001
Secuencia de VP1 (141-160 y 200-213)(pCEIS) y IL2 (pIL2S)	ADN desnudo	200µg de cada uno de los vectores x2 (semanas 0,4)	Im muslo	$50ID_{50}$ en el cuello (10dpuv)	Total	Wong et al., 2002
Secuencia de VP1 (141-160 y 200-213) fusionada con su propia IgG (pCEIS)	ADN desnudo	200µg de cada uno de los vectores x2 (semanas 0,4)	Im muslo	$50ID_{50}$ en el cuello (10dpuv)	Total	Wong et al., 2002
P12A3C-IL-18-3C	ADN desnudo	500µg x2 (semanas 0,2)	Im	$1000ID_{50}$ vía im (10dpuv)	Parcial	Mingxiao et al., 2007
Secuencia de VP1 (143-160 y 200-213) y la proteína 2A o la ·3D junto a pGM-CSF	ADN desnudo	300µg de los plásmido que codifica para los antígenos y 200 µg de pGM-CSF x 3 (semanas 0,3,6)	Im, Id Oreja	$10^{5,5}$ $TCID_{50}$ en el rodeo coronario (18-20 dpuv)	No	Cedillo-Barron et al., 2003
Secuencia de VP1 (141-160 y 200-213) transportada en la proteína núcleo del virus de la hepatitis B	ADN desnudo	200µg x2 (semanas 0,2)	Im muslo	50IU vía im (14dpuv)	Parcial	Chen et al., 2005
P12A3CD y pGMCSF+ refuerzo con 3D y refuerzo con proteína	ADN desnudo	400µg de cada plásmido x2 (semanas 0,3), 20ug de 3A y 7,5ug de la proteína	Im,	$10^{5,5}$ $TCID_{50}$ en el rodeo coronario (18-20 dpuv)	Total	Li et al., 2008
Secuencia de VP1 (133-156) y de VP4 (20-34) y de la proteína (11-40)	ADN desnudo	400µg x 3 (semanas 0,3,6)	Im, Id Oreja	10^{4} PFU en el bulbo del talón (21 dpuv)	No	Ganges et al., 2011
Secuencia de VP1 (133-156) y de VP4 (20-34) y de la proteína (11-40) más	ADN desnudo	400µg x 3 (semanas 0,3,6)	Im, Id Oreja	10^{4} PFU en el rodeo coronario	No	Ganges et al., 2011

péptido señal				(21 dpuv)		
Secuencia de VP1 (133-156) y de VP4 (20-34) y de la proteína (11-40) + monoclonal 1F2de ratón	ADN desnudo	400µg x 3 (semanas 0,2,4)	INP	10^{4} PFU en el rodeo coronario (15 dpuv)	Parcial	Borrego et al., 2011
P12A3C	ADN desnudo	500µg x2 (semanas 0,2)	Im	$1000ID_{50}$ vía im (10dpuv)	Parcial	Mingxiao et al., 2007

Tabla 1. Estrategia de vacunación génica contra el VFA en cerdos. Tabla extraída del trabajo de Fowler et al 2012. GM-CSF:Factor de estimulación de colonias de granulocitos-MOs; Id:intradérmica; ID 50: Dosis infectiva 50%; Im :intramuscularM INP: Información no provista; IU: Unidades Infecciosas; PFU: Unidades formadoras de placas; pGM-CSF: GM-VSF porcino; PLG: poly-lactido co-glycolido; TCID50: Dosis infectiva de cultivo 50%; dpuv: Días post última vacunación

4. Adyuvantes

4.1. Clasificación de los adyuvantes

Los adyuvantes han sido utilizados para mejorar la eficacia de vacunas contra distintos antígenos, desde 1920 (Lewis et al., 1924). A medida que el conocimiento en el campo de la inmunología crece, el diseño de vacunas se vuelve más racional, intentando que éstas sean más específicas, protectoras, duraderas y seguras. Según Cox y Coulter (1997) los modos de acción de los adyuvantes pueden ser (Cox and Coulter 1997):

Inmunomodulación: Se refiere a la capacidad de modificar el espectro de citoquinas. De esta forma la selección del inmunomodulador apropiado puede aumentar la respuesta inmune, determinar el isotipo de inmunoglobulina y modular la respuesta hacia un perfil Th1 o LT colaboradores tipo 2 (Th2). Los ejemplos más conocidos son las sales de Aluminio, que producen un cambio de casi el 90% hacia el subtipo Th2 (Mancino et al., 1980) y las endotoxinas bacterianas y derivados que inducen predominantemente una respuesta de tipo Th1 (Johnson et al., 1990).

Presentación: se refiere a la capacidad del adyuvante de preservar la integridad conformacional del antígeno y de presentarlo a las células efectoras apropiadas. Así se puede lograr maximizar la cantidad y afinidad de acs y se puede influenciar la duración de la respuesta inmune.

Inducción de respuesta T citotóxica (CTL): La inducción de este tipo de respuesta generalmente requiere que el antígeno sea procesado de forma endógena. Para que un adyuvante sea útil en la inducción de CTL, debe facilitar la incorporación/persistencia del antígeno en el complejo MHC. Esto puede lograrse si el adyuvante interactúa de alguna forma con las membranas celulares y el antígeno asociado se deposita en el citoplasma

celular. Asimismo un adyuvante que provoque aumento de IFN□ dará como consecuencia un aumento en la expresión de moléculas MHC I (Macatonia et al., 1989).

Direccionamiento: se define como la capacidad del adyuvante de entregar el inmunógeno a células inmunes efectoras, generalmente presentadoras. Existen varias formas en que un adyuvante pueda lograr esto: (1) interactuar con el antígeno formando agregados multimoléculares que pueden aumentar la captura del antígeno por parte de CDs y MOs (por ejemplo adyuvantes "particulados") (Eldridge et al., 1990). (2) La inclusión de moléculas superficie que pueden ser reconocidas por receptores (por ejemplo las saponinas), o el pegado del antígeno a polímeros de manosa u otros carbohidratos, pueden aumentar la captura del antígeno por parte de CDs (Jiang et al., 1995).

Generación de depósitos: los depósitos pueden ser de corto o largo plazo. Los primeros atrapan el antígeno en el sitio de inyección y no permiten que este sea eliminado por el hígado, es el caso de las sales de Aluminio y las emulsiones agua/aceite. Los segundos producen una entrega del antígeno en pulsos, a medida que el agente que retiene el antígeno se va degradando. Es el caso de las microesferas de PEG (Eldridge et al., 1990). Dado que la vacunación es un proceso por el cual se instruye al sistema inmune del hospedador para que elimine de forma eficaz al patógeno contra el cual se está vacunando, a la hora de elegir un adyuvante se debe tener en cuenta, el tipo de antígeno que se incluirá en la vacuna (inactivado, atenuado, recombinante, etc.) y el tipo de respuesta inmune necesaria para eliminar al agente patógeno. Por otro lado, debido a que la respuesta inmune que inducen las vacunas génicas es baja, se ha estudiado a diferentes adyuvantes que cumplen con las caracteristicas descriptas para incrementar esta respuesta. Uno de las más populares estrategias estudiadas son la adición de plásmidos que codifican para proteínas inmunomoduladoras. Estos plásmidos ingresan en las células de la zona vacunada y en estas células se expesan las proteinas inmunomoduladoras que luego actuán en las CPA locales y en las células del nódulo linfatico drenante más cercano (Tabla 2).

Vacuna Génica contra	Vía	Modelo animal	Efecto del adyuvante	Referencia
IL2				
HIV	im	Ratón	Incremento significante de la respuesta inmune celular y humoral	Moore et al., 2002
			Incremento de la proliferación de los LT *helper*	Kim JJ et al., 1998
	im	Macaco *rhesus*	Incremento de la respuesta inmune humoral	Kim J.J et al., 2000
			Incremento de la repuesta inmune mediada por las LT	Kim JJ et al., 2001
SHIV	Im ó	Macaco	Incremento de la repuesta protectora	Berley et

	in	*rhesus*		al., 2004
IL12				
HIV	Im ó Im+EP	Macaco *rhesus*	La coinmunizaciòn aumentó la respuesta inmune celular y esta respuesta incremento aún más con la aplicación EP	Hirao L.A. et al., 2008
H1N1	im	Ratón	Respuesta inmune basada en Ig2a solo en infantes. Incremento de la producción de IFNγ en esplenocitos de ratones adultos e infantes reestimulados	Pertmer et al., 2001
GM-CSF				
SHIV	Id ó im	Macaco *rhesus*	Incremento de los acs SN, maduración de la avidez de los acs anti-Env, lo cual estuvo correlacionado con el incremento de la respuesta protectora	Robinson HL et al., 2006
H1N1	epidermal	Macaco *Rhesus*	Incremento de la respuesta inmune humoral y celular en suero y superficie de mucosas (tracto respiratorio y en el intestino)	Loudon et al., 2010
IL15				
HIV	Im, topico	Ratón	Beneficio a la respuesta inmune humoral y la respuesta de los LT CD8 de larga duración	Li W et al., 2008
			Incremento de la respuesta inmune de las LT CD8 de memoria	Kutzler Ma et al., 2005
Influenza	im	Ratón	Incremento de la respuesta inmune de las LT CD8 de memoria y de la respuesta protectora	Kutzler Ma et al., 2005
HVBV	Gene gun	Ratón	Incremento de la estimulación de la respuesta inmune citotóxica	Kwissa et al., 2003
	im		Incremento de la respuesta inmune de los LT CD8	Zhang et al., 2006
HSV	im	Ratón	Incremento de la respuesta inmune de los LT CD8 de memoria. Incremento de la respuesta protectora	Toka F.N. et al., 2005
Brucella Abortus	im	Ratón	Incremento de la respuesta inmune humoral y de la respuesta celular tipo TH1. Aumento de la respuesta protectora	Hu XD et al., 2010
CD40 ó CD40L				
HBV	Im,	Ratón	Incremento de la respuesta a acs	Xu H et al., 2010
HIV	im	Ratón	Incremento de la respuesta inmune de los LT CD8+	Stone G W et al., 2006

Tabla 2. Ejemplos de vacunás genicas que codifican para adyuvantes moleculares. Tabla extraída de Saade et al., 2012

Por otro lado, los adyuvantes poliméricos han sido estudiados para aumentar la respuesta inmune de la vacunación génica debido a sus caracteristicas ya que este tipo adyuvante permite una mejor transfección a las células y la liberación del antígeno en pulso, incrementando la presencia del antígeno en la zona de inoculación.

En este trabajo de tesis se utilizarán adyuvantes moléculares y un adyuvante polimérico, los cuales serán descriptos en la siguiente sección.

4.2 Adyuvantes moleculares

4.2.1 CD40L/RANKL

La molécula CD40L, es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF-SF), se expresa principalmente como una molécula coestimuladora en la superficie de las LT activadas, particularmente en los LT CD4 + (Grewal IS, et al., 1997; van Kooten et al., 2000; Clarke., 2000). Al igual que otros miembros TNF-SF, CD40L se ha demostrado que es crucial para la expansión y la supervivencia de los LT, B y CDs durante las fases iniciales de la respuesta inmune (Quezada SA et al., 2004; Sugamura K et al., 2004; Borrow et al., 1998; Bachmann MF et al., 2004; Hernandez MG et al., 2007).

Esta molécula coestimuladora es esencial para la inmunidad celular y humoral. CD40L es importante en el desarrollo de respuestas de tipo Th1 (Balasa et al., 1997; Cella et al., 1996) y en la producción de acs y el *switching* de los mismos (Borrow et al., 1996.; Oxenius et al., 1996). Participa en la activación de los LT, de las CDs y en las interacciones de LT–MO (Yang et al., 1996.). Además, es fundamental para la interacción productiva entre los LT y las CPA (Grewal and Flavell, 1997; Laman et al., 1996; Ramshaw et al., 1997; Van Kooten and Banchereau, 1997; Ewenstein et al., 2000; Bennett et al., 1998). La importancia de CD40L en las respuestas inmunes anti-virales fue demostrada en estudios que examinaron la respuesta contra adenovirus en ratones mutantes para CD40L. En estos animales se observó una disminución de la activación de los LT CD4+ y la reducción de la expresión de las citoquinas IL4, IL10, e IFNγ (Bennett, S. R et al., 1998). La importancia de la expresión de CD40L tanto para respuestas inmunes de los LB como de los LT también se demostró en un trabajo en donde ratones mutantes defectuosos en CD40L fueron desafiados con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) (Borrow et al., 1996; Oxenius et al., 1996); estos animales eran capaces de generar respuestas primarias de linfocitos T citotóxicos (CTL), pero presentaron una respuesta defectuosa de CTL de memoria.

Se ha demostrado que la interacción CD40-CD40L tiene un papel importante en la generación y promoción de las respuestas inmunes en el hospedador, es un medio potencial de manipulación y mejora de la inmunidad inducida por la vacuna. Varios estudios han demostrado la eficacia de CD40L exógena como un adyuvante de la vacuna para promover el aumento de LT y la producción de citoquinas, y para polarizar las respuestas inmunes celulares y humorales hacia una fenotipo Th1 (Lin F et al., 2009; Manoj S et al., 2004; Tripp RA et al., 2000; Yao Qet al., 2010; Cao J et al 2010).

Por otro lado la molécula RANK-L tiene similitud funcional a CD40L.También es un miembro de la familia TNF, que está implicado en la regulación del sistema inmune y posteriormente también en la homeostasis ósea (Bachmann, M. F et al., 1999). RANK-L se expresa en los LT activados y el mayor blanco para RANKL en el sistema inmunológico son las CD que expresan un alto nivel de RANK (Wong, B. R et al., 1997, Anderson DM. et al., 1997). La interacción RANK-L / RANK es crítico para la activación de los linfocitos independientes de CD40L (Bachmann et al., 1999). La unión de RANKL a su receptor

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

induce la producción de citoquinas proinflamatorias, tales como IL1 e IL6, que promueven la estimulación y diferenciación de los LT (Josien et al., 1999; M.F. Bachmann et al., 1999). Asimismo, se ha observado que la coinoculación de RANKL con un vector que expresa el epítope TSSA del *Trypanosoma cruzi*, aumenta la respuesta inmune estimulando LT CD8 específicos contra los parásitos en el modelo murino (Miyahira et al., 2003).

4.2.2 Interleuquina 15 (IL15)

Está bien descripto que la IL15 en los mamíferos tiene un papel importante en el desarrollo de los LT CD4, y en la proliferación y diferenciación de los LB (Huntington et al., 2009; Lauwerys et al., 2000). La IL15 es una citoquinas que puede afectar tanto a la respuesta inmune innata como a la adaptativa y tiene una capacidad adyuvante demostrada para el diseño de vacuna contra el cáncer (Waldmann, 2006). Esta citoquina comparte algunas propiedades con la IL2, incluyendo la potente estimulación de la proliferación de las LT, células NK y de las células NKT (Becker et al., 2002; Oh et al., 2003).

La IL15 es uno de las llamadas citoquinas 'homeostáticas', que es beneficiosa para la supervivencia a largo plazo de los LT de memoria. Como ya se mencionó, las funciones de la IL15 son similares a las de la IL2, aunque estas dos citoquinas no tienen homología estructural. La IL15 es sintetizada por muchos tipos de células, incluyendo monocitos, MOs, células epiteliales y CDs, pero no se expresa en los LT.

Esta interluquina ha sido elegida como un adyuvante prometedor para las vacunas de ADN (Calarota and Weiner, 2004; Lori et al., 2006) ya que mejora la proliferación y longevidad de los LT de memoria CD8+ o CD4+ a través de la regulación de moléculas anti-apoptóticas (Boyer et al., 2007;. Kutzler et al., 2005; Lin et al., 2005; Oh et al., 2008;. Picker et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Estas características, se han visto manifestadas en vacunas contra HIV-1, en las que un vector que expresan IL15 aumentó la respuesta inmune celular y humoral contra este virus en ratones (Li W et al., 2008) e incrementó los LT CD8 de memoria (Li W et al., 2008; Calarota SA et al., 2008). El incremento de este tipo de respuesta después de la coinmunización con IL15, también ha sido observado en ratones vacunados con vectores que codifican para la proteína trans-sialidasa del *Trypanosoma cruzi* (Saade and Petrovsky et al., 2012). Además, esta citoquina activa a las células citotóxicas en animales vacunados con la vacuna génica que codifica para el antígeno de superficie de la hepatitis B (Kwissa et al., 2003) e incrementa la longevidad de la respuesta de los LT CD8 en respuesta a esta vacuna génica (Zhang et al., 2006). Por otro lado, se ha observado que IL15 aumenta la vida media de las LT CD8 y la protección mediada por una vacuna génica contra influenza (Kutzler et al., 2005). También se observó que esta interluquina ha aumentado la respuesta celular, humoral y protectora mediada por una vacuna contra la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Brucella abortus (Hu XD et al., 2010). Asimismo, se ha visto que inyectando vía intranasal un vector que expresa IL15 junto con una vacuna que codifica para la glicoproteína del HSV en ratones, se logra aumentar la respuesta humoral, la repuesta inmune de los LT CD8 y la protección contra el desafío viral (Toka FN et al., 2005).

Se ha observado, también que IL15 aumenta la respuesta de mucosas y sistémica contra aftosa inducida en ratones por una vacuna génica que codifica para VP1 inoculada vía intranasal (Wang X et al., 2008).

4.3 Adyuvante polimérico

Los polímeros son de gran utilidad en diferentes técnicas de biotecnológica, así como en aplicaciones biomédicas (descarga de medicamentos, de antígenos, de elementos genéticos modificados), en ingeniería de tejidos, en medicina regenerativa y en la implantación de dispositivos médicos. Los polímeros se utilizan extensamente en inmunología como un adyuvante estimulador o supresor de la respuesta inmune, y son candidatos prometedores para mejorar las respuestas inmunes de antígenos débiles, en el desarrollo de modelos de enfermedad animal. Los polímeros tienen el potencial de ser utilizados como alternativas debido a su eficacia y seguridad, a que mejoran la vida útil de los antígenos y a que son capaces de inducir respuestas de acs de larga duración, así como respuestas inmunes mediadas por células (Shakya et al., 2011).

Por otro lado, los polímeros pueden utilizarse para acoplar inmunomoduladores o ligandos dirigidos a células específicas (Huang et al., 2009;.Chen CH et al., 2012). Además, a diferencia de los adyuvantes convencionales, estas partículas poliméricas son biocompatibles, degradables y son capaces de suministrar antígenos de manera más eficiente. Ellos pueden liberar el antígeno "*in vivo*" de una manera controlada.

Por lo cual, los polímeros como un adyuvante, pueden ser utilizados de manera eficiente para entregar un antígeno y mejorar las respuestas inmunes resultantes. Las propiedades adyuvantes de los polímeros dependen principalmente de sus propiedades extrínsecas e intrínsecas, tales como la química de polímeros, formato, peso molecular, carga y un delicado equilibrio entre la hidrofobicidad e hidrofilicidad.

Asimismo, existen varias preguntas que aún no se han explorado, como los mecanismos de procesamiento y la presentación de antígenos, el tipo de células reclutadas en el sitio de la inyección y la naturaleza de las vías de señalización implicadas en la inducción de respuestas inmunes que involucran a los adyuvantes poliméricos.

En este trabajo se utilizará el adyuvante polimérico MontanideTM ESSAI 952101 (Ady101) que contiene partículas reticuladas de un polímero. Este adyuvante polimérico aumenta y mejora la capacidad de unión del DNA y la potencia de transfección. Además,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

este adyuvante contiene compuestos inmunoestimulantes que reclutan células en el sitio de inyección a través de procesos inflamatorios.

En nuestro laboratorio se ha utilizado este adyuvante para una vacuna génica que codifica para la proteína gD de Herpes Bovino tipo I y se ha observado que el agregado de este adyuvante, incrementa tanto la respuesta humoral como la respuesta citotóxica del antígeno frente al virus (Gamella et al.,2014)

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La modulación de la respuesta inmune inducida por los adyuvantes moleculares CD40L, RANKL e IL15 y el adyuvante químico ESSAI 95201 (Ady101) incluidos en las vacunas génicas que contienen a los plásmidos que codifican para la proteína VP1 o P1 junto a las proteinasas 2A y 3C de la cepa O1 Campos del VFA, permitirá mejorar la respuesta inmune protectora frente al desafío viral. Las moléculas coestimuladoras CD40L y RANKL incrementarían la expansión y la supervivencia de los LT, LB y CDs; además aumentarían la producción de acs y el *switching* de los mismos. La IL15 incrementará la respuesta protectora debido a que estimula la proliferación de los LT y los LB, activa a las células *natural killer* (NK) y a promueve la diferenciación de los LB y la amplificación de los LT de memoria. El Ady 101 mejoraría la transfección *in vivo* de las células en el sitio de inyección y reclutará células proinfalmatorias a través de procesos inflamatorios.

Para evaluar esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Construir los vectores portadores de los genes de los inmunógenos VP1 (pVP1) o P1 junto a las proteinasas 2A y 3C (pP) del VFA.
- Verificar la capacidad de expresión de los vectores que codifican para los antígenos virales y los que codifican para los genes de los adyuvantes moleculares.
- Desarrollar planes de inmunización para evaluar de la capacidad protectora y la respuesta humoral que inducen las diferentes formulaciones vacunales en el modelo murino frente al desafío viral
- Determinar los mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa evocados por la vacuna que resultó más inmunogénica.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Se utilizaron ratones endocriados BALB/c machos provenientes del bioterio de la Universidad de la Plata. Todos los animales tenían entre 8 a 12 semanas de edad. Todas las técnicas aplicadas a los animales fueron avaladas por una Comisión de Ética de INTA Castelar (CICUAE).

2. Líneas celulares

Para la amplificación del VFA, titulación de VFA y para los ensayos de SN se utilizó la línea celular BHK-21 clon 13, (Baby Hamster Kidney) que proviene de riñón de hámster (Mesocricetus auratus) recién nacido (1 día de edad), catálogo de la American Type Culture Collection (ATCC), NºCCL-10 (ATCC, 2012). Estas células han sido certificadas por la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC), como libres de micoplasmas y virus adventicios. Se trabajó con Nº de pasajes celulares entre 86 y 88**.**

3. Virus

La manipulación tanto de los virus activos como de las muestras sospechosas de FA que se utilizaron en las diferentes pruebas diagnósticas se realizaron en Cabinas de Seguridad Biológica Clase II ubicadas en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 4 OIE de INTA Castelar, Provincia de Buenos Aires, que sigue los lineamientos planteados por la OIE para un laboratorio con ese nivel de biocontención.

En los estudios se incluyó la cepa vacunal de referencia O1Campos/Brasil/58 (O1 Campos), utilizándose un segundo pasaje en células BHK-21 proveniente de un pasaje previo en epitelio lingual bovino. La suspensión viral de la cepa vacunal O1Campos utilizada en las diferentes pruebas diagnósticas se conservó fraccionada en criotubos de 1,8ml de capacidad conservados en congeladora a -75ºC.

Para la formulación de las vacunas se utilizó VFAi del serotipo O1 Campos inactivado con Bromoetilamina (BEI) y peleteado con polietilenglicol (PEG), de concentración 216 µg/ml (título 7,21 $x10^{10}$ $DICT_{50}$/ml) gentilmente cedido por la empresa Biogénesis. Para las pruebas de desafío viral se utilizó virus activo del mismo serotipo gentilmente cedido por el Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agropecuaria (SENASA). Este virus proviene de vesículas de bovinos infectados con VFA y ha sido amplificado dos veces sobre la línea celular susceptible BHK-21.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

4. Inmunizaciones

Los ratones fueron vacunados con las distintas formulaciones vacúnales con 0,2 ml por vía id. Todos los animales controles fueron inoculados de la misma forma con solución salina de fosfatos (PBS).

5. Vectores de expresión

5.1. Construcción de pVP1c, pVP1c-CD40L, pVP1c-RANKL

Para la construcción pVP1c, primero se construyó el vector pCI-neo-IRES, utilizando el vector pHSVT, para adicionar el segmento IRES al pCI-neo. Se amplificó la secuencia IRES de pHSVT, agregando los sitios de restricción SaltI y NotI y luego se clonó dicha secuencia en el vector pCI-neo (pCI-neo-IRES). Posteriormente, se levantó por PCR la secuencia de VP1 del VFA desde un vector donado, con los *primers* V (+)TTTAAGCTTATGACCACTTCTGCGGGCGAGTCAG, el cual contiene el sitio de restricción para HindIII y V(-)TGAATTCTTACTGTTTCACCGGTGCCACAATTTT, el cual contiene el sitio de restricción para EcoRI y posteriormente este fragmento fue insertado en el vector pCI-neo-IRES

Con respecto a pVP1c-CD40L, primero se clonó la secuencia de CD40L en el vector pHSV. Para ello, se amplificó la secuencia CD40L desde un vector donado, insertando los sitios de restricción NotI en cada extremo con los primers CD40-LF 5'GCGGCCGCATGGCCATAGAAACATAC3' y CD40-LR 5'GCGGCCGCTCAGAGTTTGAGTAAGCC3' y se introdujo este fragmento en el vector pHSV-T. Luego de verificar el direccionamiento de CD40L, se cortó este vector con las enzimas SalI-NotI y se subclonó en pCI-neo-IRES, generando pCI-neo-IRES-CD40L. Posteriormente, se clonó el fragmento de VP1, como se describió anteriormente, pero en vez de clonarlo en pCI-neo-IRES, se clonó en pCI-neo-IRES-CD40L.

En relación a pVP1c-RANKL se realizó el mismo procedimiento, con la excepción de que el primer paso no se levantó la secuencia de RANKL mediante PCR, sino que se liberó esta secuencia mediante la digestión con NotI.

5.2. Construcción pVP1s

El plásmido pVP1s que codifica para VP1 secretada, se construyó en colaboración con los Drs. Mariano Pérez Filgueira y Oscar Taboga (Instituto de Virología y Biotecnología del CNIA, INTA Castelar). Esta construcción se realizó amplificando la secuencia de VP1 del vector VP1 topo con los siguientes primers V(+)TTTAAGCTTATGACCACTTCTGCGGGCGAGTCAG, el cual contiene el sitio de restricción para HindIII y V(-) TGAATTCTTACTGTTTCACCGGTGCCACAATTTT, el cual

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

contiene el sitio de restricción para EcoRI. Luego, este fragmento fue clonado en el vector pGemT-*easy* (PROMEGA). Posteriormente, se cortó este vector con HindIII y EcoRI y el fragmento cortado fue clonado en pSectag2b. Este vector proporcionó el péptido señal para que la proteína fuese secretada. Por último, se cortó éste con NheI y EcoRI, para ligar este fragmento en pCI-neo y construir pVP1s.

5.3. Construcción pP

La construcción de pP, se levantó la secuencia de la poliroteína P1 junto a las proteinasas 2A y 3C a partir de un vector pBBR[P12A3C] (Romanuti et al., 2013) por PCR con los primers P12AF 5'GCTAGCACCATGGGGGCTGGACAATCC3´ (con el sitio de restricción NheI) y P12AR5'TCTAGATTAGTACCAGGGTTTGGCC3´ (con el sitio de restricción XbaI). Luego, se clonó esta secuencia en el vector pCI-neo-IRES, descripto previamente.

5.4. Vectores que codifican para las moléculas coestimuladoras

El pCD40L, el pRANKL y el pIL15 son plásmidos que codifican para las proteínas CD40L y RANKL y IL15, los cuales fueron cedidos gentilmente por el Dr. Thomas J Kipps (Division of Hematology / Oncology, University of California, San Diego, UCSD, California, USA); el Dr. Hideo Yagita (Department of Immunology; Juntendo University School of Medicine, Tokio, Japón) y el Dr Silvano Ferrini (Instituto Nazionale per la Ricerca Sul Cancro) respectivamente.

6. Caracterización de los plásmidos obtenidos por restricción enzimática y secuenciación

El ADN plasmídico obtenido será transformado en bacterias competentes amplificado por cultivo de las bacterias y purificado usando el *kit* para *miniprep* de Promega. Posteriormente será evaluado con las enzimas de restricción y análisis en geles de agarosa al 0.7% por comparación con un patrón de peso molecular. La secuenciación será efectuada en el servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología del CNIA INTA Castelar.

7. Verificación de la expresión de la proteínas VP1 y de la poliproteína P1 *in vitro* por transfección en células BSR y análisis por Western Blot

7.1. Transfección de los plásmidos en células BSR

La transfección de las células de la línea celular derivada de un clon de BHK-21 (BSR) se hizo utilizando placas de 24 pocillos, por lipofección con el reactivo lipofectin

2000 (Invitrogen) según un protocolo recomendado por el laboratorio que lo produce. Brevemente, las células BSR con una confluencia de entre el 75 y 90% fueron incubadas durante 4 h con el plásmido en presencia del lipofectín 2000 según las proporciones recomendadas por el fabricante. Posteriormente se añadió medio completo con suero fetal bovino (SFB) y se cosechó después de 24 h de incubación a 37° en atmósfera con 5% de CO_2.

7.2. Western Blot

Las células BSR transfectadas fueron lisadas utilizando el *buffer* de lisis y las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12% y transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. Luego de bloqueada la membrana fue incubada con sueros policlonales y acs monoclonales específicos para la proteína VP1 (gentilmente donados por la Dra. Cristina Seki, Seki et al., 2009) y sueros policlonales específicos para las diferentes fracciones de la proteína P1 (anti-VP1 y a-VP3, gentilmente donados por la Dra. Cristina Seki y la Dra. Alejandra D´Antuono, Instituto de César Milstein, CONICET). Después, se incubó con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano (HRP) para ser revelado por quimioluminiscencia con el kit *ECL Western Blotting Detection System, Ge-Amersham*. (Gallagher S et al., 2008).

8. Verificación de la expresión de las moléculas coestimuladoras por citometría

Células BHK fueron tranfectadas con los plásmidos pCD40L y pRANKL con la misma metodología que la utilizada con las células BSR. Luego, las células fueron lavadas con 100 µl de PBS y se resuspendió en el anticuerpo marcado contra CD40L o contra RANKL en *buffer staining* (PBS 1x, 10mM EDTA, 2% SFB) y se incubó 15 min a 4ºC. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con *staining*. Por último, se hicieron 2 lavados con 150 µl por pocillo con el *buffer perm/wash* y se resuspendió en paraformaldheido 0.2%, para luego evaluar las muestras en el citómetro.

9. Verificación de la expresión de IL15 por ELISA

Células BHK fueron tranfectadas con pIL15 con la misma metodología que la utilizada con las células BSR. IL15 fue determinada en los sobrenadantes de cultivos de células BHK transfectadas con pIL15 después de 24h de incubación. Brevemente, placas de ELISA (*Maxisorp*) fueron cubiertas con acs de rata anti IL-15 (eBioscience) diluidos en el buffer de pegada (*Coating buffer* de eBioscience) e incubadas durante una noche a 4°C. Las placas fueron luego lavadas tres veces con PBS y 0.05% Tween 20 (PBST) y

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

bloqueadas con *buffer* de bloqueo (PBS-10% SFB) 1 h a temperatura ambiente (TA). Los sobrenadantes de cultivo y el estándares de la citoquina fue agregado a las placas e incubados durante 2 h a T.A. Luego del lavado se agregó el correspondiente anticuerpo anti-citoquina conjugado con biotina y se incubaron las placas por 1 h a T.A. Luego de lavar se adicionó HRP conjugada con streptavidina durante 1 h a TA. Posteriormente, se volvió a lavar y se agregó el sustrato 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB). La absorbancia a 450 nm fue medida en un espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystems). Las concentraciones de las citoquinas fueron calculadas interpolando las DO obtenidas en una curva realizada en base a las densidades ópticas y concentraciones (en pg/ml) del estándar.

10. Amplificación y purificación de los plásmidos para ser usados como inmunógeno

Amplificación y purificación de los plásmidos: Los plásmidos transformados en bacterias competentes químicas *Escherischia coli* DH5 fueron inoculadas en medio Luria Bertani (lb) para realizar una maxipreparación utilizando el Kit de QIAGEN *Plasmid Giga* (QIAGEN, CA, USA). La calidad de los plásmidos obtenidos fue evaluada por restricción enzimática y análisis en geles de agarosa. La concentración y la pureza se determinó por espectrofotometría a 260 nm y a través de la relación de las absorbancias a 260 nm/280 nm, respectivamente.

11. Desafío en el modelo murino

En este modelo la protección está definida por la presencia o ausencia de viremia (Lopez O et al., 1989; Piatti P.G. et al., 1991; Carrillo C. et al., 1998), considerándose protegidos a aquellos animales que 24 h luego de la infección no presentan viremia.

Para evaluar la presencia de virus en sangre se procedió de la siguiente manera: los ratones vacunados a distintos tiempos fueron infectados con VFA, el título de la alícuota de inoculación fue $10^{4,5}$ $DICT_{50}$/ml para O1Campos. Luego de 24 h fueron anestesiados con Isoflurano (Baxter) y sangrados a blanco por vía retro-orbital. La sangre completa heparinizada de cada animal fue diluida 1:1 con medio Dulbecco´s modified Eagle´s (MEM-D) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) y sembrada por duplicado, sobre monocapas de células BHK-21 crecidas en placa de 96 pocillos. Luego de 40 min en estufa de 37°C y 5%CO_2, las monocapas fueron lavadas tres veces con PBS y se adicionó MEM-D 2% SFB. Las células se mantuvieron en estufa de 37°C y 5%CO_2 por 48 h tiempo luego del cual se procedió a la lectura del efecto citopático. Se consideró al animal no protegido si al menos uno de los duplicados poseía efecto citopático. En cada ensayo se incluyeron animales inoculados con PBS como controles positivos de infección, que

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

resultaron infectados en todos los experimentos de desafío viral mostrados en este trabajo. En todos los casos luego de la infección de los animales se procedió a la titulación de la alícuota utilizada para corroborar el título viral utilizado en cada infección.

12. Titulación viral por el método de punto final

Placas de 96 pocillos fueron sembradas con células BHK-21, a una densidad de 1 x 10^4 células por pocillo. A las 24 h, las monocapas con una confluencia de 80%, fueron enjuagadas con MEM-D libre de suero. Se realizaron diferentes diluciones en base 10 de la muestra a titular (sangre o una alícuota de virus) en MEM-D con 5% de SFB. Se colocaron 100 µl/pocillo de cada dilución por cuadruplicado. La presencia o ausencia de efecto citopático fue evaluada a las 48 h de incubación a 37 ºC en estufa con 5% de CO_2, por observación en microscopio y utilizada para determinar la titulación por punto final por el método de *Reed y Muench* (Reed and Muench, 1938) según la fórmula:

-Log DICT50% / ml = (log A + (log B x Log C) / Volumen del inóculo.

Donde:

A= Log de la dilución anterior al 50%

B= Log de la distancia relativa entre las diluciones que contienen el 50%, calculada como: (% positivo anterior al 50%-50%)/ (%positivo anterior al 50% -% positivo posterior al 50%)

C= Log del factor de dilución**.**

13. Seroneutralización para la determinación de la presencia de acs SN contra el VFA en muestras de sueros murinos

Los sueros fueron primeramente incubados a 56°C durante 30 min para inactivar los componentes del complemento. Posteriormente, los sueros en diluciones seriadas en base 10 en medio MEM-D adicionado con 2% SFB fueron incubados durante 1 h a 37°C con 100 DICT50 de VFA activo por pocillo. Luego, las mezclas VFA-suero fueron transferidas a placas de 96 pocillos conteniendo células BHK-21 en un 80% de confluencia. Tras una incubación de 40 min a 37° C, las mezclas fueron removidas y reemplazadas por medio fresco. La aparición de efecto citopático fue evaluada a las 48 h de incubación a 37° C mediante observación en el microscopio. En cada ensayo se tituló la alícuota de virus utilizada para la SN y un suero control positivo para asegurar que las determinaciones realizadas en diferentes fechas fueron comparables entre sí.

14. ELISA para detección de anti IgG totales e isotipos murinos

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Se utilizó un ELISA captura para la determinación de anti-IgG totales e isotipos murinos. Se cubrieron placas Inmulon II ON a 4°C, con suero anti VFA de conejo diluido a la concentración óptima en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de lavar con PBS *tween* (PBST) se adicionó el virus inactivo a concentración óptima en PBST y se incubó durante 30 min. a 37°C con agitación. Las placas se lavaron con PBST, se bloquearon con buffer PBS *tween*- Ovoalbúmina (PBST-OVA) y se adicionaron los sueros en diluciones seriadas al medio empezando por la dilución 1/40 en buffer de bloqueo. Se incubó *over night* (ON) a 4°C. Se lavaron las placas. Para medir anti IgG totales se adicionó el anticuerpo anti-IgG total conjugado con peroxidasa. Para medir isotipos, se adicionó el anticuerpo anti-isotipo conjugado con biotina en dilución apropiada en PBST 5% suero normal de conejo (SNC). Para ambos ELISAs se incubaron los conjugados 1 h a TA. Luego, para medir isotipo se lavaron las placas y se adicionó Peroxidasa conjugada con estreptoavidina en PBST 5% SNC y se incubó 1 h a TA. Posteriormente, para ambos ELISAs se lavaron las placas y se reveló utilizando o-fenilenediamina (OPD) con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) como sustrato de la peroxidasa. Las placas se leyeron a 490 nm en un lector MR 5000 *microplate*. Se incluyeron controles positivos y sin suero en cada placa. El título de cada suero se calculó como el logaritmo en base 10 de la mayor dilución que supera en DO al punto de corte, siendo el punto de corte la media de la absorbancia de los sueros provenientes de ratones inmunizados con pCI-neo + 2 DS. Para la medición de acs IgA en sueros, se realizo el mismo procedimiento, con la excepción de que se realizo una sola dilución de 1/50 y no se saco punto de corte.

15. ELISA para evaluación de Avidez en murinos

Se sensibilizaron placas Greiner *Bio One HB* ON a 4°C, con suero anti VFA de conejo diluido a la concentración óptima en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de lavar con PBST se adicionó el virus inactivo a concentración óptima en PBST y se incubó durante 30 min a 37°C con agitación. Las placas se lavaron 5 veces con PBS Tween-20 0,05% y se agregó a cada pocillo 50 µl de una dilución 1/50 de los sueros correspondientes, en solución dilución B (50 µl/pocillo), y se incuban las placas 1 h a 37ºC. Al término de esta incubación se realizan 2 lavados con PBS 0,05 %Tween-20 y un lavado de 15 minutos a TA con concentraciones crecientes de urea (1M a 7M) (300 µl /pocillo) y finalmente 2 lavados con PBS 0,05 % Tween-20. Después se agregó 50 µl de una dilución apropiada (1/100) del anticuerpo comercial anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson), y se incubó 1 h a 37ºC, se lavó la microplaca 5 veces con PBS-0,05 %.Tween-20. Por último se reveló la microplaca utilizando como sustrato ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) / H_2O_2 (6 ml / 8 µl por placa de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ELISA), incubando 30 minutos en oscuridad y luego se agregar 50 µl de solución *stop* y se leyó la DO en un lector de ELISA a 405 nm.

16. Obtención de células murinas

Primero, se extrajo el bazo de ratones anestesiados y eutanasiados por dislocación cervical. Luego, las células de bazo se obtuvieron por perfusión del mismo con RPMI 1640. Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min para obtener las células. El *pellet* obtenido fue resuspendido en 10 ml de RPMI 1640 10% SFB adicionado con HEPES (10mM), Aminoácidos no esenciales (100µM), L-Glutamina (2mM), Piruvato (1mM) y β-Mercaptoetanol (5x10-2 mM). Se estableció la viabilidad mediante conteo en cámara de *Neubauer* con el colorante de exclusión *Tripán Blue* o con colorante de *Turk*.

17. ELISA para la determinación de la concentración de IFNγ e IL4 en sobrenadantes de cultivos de células murinas

La concentración de IFNγ e IL4 fue determinada en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos provenientes de animales vacunados, luego de 72 h de incubación co n VFAi o con ConA (Concanavalina A) o incubados solo con medio. Brevemente, placas de ELISA (Maxisorp) fueron cubiertas con acs de rata anti IFNγ o anti-IL4 (eBioscience) diluidos en el buffer de pegada (Coating buffer de eBioscience) e incubadas durante una noche a 4°C. Las placas fueron luego lavadas tres veces con PBS y 0.05% Tween 20 (PBST) y bloqueadas con buffer de bloqueo (PBS-10% SFB) 1 h a T.A. Los sobrenadantes de cultivo y los estándares de cada citoquina fueron agregados a las placas e incubados durante 2h a TA. Luego del lavado se agregó el correspondiente anticuerpo anti-citoquina conjugado con biotina y se incubaron las placas por 1 h a TA. Luego de lavar se adicionó peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con estreptavidina durante 1 h a T.A. Posteriormente se lavó y se agregó el sustrato 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB), se paró la reacción con ácido sulfúrico y se leyó en el espectofotometro (Multiskan EX, Labsystems) a 450. Las concentraciones de las citoquinas fueron calculadas interpolando las DO obtenidas en una curva realizada en base a las densidades ópticas y concentraciones (en pg/ml) de los estándares.

18. Análisis de la expresión de moléculas de superficie de células murinas mediante citometría de flujo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Con el fin de evaluar las poblaciones celulares obtenidas del bazo, fueron utilizados acs monoclonales (acsMo) conjugados con fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) (Becton Dickinson, e-Bioscience).

Las suspensiones celulares (5x105 células/marcación) fueron incubadas con 0,3 µg de los acs indicados, diluidos en PBS a 4°C durante 20 min en una placa 96 fondo en V. Luego, las células fueron lavadas con PBS, resuspendidas en 100 µl de buffer *FACSflow* (Becton Dickinson) y fijadas con 50µl de formaldehido 0,02%. Se utilizaron controles de isotipo como controles negativos de marcación. El análisis fue realizado utilizando un citómetro *FACScan* y *software CellQuest* (BectonDickinson). Para ello se establecieron las regiones de análisis en base a parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) de las diferentes poblaciones celulares. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas en la región de análisis correspondiente o como porcentaje total.

19. Análisis de la expresión de IFN γ intracelular

Primero se sembraron en una placa 96, 1.5 x 10^6 células por pocillo. Después se incubó con brefeldina A 5 h. Luego, se lavaron las células con 100 µl de PBS y se resuspendió en el anticuerpo marcado en *buffer staining* (PBS1x, 10mM EDTA +2%SFB), se agregó 9 µl por pocillos (CD4FITC 0.05mg/ml 0.45ug/pocillo CD8PE 0.01mg/ml 0.09ug/pocillo) y se incubó 15 min a 4ºC. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con *staining*. Después, se agregó 100 µl por pocillo de la solución de fijación y permeabilización (*fix/perm*) del Kit y se dejó incubando 20 min a 4ªC. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con 150 µl por pocillo con el buffer de permeabilización y lavado (*perm/wash*) y se procedió con la marcación intracitoplasmática: resuspendiendo 9 µl por pocillos del anticuerpo anti IFNγ -APC en perm/wash (0.005mg/ml 0.045ug/pocillo) y se dejó incubando 20 min a TA. Por último, se hicieron 2 lavados con 150 µl por pocillo con el buffer perm/wash y se resuspendió en paraformaldheído 0.2%.

20. Análisis estadístico de los datos

Para el estudio estadístico de los datos se utilizó el programa *GraphPad Prisma*. Las diferencias entre los tratamientos se realizaron mediante el test T de *Student*, para comparaciones entre dos tratamientos y ANOVA con un post ANOVA *Dunnet* para comparaciones con más de 2 tratamiento. Un valor de $P<0,05$ fue considerado indicador de diferencias significativas.

21. Medidas de bioseguridad

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Toda manipulación de virus vivo para la reproducción experimental de la enfermedad y la manipulación de virus vivo para la realización de pruebas con murinos fue realizada fue realizada bajo estrictas normas de bioseguridad en el laboratorio de NSB 4 del INTA.

RESULTADOS

1. Construcción de los plásmidos que portan los genes de los antígenos del VFA y de las moléculas coestimuladoras CD40L y RANKL

La vacuna utilizada para controlar el VFA contiene virus inactivo con un adyuvante oleoso. La producción de VFA inactivo (VFAi) requiere un alto costo en instalaciones de contención biológica con un riesgo permanente de fuga del virus (McVicar and Sutmoller, 1969; Brown, 1991). Por lo cual, en los últimos años, se han probado diferentes vacunas alternativas, entre ellas se ha propuesto el uso de vacunas génicas que resultan más seguras y fáciles de producir.

En este trabajo de tesis, se propone como vacuna génica a los vectores plasmídicos que poseen la secuencia que codifica para la proteína VP1 (pVP1) y para la poliproteína P1 junto a las proteinasas 2A y 3C (pP) del VFA.

Las vacunas génicas inducen en general una respuesta inmune débil, es por ello que para incrementarla se han desarrollado diferentes estrategias como el adicionar adyuvantes químicos para su formulación o incorporar genes que codifican moléculas que potencian la respuesta inmune como ser las moléculas co-estimuladoras del receptor T o de ciertas citoquinas.

En este trabajo de investigación se usaron las moléculas coestimuladoras CD40L y RANKL ya que se conoce bien que la interacción de estas moléculas, que se encuentran en LT activados, con los receptores que se expresan en las CPA, inducen a éstas a proliferar, diferenciarse y expresar moléculas accesorias de superficie que facilitan a las CPA la presentación de los péptidos antigénicos.

Por otro lado, se trabajó también con la IL15 ya que está bien reportado que estimula la proliferación de LT y LB; activa a las NK, células NKT y la diferenciación de los LB y la activación de la respuesta de memoria, por otro lado, posee un efecto antiviral similar al de los Interferones (IFNs).

1.1. Construcción de pVP1c, pVP1c-CD40L, pVP1c-RANKL

Los plásmidos pVP1c, pVP1c-CD40L, pVP1c-RANKL, pP fueron construidos en colaboración con la Dra. Alejandra D´Antuono (Instituto Cesar Milstein).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Para la construcción de pVP1c, se utilizó el vector pHSVT, para adicionar el segmento IRES a las construcciones. Primero se amplificó la secuencia IRES de este vector, agregando los sitios de restricción SaltI y NotI y clonando dicha secuencia en el vector pCI-neo, dando como resultado pCI-neo-IRES.

Para la construcción pVP1c, se levantó la secuencia de VP1 de Aftosa por PCR desde un vector que contiene el gen que codifica para la VP1, introduciendo los sitios de restricción EcoRI en cada extremo. Posteriormente, este fragmento fue insertado en el vector pCI-neo-IRES. Mediante el perfil de restricción se corroboró el correcto direccionamiento de esta secuencia (dato no mostrado).

Con respecto a pVP1c-CD40L, primero se clonó la secuencia de CD40L en el vector pHSV-T. Para ello, se amplificó dicha secuencia desde el vector pCD40L, insertando los sitios de restricción NotI en cada extremo y se introdujo este fragmento en el vector pHSV-T. Luego de verificar el direccionamiento de CD40L, se cortó este vector con las enzimas SalI-NotI y se subclonó en pCI-neo, generando pCI-neo-IRES-CD40L. Posteriormente, se clonó el fragmento de VP1, como se describió anteriormente, pero en vez de clonarlo en pCI-neo-IRES, se clonó en pCI-neo-IRES-CD40L (dato no mostrado).

En relación a pVP1c-RANKL se realizó el mismo procedimiento, con la excepción de que en el primer paso no se levantó la secuencia de RANKL mediante PCR, sino que se liberó esta secuencia mediante la digestión con NotI a partir del plásmido pRANKL.

Para corroborar la identidad de estas construcciones se realizó un perfil de restricción de los plásmidos pVP1c, pVP1c-CD40L y pVP1c-RANKL (Fig. 5).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

.

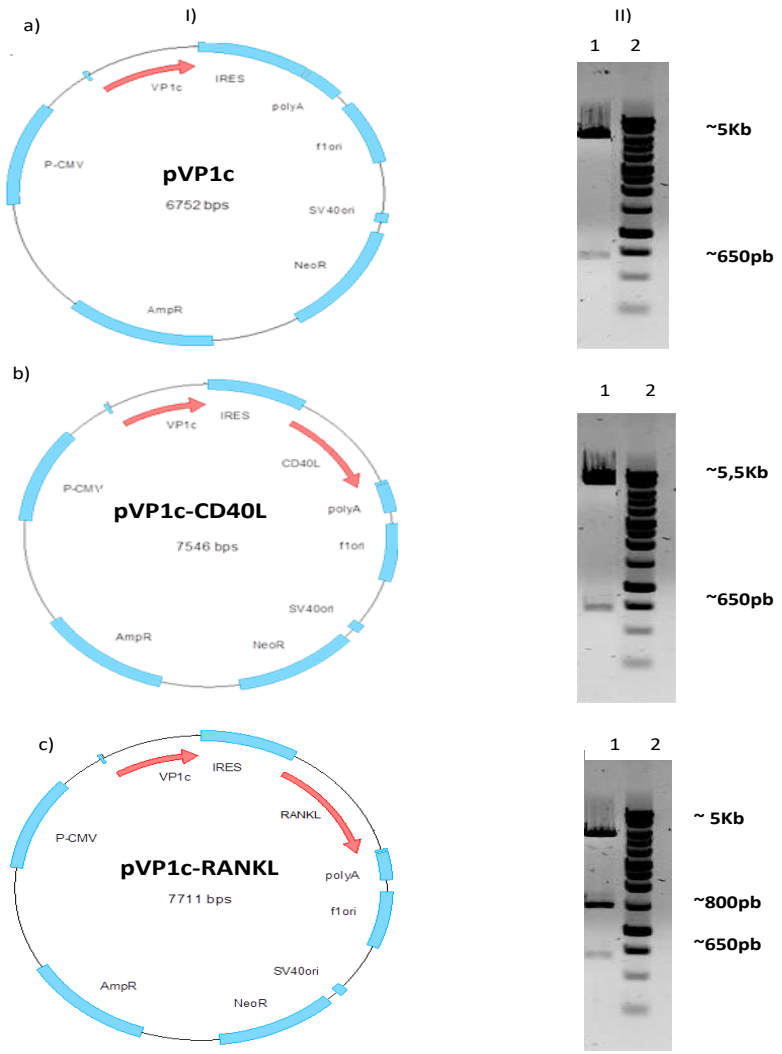


Fig. 5: I) Representación esquemática de los vectores que codifican para pVP1c: II) Electroforesis en gel de agarosa 1% de la digestión con la enzima de restricción EcoRI Calle 1) Perfil de restricción con la enzima EcoRI.
a) pVP1c.
b) pVP1c-CD40L.
c) pVP1c-RANKL.
Calle 2) Marcador de peso molecular, 1KB *Promega*.

En la Fig. 5 se muestra el análisis de restricción con la enzima EcoRI, que confirma la identidad de las construcciones con pVP1c. En el perfil de restricción de la construcción pVP1c, se observan 2 bandas, una de 5kpb (correspondiente al plásmido pCI-neo-IRES) y otra de 650 pb, que corresponde a la secuencia de VP1c. Con respecto a pVP1c-CD40L, también se observa una banda que pertenece a VP1c de 650 pb y otra banda con un PM de aproximadamente 5,5 kb correspondiente a pCI-neo-CD40L IRES. Por último, en el perfil de la construcción de pVP1c-RANKL se observaron 3 bandas, una correspondiente a VP1c y las otras 2 se originan por el corte en el medio de la secuencia de RANKL.

1.2. Construcción de pVP1s

En la Fig. 6 se resumen los diferentes pasos para la construcción del pVP1s

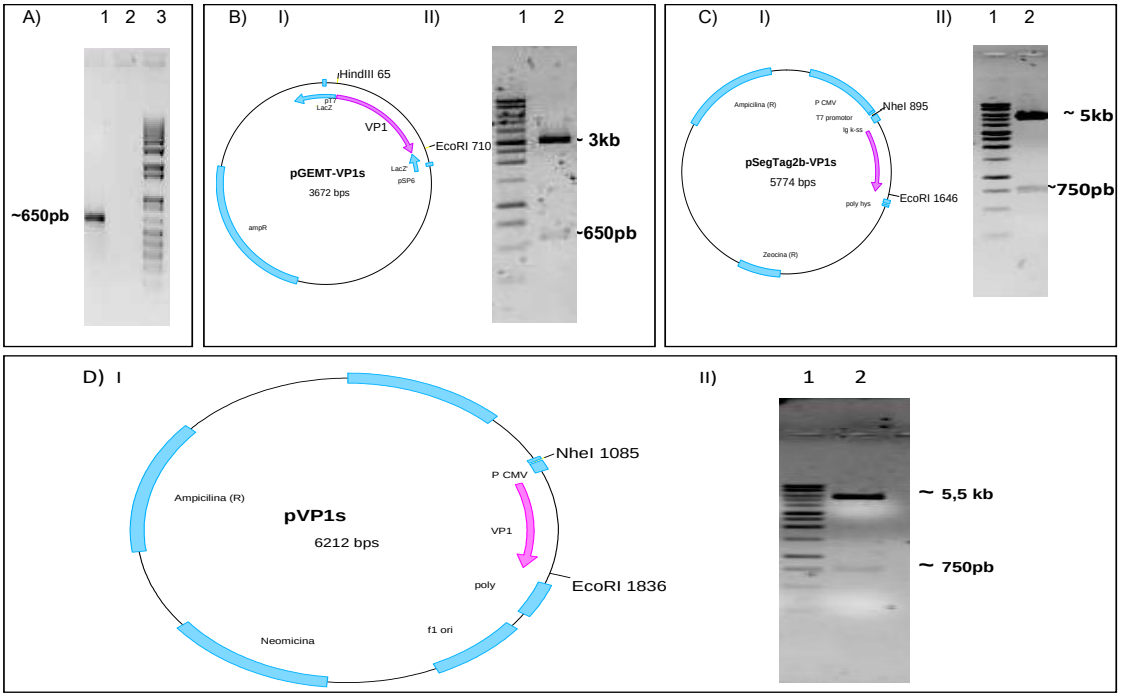


Fig. 6: Construcción de pVP1s:A) Obtención de la secuencia VP1 a partir del plásmido pVP1-TOPO mediante PCR: Gel de electroforesis que muestra el fragmento de PCR de 650pb. Calle1) Fragmento de PCR; Calle 2) Control negativo; Calle 3) Marcador de peso molecular 1KB *Promega.* B) Amplificación de la secuencia VP1 con el plásmido pGEMT-VP1s: I) Esquema del plásmido pGEMT-VP1s y II) Gel de electroforesis. Calle1) Marcador de peso molecular, Calle2) Perfil de restricción con las enzimas HindIII y EcoRI. C) Inserción del péptido señal con el plásmido pSegTag2b: I) Esquema del plásmido pSegTag2b-VP1s y II) Gel de electroforesis. Calle1) Marcador de peso molecular, Calle2) Perfil de restricción con las enzimas NheI y EcoRI. D) Inserción de la secuencia en el plásmido pCI-neo (pVP1s): I) Esquema del plásmido pVP1s y II) Gel de electroforesis. Calle1) Marcador de peso molecular, Calle2) Perfil de restricción con las enzimas NheI y EcoRI.

El primer paso para la construcción de pVP1s fue levantar la secuencia de la proteína VP1 a partir del vector TOPO-VP1 (gentilmente donado por el Dr. Guido Koning) por PCR obteniéndose una banda de 650pb (Fig. 6A), esto se hizo con el fin de clonar pVP1 en el plásmido pSegTag2b y así poder agregarle a ésta, la secuencia de secreción. Se amplificó dicha secuencia, agregando los sitios de restricción HindIII y EcoRI.

Luego, para amplificar este fragmento, antes de clonarlo en pSegTag2b, se insertó este producto de PCR en el vector pGemT-easy por complementariedad por los extremos poliA de este producto con los extremos 3´ timina del vector pGem-T, pGEMT-VP1s (Fig.6B I). Se corroboró la correcta construcción de este plásmido, realizando un perfil de restricción con las enzimas EcoRI y HindIII. En el gel de electroforesis de la Fig. 6B II, se observaron 2 bandas, una de 3 kb (correspondiente al plásmido pGem-T) y otra de 650 pb, que corresponde al fragmento de VP1, corroborando así la correcta construcción de este plásmido por el perfil de restricción. También esta secuencia fue verificada a través de su secuenciación.

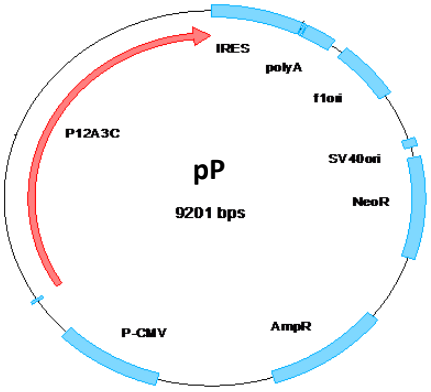
Posteriormente, se cortó este plásmido con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII y fue clonado en pSectag2b, obteniendo como resultado pSegTag2b-VP1s (Fig. 6C I). Este vector proporcionó el péptido señal para que la proteína sea secretada. Para corroborar la correcta construcción de este plásmido, se realizó un perfil de restricción con las enzimas NheI y HindIII. En el gel la Fig. 6C II se observan 2 bandas, una de 5kb (plásmido pSegTag2b) y otra de 750 pb, que corresponde al fragmento de VP1 con el péptido señal, corroborando la correcta construcción por el perfil de restricción. También esta secuencia fue verificada a través de su secuenciación.

Finalmente, se cortó pSegTag2b-VP1s con NheI y EcoRI, para ligar este fragmento en pCI-neo (Fig. 6D I). Este vector de expresión en células eucariotas, fue elegido para las formulaciones vacunales, ya que se ha utilizado previamente en otros trabajos (Cui et al., 2006; Langellotti et al., 2011; Rodriguez et al., 2013; Shariati Mehr et al., 2012; Taechavasonyoo et al., 2013). Como se observa en la Fig. 6D II, en el gel de electroforesis se visualizan 2 bandas, una de 5,5 kb (correspondiente al plásmido pCI-neo) y otra de 750 pb que corresponde al fragmento de VP1. Por lo tanto, se logró comprobar la correcta clonación por el análisis de restricción con las enzimas con NheI y EcoRI para VP1s. También esta secuencia fue verificada a través de su secuenciación (dato no mostrado).

1.3. Construcción de pP

Para la construcción de pP se levantó la secuencia de la proteína P1 las proteinasas 2A y 3C a partir del vector pBBR-P12A3C (Romanuti et al 2013) por PCR, obteniéndose una banda de 3123 pb. Se amplificó dicha secuencia, agregando los sitios de restricción NheI y XbaI y se clonó en el vector pCI-neo-IRES, descripto previamente. Para corroborar su identidad se realizó el perfil de restricción del plásmido pP (Fig. 7 II).

I)



II)

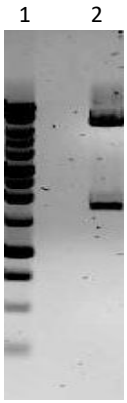


Fig. 7: I) Representación esquemática del plásmido pP. II) Electroforesis en gel de agarosa 1% de la digestión con NotI. Calle 1) Marcador de peso molecular 1KB *Promega*. Calle 2) perfil de restricción con la enzima NotI.

En la Fig. 7 II se muestra el gel de agarosa en donde se comprobó la correcta identidad del vector pP por análisis de restricción con la enzima NotI. En el gel de electroforesis se visualizan 2 bandas, una de 6,7 kb y otra de 2,5 pb. La suma de ambas bandas dio el total de peso molecular del vector 9,2 kpb.

1.4. Amplificación y caracterización de los plásmidos que codifican para las moléculas inmunomoduladoras

Los plásmidos que poseen los genes que codifican para las moléculas CD40L, RANKL e IL15 fueron amplificados en bacterias *Escherischia coli* DH5α y luego sus secuencias fueron corroboradas por el perfil de restricción, utilizando la enzima de restricción Bgl I para pCD40L y ECoRI para pRANKL y EcoRI y BamH I para pIL15 (Fig.8).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

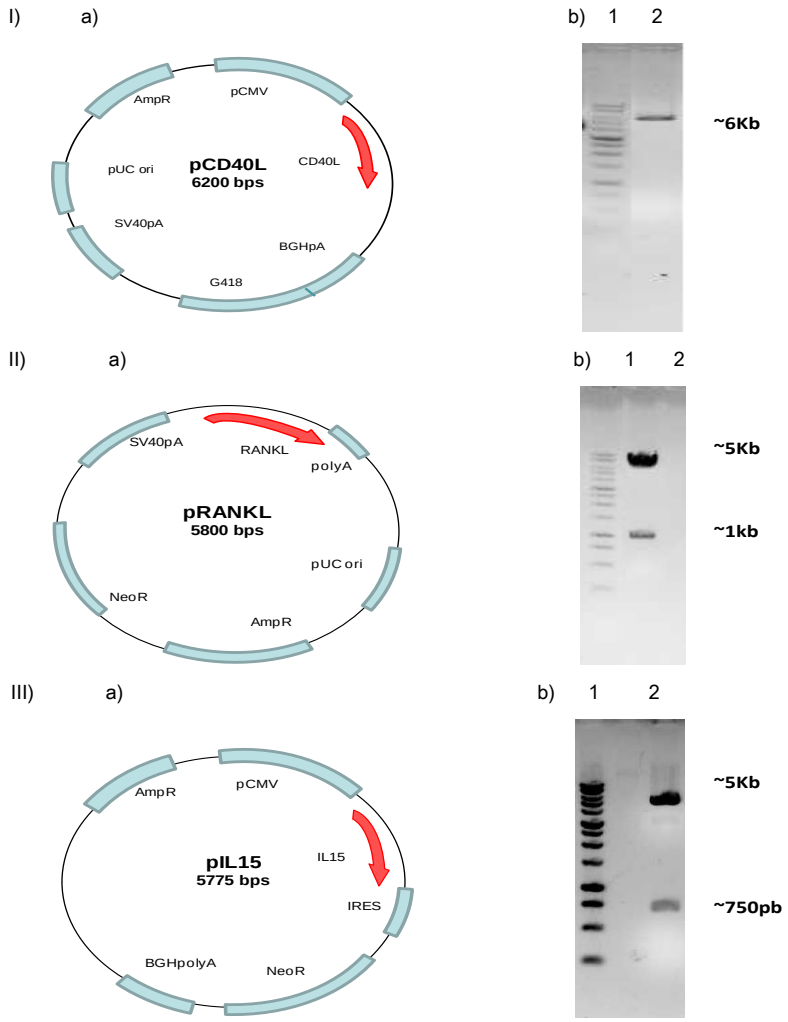


FIG. 8: a) Representación esquemática del plásmido I) pCD40L, II) pRANKL y III) pIL15 y b) electroforesis en gel de agarosa 1% de la digestión con las enzimas de restricción: I) Bgl I para pCD40L II) EcoRI para pRANKL y III) EcoRI y BamH I para pIL15. En todos los casos se representa: Calle 1) Marcador de peso molecular, 1KB *Promega*, Calle 2) perfil de restricción.

En la Fig. 8 se muestran los perfiles de restricción de cada plásmido, con los que se corroboraron las secuencias de los diferentes vectores que codifican para las moléculas inmunomduladoras por sus perfiles de restricción. En el perfil de restricción con la enzima Bgl I de la construcción pCD40L, se observa 1 banda cercana al peso molecular de 6 kpb que corresponde al peso del plásmido linearizado (Fig. 8b I). Con respecto a pRANKL, se realizó un perfil de restricción con EcoRI y en el gel de este perfil se observan 2 bandas, una cercana a los 5 kpb y otra cercana a los 1 Kb, siendo la suma de ambas bandas el PM de este vector (5,8 kpb) (Fig. 8b II). Por último, en el perfil del plásmido pIL15 con EcoRI y BamHI se visualizaron 2 bandas, una cercana a los 5 kpb y otra cerca de los 750 pb, correspondiente a la secuencia de IL15 (Fig. 8b III).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Como se expresara anteriormente, las secuencias nucleotídicas de los genes de interés fueron confirmadas por secuenciación automática para cada uno de los insertos presentes en los vectores utilizados.

2. Expresión de los genes que codifican para los inmunógenos VP1 y P1 y las moléculas inmunomoduladoras CD40L, RANKL e IL15

2.1. Expresión de los genes que codifican para los inmunógenos

Con el objeto de demostrar que los genes presentes en los plásmidos pVP1c, pVP1c-CD40L,pVP1c-RANKL, pP, pCD40L y pRANKL se expresaban correctamente, se transfectaron por lipofección células de mamíferos (BSR para los antígenos y BHK-21 para las moléculas coestimuladoras como se describe en materiales y métodos).

Para determinar si los vectores pVP1c, pVP1c-CD40L y pVP1c-RANKL eran capaces de expresar VP1 y si pP expresaba las proteínas estructurales VP1 y VP3 del VFA, monocapas de células BSR se transfectaron con dichos vectores. A las 48 h post transfección, los extractos celulares se analizaron por *western blot*, incubando la membrana con un suero anti-VP1 para las células transfectadas con pVP1c, pVP1c-CD40L y pVP1c-RANKL (Fig. 9) y con anti-VP1 y anti-VP3 para las transfectadas con pP (Fig. 10).

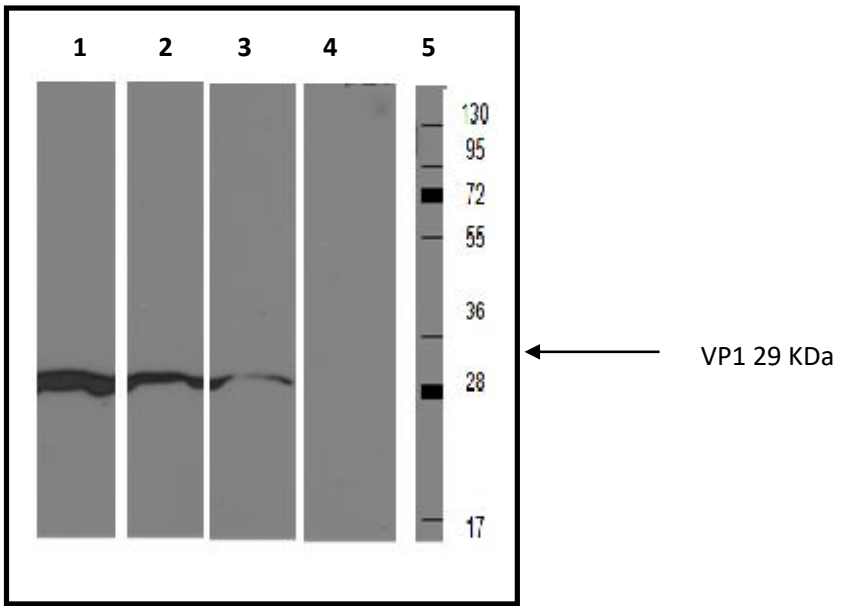


Fig. 9: Expresión de VP1 en células BSR transfectadas con: pVP1c, pVP1c-CD40L, pVP1c-RANKL evaluadas por Western Blot. Lisados de las células transfectadas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida al 12,5% y transferidos como se detalla en materiales y métodos. La detección se realizó con anticuerpo anti-VP1 de conejo y el anticuerpo secundario anti Ig de conejo- peroxidasa. El revelado se realizó por quimioluminiscencia. Lisado de células transfectadas con: Calle 1:pVP1c; Calle 2: pVP1c-CD40L; Calle 3: pVP1c-RANKL, Calle 4: sin transfectar; Calle 5: marcador de peso molecular.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

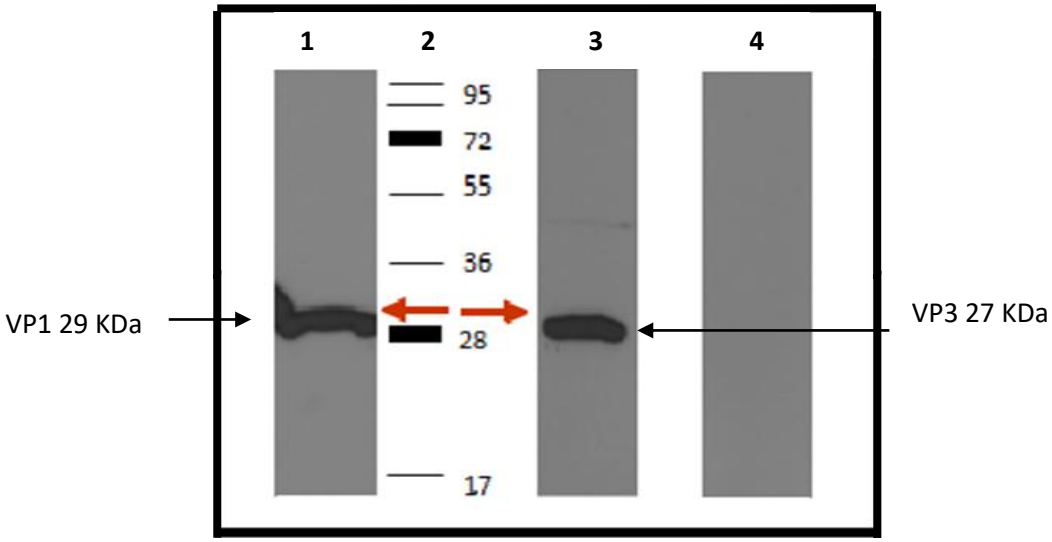


Fig. 10: Expresión de VP1 y VP3 en células BSR transfectadas con pP evaluadas por Western Blot. Lisados de las células transfectadas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida al 12,5% y transferidos como se detalla en materiales y métodos. La detección se realizó con anticuerpo anti-VP1 o anti-VP3 de conejo y el anticuerpo secundario anti Ig conejo-peroxidasa. El revelado se realizó por quimioluminiscencia. Lisado de células transfectadas con pP incubadas con: Calle 1: VP1; Calle 2: marcador de peso molecular; Calle 3: VP3; Calle 4 suero normal de conejo.

Como se muestra en la Fig. 9, en las células transfectadas con pVP1c, pVP1c-CD40L y pVP1c-RANKL se detectó una banda de 29 KDa correspondiente a VP1 del VFA que reaccionó positivamente con un antisuero específico.

Asimismo, como muestra la Fig. 10 en las células transfectadas con pP se detectó la presencia de las proteínas estructurales VP1 y VP3 del VFA, ausente en el control de células sin transfectar. Ambas proteínas fueron reconocidas por antisueros específicos y presentaron un PM de 29 KDa para VP1 y 27 KDa para VP3.

2.2. Expresión de las moléculas CD40L y RANKL

Con el fin de evaluar la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40L y RANKL, células BHK-21 fueron transfectadas con pCD40L, pRANKL, pVP1c-CD40L y pVP1c-RANKL.

La determinación de la expresión de RANKL y CD40L se realizó por citometría de flujo utilizando acs monoclonales específicos. Como control de la transfección, se transfectaron células BHK-21 con el plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (pGFP) y que puede ser detectada por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia (Fig. 11).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

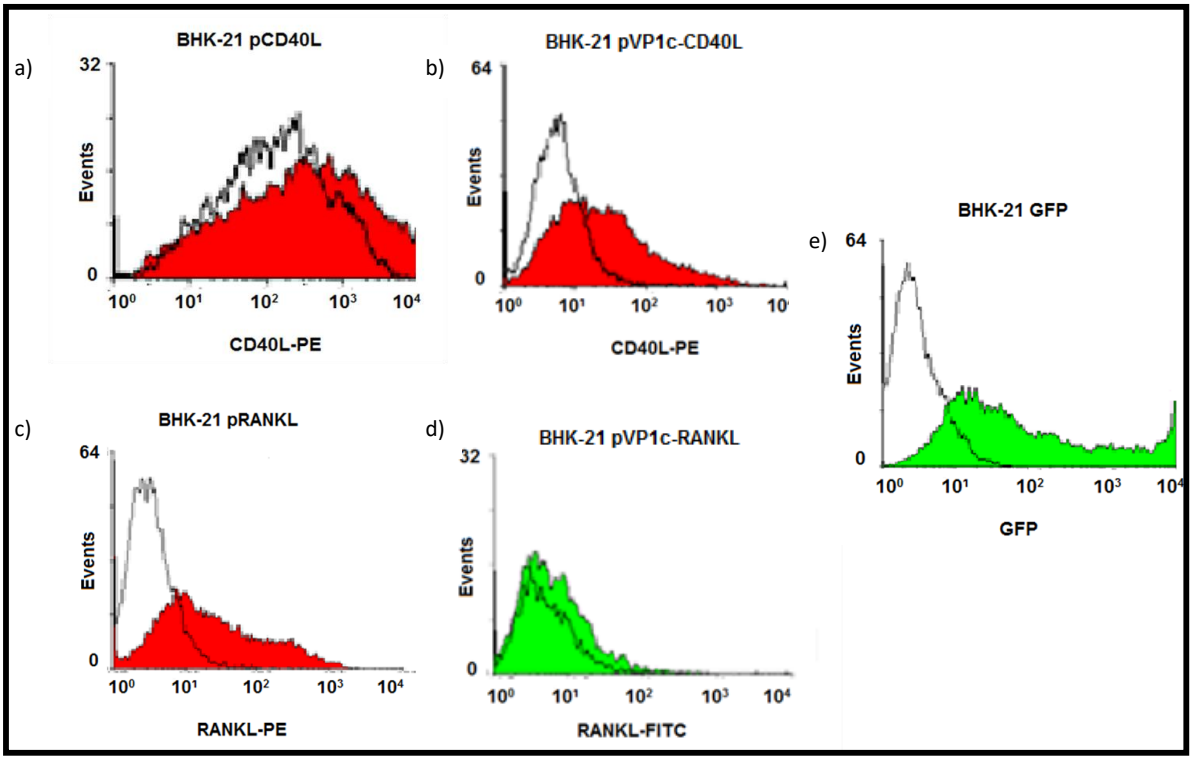


Fig. 11: Evaluación de la expresión de las moléculas CD40L y RANKL por citometría. Las células BHK-21 fueron transfectadas con: a) pCD40L; b) pVP1c-CD40L; c) pRANKL; d) pVP1c- RANKL; e) pGFP (Control de Transfección). El histograma vacío representa al control de isotipos y el de color representa la expresión de las moléculas coestimuladoras.

Como se observa en la Fig. 11 se logró demostrar la expresión de las moléculas: CD40L y RANKL de cada construcción por citometría de flujo.

2.3. Expresión de IL15

Para evaluar la expresión del plásmido pIL15, se determinó la secreción de esta citoquina en los sobrenadantes de cultivo de las células 24 h post transfección, para ello se utilizó un test de ELISA. Como control negativo se utilizó el sobrenadante de células BHK-21 sin transfectar (Fig. 12).

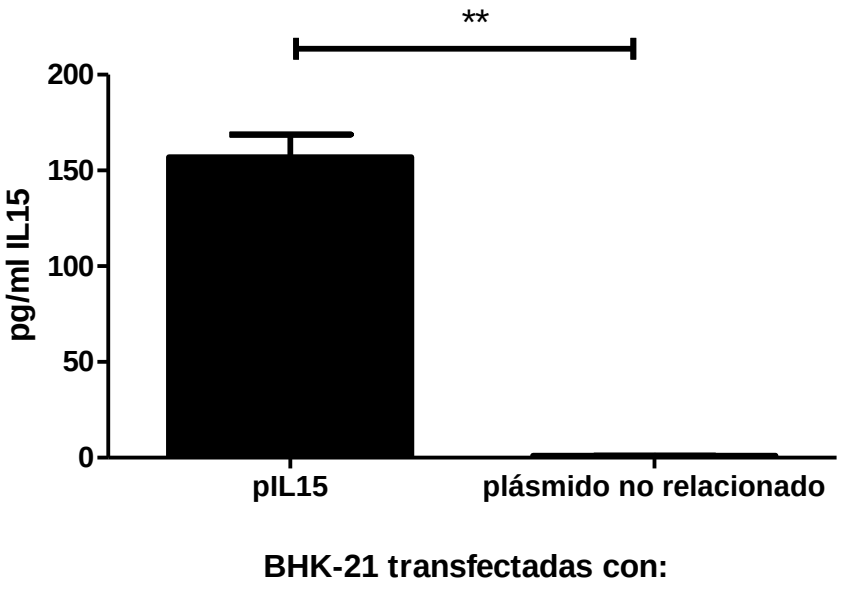


Fig. 12: Expresión de IL15: células BHK-21 fueron transfectadas con el plásmido pIL15 y un plásmido no relacionado, 24 h post transfección, se midió la concentración de IL15 secretada por las mismas, para ello se utilizó un test de ELISA. ** p< 0,01 T-Student. Cada barra representa la concentración de IL15 secretada.

En la Fig. 12 se representan los valores de concentración de IL15 en los sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas con el pIL15 o con un plásmido no relacionado. En el sobrenadante de células transfectadas con pIL15 se determinó una concentración aproximada de 150 pg/ml de IL15 mientras que en el sobrenadante de las células transfectadas con el plásmido no relacionado no se pudo detectar IL15.

3. Selección de las vacunas génicas por su capacidad de inducir una respuesta inmune humoral protectora frente al VFA

3.1. Esquema de inmunización

Para la elección del mejor candidato vacunal se utilizó el modelo de ratón ya que es muy costoso evaluar en bovinos, debido al gran número de animales necesarios para un correcto análisis. Asimismo, se ha podido establecer un paralelismo entre los bovinos y el modelo murino en cuanto a la protección inducida por vacunas contra el VFA (Borca et al., 1986; Borca et al., 1993; Dus Santos et al., 2000; Fernandez et al., 1986; Zamorano et al., 1998).

Con el objeto de seleccionar la mejor vacuna génica se inocularon ratones BALB/c por vía intrádermica (i.d) con diferentes dosis de inmunógenos combinados con los adyuvantes moleculares. En este modelo se evaluó la respuesta humoral y la protección

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

frente a un desafío con VFA. Las dosis de los inmunógenos y la vía de inoculación se seleccionaron sobre la base de trabajos previos (Langellotti et. al, 2011).

Los ratones fueron inmunizados con los diferentes plásmidos, 3 veces con un intervalo de 14 días y se desafiaron con VFA O1Campos a los 38 dpv como se indica en el esquema de la Fig. 13.

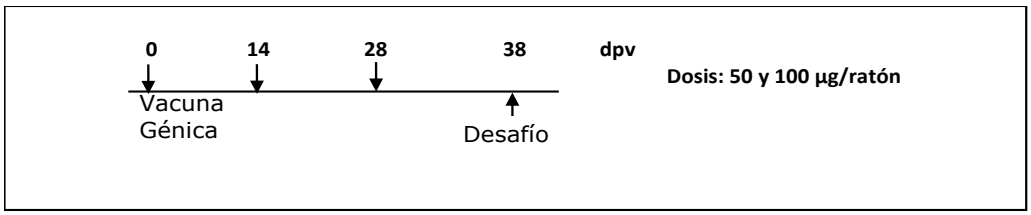


Fig. 13: Grupos de ratones BALB/c fueron inmunizados y revacunados con los diferentes plásmidos a los 14 y 28 días por vía intradérmica con 50 o 100 μg/dosis de ADN en un volumen de 0.2 ml. En distintos tiempos post-vacunación se recolectaron las muestras de sangre para los ensayos. A los 38 dpv los ratones inmunizados fueron desafiados con $10^{4,2}$ DICT50 del VFA O1Campos**.** Se midió la viremia sobre células BHK-21 a las 24 h post desafío. Otro grupo de animales fue sacrificado para experimentos de inmunidad celular.

Para evaluar la respuesta humoral, los niveles de acs anti-VFA presentes en los sueros de los animales vacunados se determinaron mediante un ELISA de captura, como se detalló en materiales y métodos. Por trabajos previos en nuestro laboratorio (Zamorano et al. 2010), se consideraron como animales que probablemente estarían protegidos frente al desafío viral, aquellos que presentaron niveles de acs superiores a 2.

Con el objeto de estudiar la eficacia de las vacunas frente a la infección con virus vivo, se realizaron ensayos de desafío, basándonos en el modelo de ratón desarrollado en nuestro laboratorio. Para ello a los 38 dpv, los animales fueron inoculados con $10^{4,2}$ DICT50/ml del VFA O1Campos por vía ip y luego de 24 h fueron sangrados, y la sangre heparinizada fue colocada sobre monocapas de células BHK-21. Los ratones fueron considerados completamente protegidos cuando las monocapas no presentaron efecto citopático luego de dos pasajes ciegos.

3.2 <u>Vacuna génica pVP1c</u>

Inicialmente se trabajó con la forma citosólica de la proteína VP1 del VFA O1Campos. Como se mencionó antes, para mejorar su capacidad inmunogénica se adicionaron los genes de las moléculas coestimuladoras CD40L o RANKL al plásmido. En la tabla 3 se representa los resultados obtenidos en cuanto a la respuesta humoral y la protección frente al desafío viral inducida por estas formulaciones.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Vacuna	Dosis/ratón	Promedio del título de acs>2	% de animales protegidos frente al desafío con VFA
pVP1c	50 µg	(-)	0
	100 µg	(-)	0
pVP1c-CD40L	50 µg	(-)	0
	100 µg	(-)	0
pVP1c-RANKL	50 µg	(-)	0
	100 µg	(-)	0
pCI-neo	100 µg	(-)	0
Vacuna Comercial (VFAi)	10 µg	(+)	100

Tabla 3. **Selección de las vacunas génicas por su capacidad de inducir acs anti VFA y protección frente al desafío viral.** Se inocularon ratones BALB/c con 50 o 100 µg/dosis de los diferentes plásmidos por vía i.d (5 ratones/grupo). A los 37 dpv se determinó por ELISA la presencia de acs específicos anti-VFA en muestras de suero. Se indica como (+) o (-) aquellos grupos de ratones vacunados que presentaron un promedio del título de acs contra VFA >2 o <2, respectivamente. A los 38 dpv los ratones inmunizados fueron desafiados con $10^{4,2}$ DICT50 del VFA O1Campos**.** Se midió la viremia sobre células BHK-21 a las 24 h post desafío como fue detallado en materiales y métodos. Los ratones fueron considerados completamente protegidos cuando las monocapas no presentaron efecto citopático luego de dos pasajes ciegos.

Como se observa en la tabla 3, las vacunas génicas pVP1c, pVP1c-CD40L y pVP1c-RANKL indujeron en los ratones un título de acs específicos contra el VFA < 2 y no estuvieron protegidos frente al desafío con VFA, demostrando que la vacuna génica pVP1c sola o asociada a las moléculas coestimuladoras CD40L o RANKL (pVP1c-CD40L o pVP1c-RANKL) no induce una respuesta efectiva frente al virus. Sólo los ratones inmunizados con la vacuna comercial (utilizada como control positivo) presentaron un promedio del título de acs contra el VFA > 2 y una protección total al desafío viral.

3.3 Vacuna génica pVP1s

Por lo tanto, se decidió trabajar con la construcción que codifica para la proteína VP1s y las moléculas coestimuladoras. En este caso se co-inoculó, el pVP1s junto a los plásmidos pCD40L y pRANKL. Se inmunizaron ratones con diferentes dosis (50 y 100 µg/ratón) de pVP1s y con 100 µg de los vectores que codifican para las moléculas coestimuladoras y se estudió la respuesta humoral y protectora frente a VFA.

Vacuna	Dosis/ratón	Promedio del título de acs >2	% de animales protegidos frente al desafío con VFA

pVP1s	50 µg	(-)	0
	100 µg	(-)	0
pVP1s+CD40L	50 µg	(-)	0
	100 µg	(+)	0 (*)
pVP1s+RANKL	50 µg	(-)	0
	100 µg	(-)	0
pCI-neo	100 µg	(-)	0
Vacuna Comercial (VFAi)	10 µg	(+)	100

Tabla 4. Selección de las vacunas génicas por su capacidad de inducir acs anti VFA y protección frente al desafío viral. Se co-inocularon ratones BALB/c con 50 o 100 µg/dosis de los diferentes plásmidos por vía i.d (5 ratones/grupo) y 100 µg de pCD40L o pRANKL. A los 37 dpv se determinó por ELISA la presencia de acs específicos anti-VFA en muestras de suero. Se indica como (+) o (-) aquellos grupos de ratones vacunados que presentaron un promedio del título de acs contra VFA >2 o <2, respectivamente. A los 38 dpv los ratones inmunizados fueron desafiados con $10^{4,2}$ DICT50 del VFA O1Campos**.** Se midió la viremia sobre células BHK-21 a las 24 h post desafío como fue detallado en materiales y métodos. Los ratones fueron considerados completamente protegidos cuando las monocapas no presentaron efecto citopático luego de dos pasajes ciegos. (*) Disminución de viremia.

Como se observa en la tabla 4, el grupo que recibió una dosis de 100 µg de la vacuna pVP1s+pCD40L fue el único que presentó una respuesta de acs contra VFA superior a 2 y luego del desafío una disminución del nivel de virus en sangre, indicando que la molécula CD40L estaría colaborando con el incremento de la inmunidad.

De los resultados presentados (Tabla 3 y 4) se concluye que las vacunas génicas que utilizan pVP1 ya sea en su forma citoplasmática o secretada no inducen una buena inmunidad.

3.4. Vacuna génica pP

A continuación, se decidió estudiar la capacidad inmunogénica del plásmido pP, que codifica para la poliproteína P1 las proteinasas 2A y 3C como vacuna génica. Asimismo, se decidió seguir trabajando con la molécula coestimuladora CD40L, ya que la presencia de la misma mejoró la respuesta humoral generada por la vacuna pVP1s (tabla 4).

Se inmunizaron ratones con diferentes dosis (50 y 100 µg /ratón) de pP y con 100 µg de pCD40L y se estudió la respuesta humoral y protectora frente al VFA.

Vacuna	Dosis	Promedio del título de acs >2	% de animales protegidos frente al desafío con VFA
pP	50 µg	(-)	0
	100 µg	(+)	0
pP+CD40L	50 µg	(-)	0
	100 µg	(+)	0 **(*)**
pCI-neo	100 µg	(-)	0
Vacuna Comercial (VFAi)	10 µg	(+)	100

Tabla 5. **Selección de las vacunas génicas por su capacidad de inducir acs anti VFA y protección frente al desafío viral.** Se inocularon ratones BALB/c con 50 o 100 µg/dosis de los diferentes plásmidos por vía i.d (5 ratones/grupo). A los 37 dpv se determinó por ELISA la presencia de acs específicos anti-VFA en muestras de suero. Se indica como (+) o (-) aquellos grupos de ratones vacunados que presentaron un promedio del título de acs contra VFA >2 o <2, respectivamente. A los 38 dpv los ratones inmunizados fueron desafiados con $10^{4,2}$ DICT50 del VFA O1Campos**.** Se midió la viremia sobre células BHK-21 a las 24 h post desafío como fue detallado en materiales y métodos. Los ratones fueron considerados completamente protegidos cuando las monocapas no presentaron efecto citopático luego de dos pasajes ciegos. (*) Disminución de viremia

Como se observa en la tabla 5, los grupos de ratones que recibieron 100 µg de la vacuna pP y pP co-inoculado con pCD40L fueron los únicos grupos experimentales que presentaron una respuesta de acs contra VFA superior a 2, sin embargo sólo el grupo pP+pCD40L mostró una disminución del nivel de virus en sangre, confirmando nuevamente que la molécula CD40L estaría involucrada de alguna manera con el incremento de la inmunidad protectora.

Frente a estos resultados, con el objeto de mejorar la respuesta inmune alcanzada hasta ahora, se adicionó a las formulaciones con pP, el plásmido pIL15, que posee la secuencia codificante para IL15.

Se inmunizaron ratones con 100 µg de pP ya que ésta formulación indujo un mejor título de acs y 100 µg de pIL15 y se estudió la respuesta humoral y protectora. El agregado de pIL15 a la vacuna pP no aumentó el título de acs en forma significativa con respecto al grupo pP, ni tampoco se consiguió una respuesta protectora frente al VFA en los ratones inmunizados (dato no mostrado).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En base a todos los resultados presentados se concluyó que la respuesta inmune generada por las vacunas génicas probadas, aun utilizando los adyuvantes moleculares, era muy débil por lo que se decidió por un lado incorporar los adyuvantes moleculares CD40L e IL15 junto a pP y por otro parte incorporar un adyuvante químico a la vacuna. El adyuvante utilizado fue ESSAI 95201 (Seppic; Ady 101) ya que en nuestro grupo se demostró que la incorporación de adyuvantes de composición similar a una vacuna génica contra Herpes Virus Bovino1 indujo un incremento de la respuesta humoral y citotóxica específica (Gammella et al 2014). Se decidió además, para potenciar la respuesta inmune incrementar la cantidad de refuerzos.

Lotes de ratones BALB/c fueron inmunizados con: pP, pP+Ady101, pP+pIL15+pCD40L; pP+pIL15+pCD40L+Ady101; pP+pCD40L+Ady101, pP+IL15+Ady101 o pCI-neo, 4 veces con un intervalo de 14 días y se desafiaron con VFA a los 52 dpv como se indica en el esquema de la Fig. 14 a.

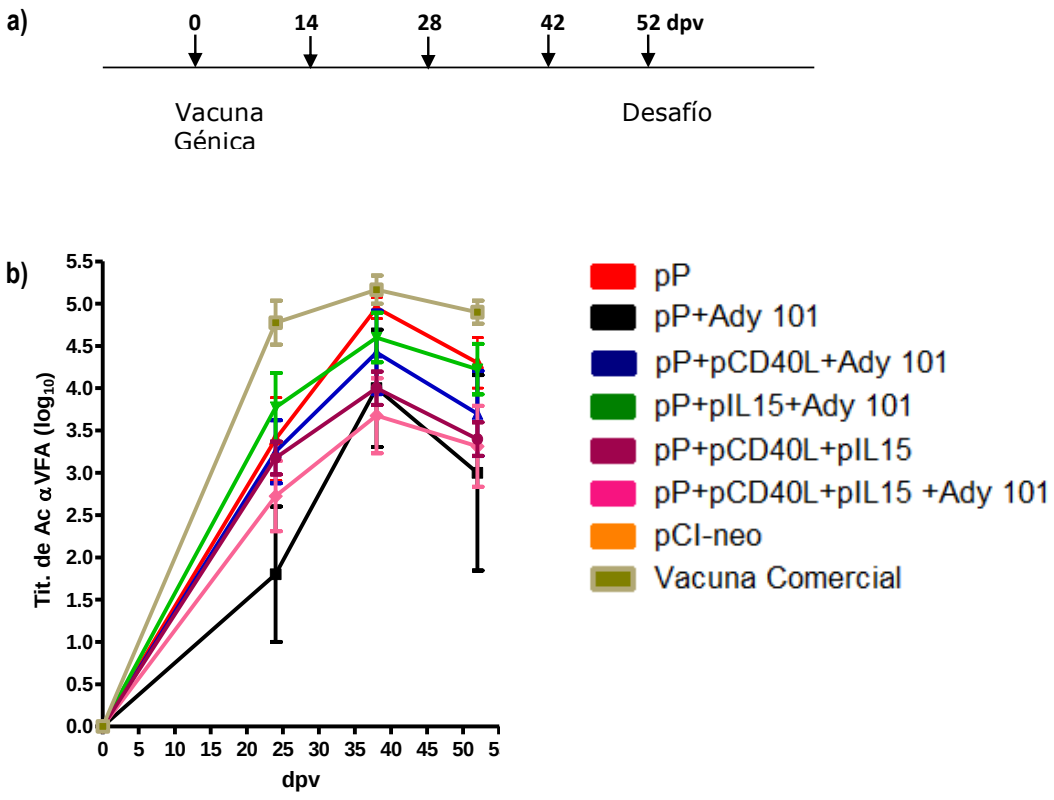


Fig. 14: Respuesta inmune humoral inducida en los ratones inmunizados con vacuna génica. a) Esquema de inmunización: Se inocularon ratones BALB/c con 100 μg de cada vacuna, 4 veces con un intervalo de 14 días entre inoculaciones, por vía i.d (5 ratones/grupo), a los 52 dpv se realizó el desafío viral con VFA O1Campos. **b) Cinética de acs anti-VFA en los sueros de los animales inmunizados con las diferentes vacunas**: Ratones BALB/c fueron inmunizados con las diferentes formulaciones vacunales, a distintos dpv se tomaron muestras de sangre y se midieron por ELISA los acs específicos contra el VFA. Cada punto corresponde al promedio de los títulos de acs de los sueros de los animales de cada grupo vacunal. El título de cada suero se calculó como el logaritmo en base 10 de la mayor dilución que supera en DO al punto de corte, siendo el punto de corte la media de la absorbancia de los sueros provenientes de ratones inmunizados con pCI-neo + 2 DS.

Como se observa en la Fig. 14b, no se encontraron diferencias significativas en el título de acs inducido por las diferentes formulaciones. Sin embargo, sorprendentemente, la formulación pP+pIL15+ Ady 101 y pP+ pCD40L+ Ady 101 indujeron una protección frente al desafío viral en el 80% y 60% de los animales vacunados, respectivamente (Fig. 15). Las vacunas pP+pIL15 +pCD40L+Ady y pP+pIL15+pCD40L indujeron una protección frente al desafío viral en el 20% de los ratones mientras que los ratones vacunados con pP, pP+Ady101 o pCI-neo no estuvieron protegidos.

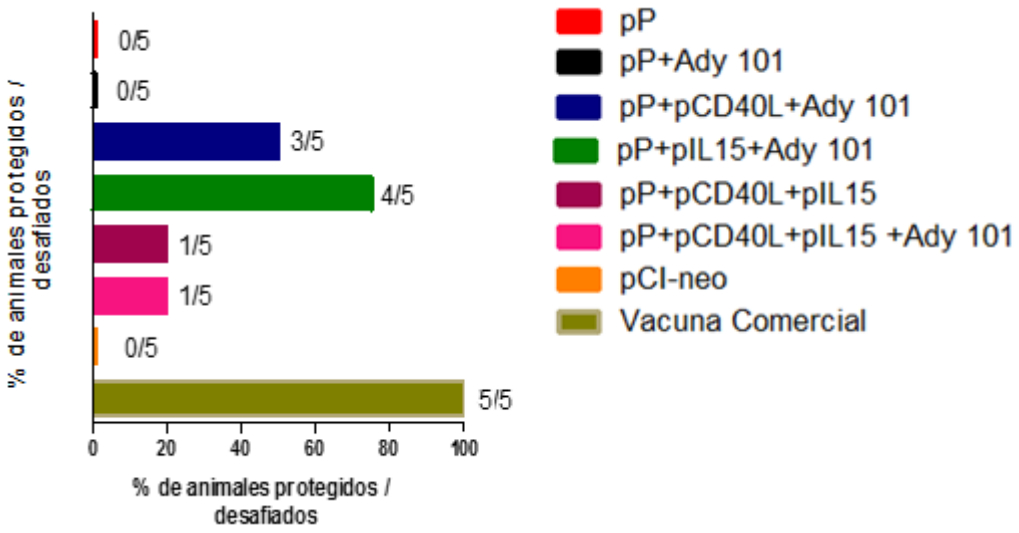


Fig. 15: Respuesta inmune protectora inducida en los ratones inmunizados con vacuna génica. A los 52 dpv los ratones inmunizados fueron desafiados con $10^{4,2}$ DICT50 del VFA O1Campos**.** Se midió la viremia sobre células BHK-21 a las 24 h post desafío como fue detallado en materiales y métodos. Se representa el porcentaje de animales protegidos para cada grupo. Los números indican el porcentaje de animales protegidos/animales desafiados. Estos resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

En función de los resultados obtenidos se decidió evaluar la inmunidad conferida por las formulaciones pP+pIL15+Ady101 y pP+pCD40L+Ady101.

4. Respuesta inmune inducida en ratones inmunizados con pP+pIL15+Ady101, o pP+pCD40L+Ady101

4.1. Inmunidad humoral inducida por la vacunación

Se sabe que los acs tienen un papel central en el control de la infección por VFA, tanto en el modelo murino (Borca et al, 1986) como en los hospedadores naturales (Maradei et al, 2008) y dado que se observó una respuesta específica contra el VFA en los ensayos de protección, se decidió estudiar más detalladamente la respuesta humoral inducida por las distintas vacunas. Se evaluaron los niveles de IgG totales específicas contra VFA (Fig16).

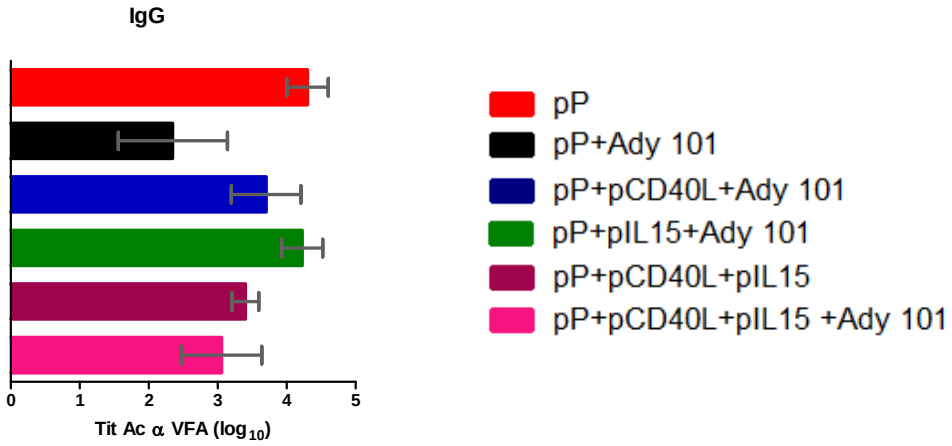


Fig. 16: Título de acs IgG totales anti VFA inducidos en ratones BALB/c a los 52 dpv. Se muestran los promedios del título de acs obtenidos para los sueros de cada grupo vacunal. El título de acs de cada suero se calculó como el logaritmo en base 10 de la mayor dilución que supera en DO al punto de corte, siendo el punto de corte la media de la absorbancia de los sueros provenientes de ratones inmunizados con pCI-neo + 2 DS.

Como se observa en la Fig. 16 no hay diferencias significativas entre los diferentes grupos en cuanto al título de las IgGs dirigidas contra el VFA.

Dado que los isotipos de las Igs poseen funciones efectoras diferenciales, se decidió estudiar el perfil de isotipos inducidos por las vacunas (Fig. 17).

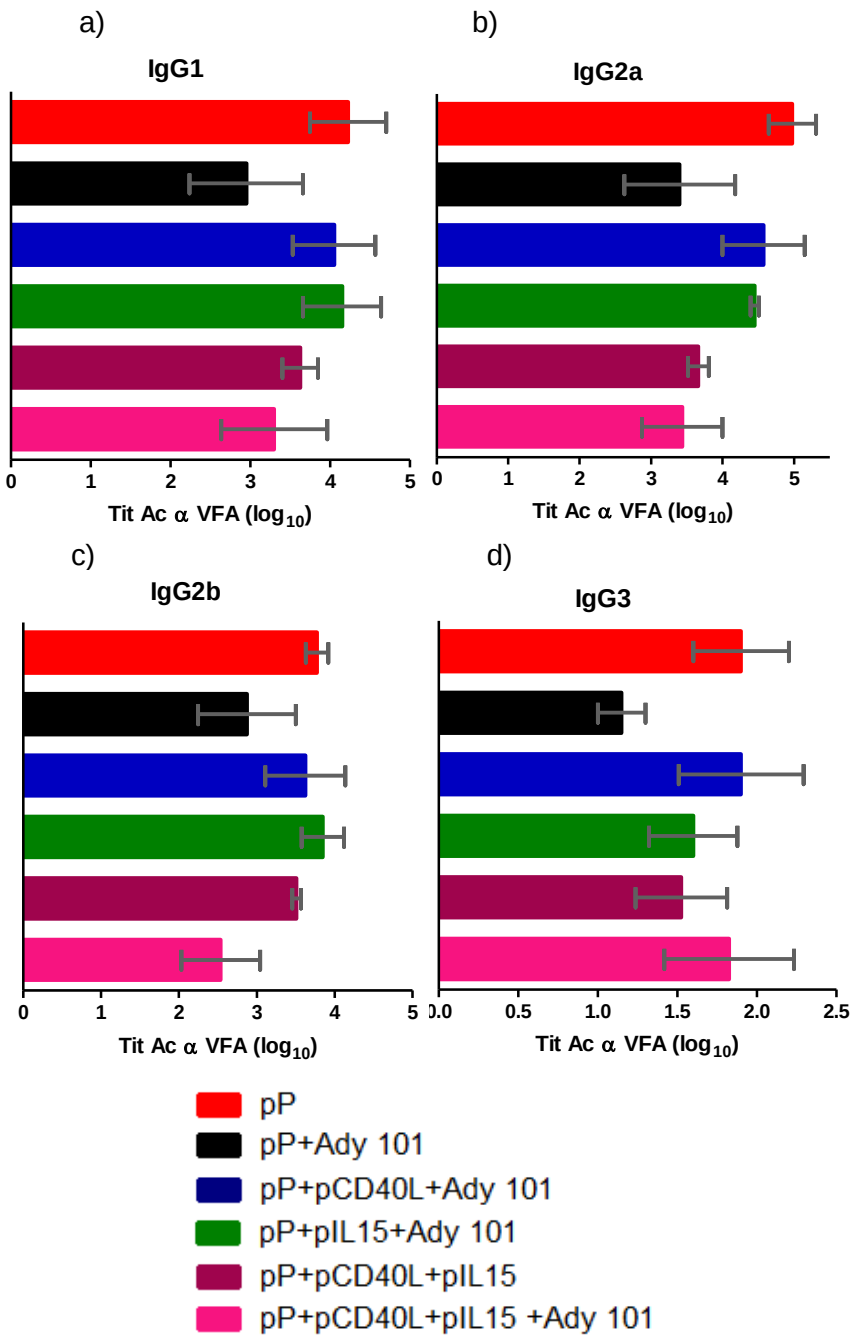


Fig. 17: Isotipos de IgG anti-VFA en sueros de ratones inmunizados. A los 52 dpv se midieron por medio de un ELISA los títulos de las inmunoglobulinas específicas anti-VFA O1Campos IgG1 (a), IgG2a (b), IgG2b (c) y IgG3 (d) presentes en los sueros de ratones inoculados con las diferentes formulaciones vacunales. El título de acs de cada suero se calculó como el logaritmo en base 10 de la mayor dilución que supera en DO al punto de corte, siendo el punto de corte la media de la absorbancia de los sueros provenientes de ratones inmunizados con pCI-neo + 2 DS.

En la Fig. 17, se observa que no hay diferencia significativa en el nivel de subtipos de IgG contra VFA inducido por las diferentes vacunas.

Se decidió evaluar también los niveles de IgA en suero ya que este isotipo de inmunoglobulina, media una variedad de funciones de protección a través de la interacción con receptores específicos y mediadores inmunes (Snoeck et al. 2006; Delacroix et al. 1982).

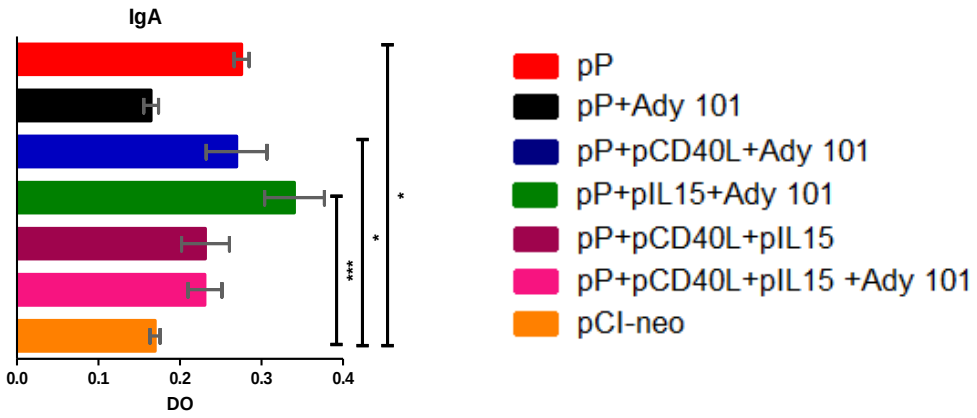


Fig. 18: Niveles de IgA sérica específica para VFA en ratones vacunados con las diferentes formulaciones a 52 dpv. Los sueros fueron evaluados en la dilución 1:50 por la técnica de ELISA. Los valores graficados en eje de las ordenadas corresponden al valor de densidad óptica medida a 492 nm.

En la Fig. 18, se observa que la IgA sérica se ve aumentada significativamente en los grupos pP ($p<0,05$), en pP+pCD40L+Ady ($p<0,05$) y en pP+pIL15+Ady ($p<0,001$) con respecto al grupo control pCI-neo, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos vacunados con pP y los diferentes adyuvantes respecto de pP.

Posteriormente, para analizar la calidad de los acs anti VFA generados se hizo un estudio de avidez. Los sueros provenientes de los ratones inmunizados y sangrados a los 52 dpv se evaluaron en un ELISA de avidez. El índice de avidez se calculó en función de la relación entre la Absorbancia obtenida, luego de la incubación de los sueros tratados y sin tratar con Urea (Fig.19). En nuestro laboratorio utilizando el modelo murino para la evaluación de vacunas comerciales contra VFA se observó que aquellos animales que tenían un índice de avidez mayor al 60 % en su mayoría estaban protegidos frente al desafío viral (Gnazzo et al., 2013).

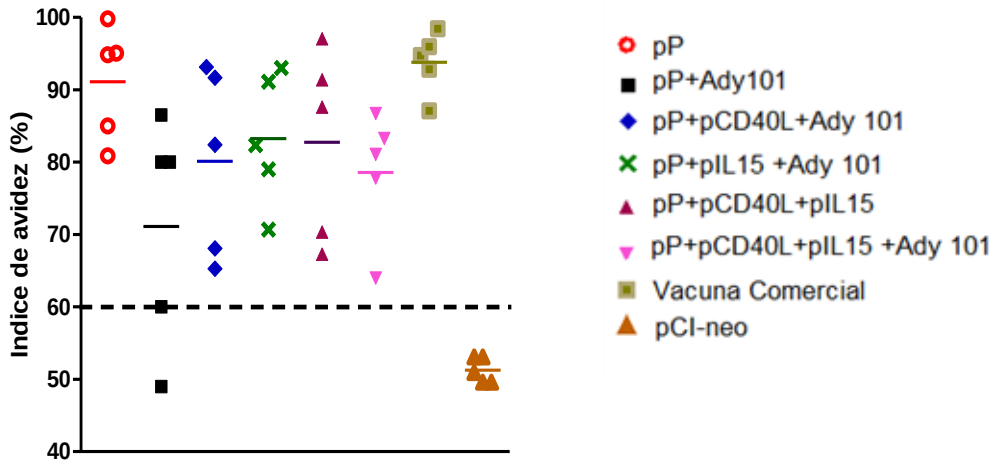


Fig. 19: Índice de avidez de los acs anti-VFA a los 52 dpv. El índice de avidez se calculó como el porcentaje la relación entre: la densidad óptica del pocillo que contenía el suero de cada uno de los animales inmunizados con las diferentes formulaciones vacunales tratado con urea y la densidad óptica de otro pocillo idéntico pero sin tratar con urea. Cada punto representa el índice de avidez de cada ratón dentro del grupo vacunal y las líneas el promedio de la avidez de cada grupo. La línea punteada representa un índice avidez del 60 % que correlacionaría con buena protección.

En este estudio, se observó que el índice medio de avidez de los acs es alto, superior al 60% en todas las formulaciones, además el grupo pP presentó un índice de avidez similar al grupo que recibió la vacuna comercial (Fig. 19).

4.2. Inmunidad celular inducida por la vacunación

4.2.1. Análisis Fenotípico de las Poblaciones celulares de los bazos de los ratones vacunados

La protección frente a la infección por el VFA ha sido siempre relacionada con la presencia de acs neutralizantes. Sin embargo, se han encontrado animales protegidos con niveles subinmunizantes de acs sugiriendo la presencia de otros mecanismos inmunes (Quattrocchi et al., 2011). Con el fin de evaluar la participación de otros componentes de la respuesta inmune responsables de la protección observada en los animales que recibieron la vacuna génica pP en presencia de los adyuvantes moleculares (pCD40L, pIL15) y el adyuvante quimico (Ady 101), inicialmente, se determinó el número absoluto de células por bazo y se analizó estadísticamente la diferencia en el número de células entre los diferentes grupos. Se observó un aumento en el número total de células recuperadas de los ratones que fueron inmunizados con pP+pIL15+Ady; duplicando el valor obtenido para el grupo normal o el inmunizado con pP ($2,66 \times 10^8 \pm 6,66 \times 10^7$; $1,13 \times 10^8 \pm 1,25 \times 10^{7;}$ y $1,31 \times 10^8 \pm 1,59 \times 10^7$; respectivamente). Esta expansión en los bazos de los animales

inmunizados con pP+pIL15+Ady indica una clara activación de las células inmunocompetentes (Fig 20)

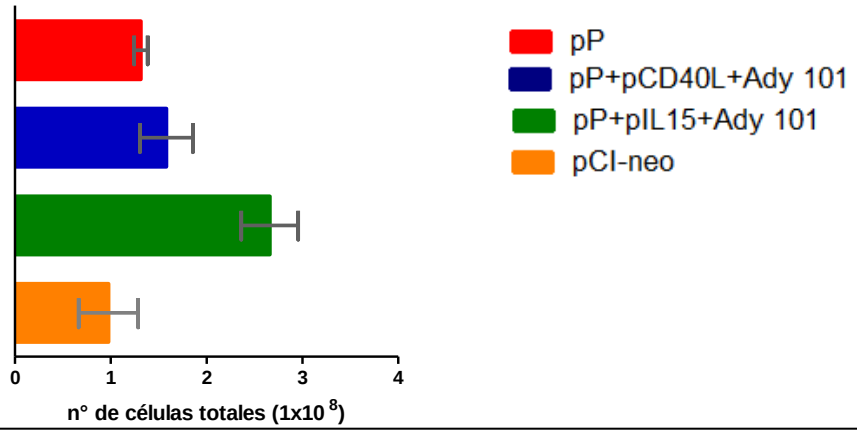
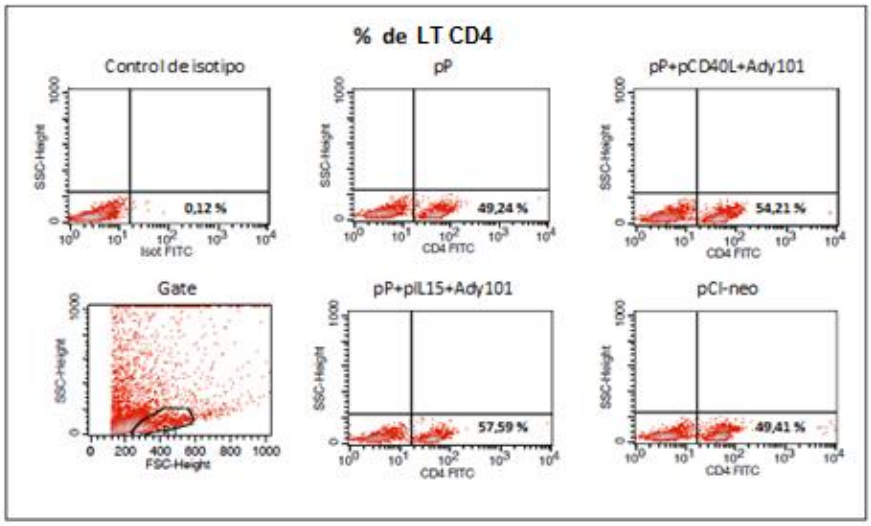


Fig. 20: Evaluación de la activación de los esplenocitos de ratones inmunizados con las vacunas génicas. Número absoluto medio ± DS de esplenocitos determinado por recuento en hemocitómetro de las células obtenidas de los ratones inmunizados con las diferentes vacunas a los a los 52 dpv. * p< 0,05 test de ANOVA y un post-test *Dunnet.* N=5.

4.2.2. Los ratones inoculados con pP+pIL15+Ady101 presentan un incremento en el número de LT y B

Para estimar cuáles eran las poblaciones celulares responsables de la respuesta generada, se calculó el número absoluto de células de cada población celular a partir del análisis por citometría de flujo y el recuento de las células totales de cada muestra de los bazos de los animales inmunizados y de los controles. Primero se evaluó las poblaciones linfocitarias. (fig 21, 22 y 23)

a)



b)

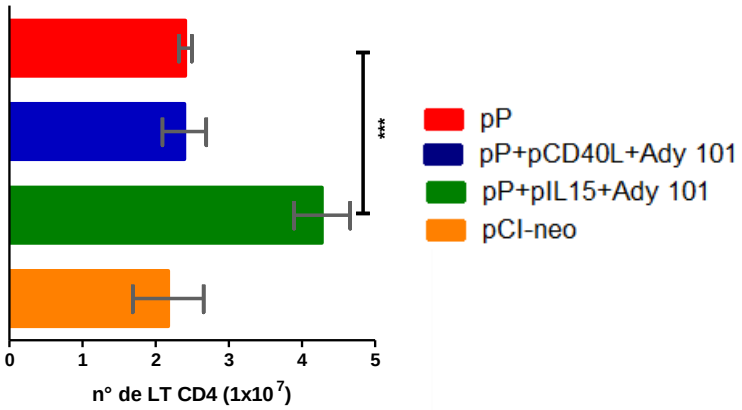
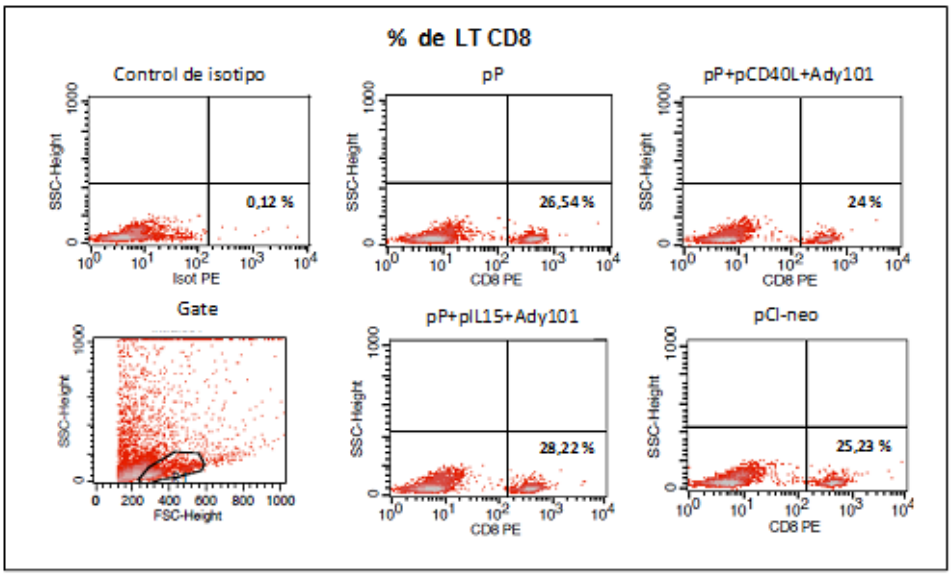


Fig 21: Evaluación de la subpoblación de LT CD4 presente en el bazo de ratones inmunizados con las vacunas génicas a los 52 dpv. a) Se muestran los dot plots representativos de los ratones estudiados para cada tratamiento. Los números representan los porcentajes de células CD4+ en la región correspondiente a los linfocitos, tomada para realizar el análisis. b) Número absoluto medio de células CD4+ ± DS correspondiente a los ratones inmunizados con las diferentes formulaciones. N= 5 animales por grupo. ***p<0,001 test de ANOVA y un post test Dunnet.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

a)



b)

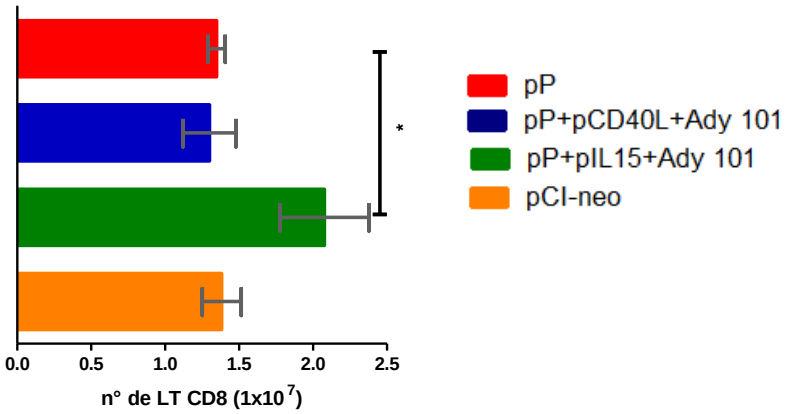


Fig. 22: Evaluación de la subpoblación de LT CD8+ presente en el bazo de ratones inmunizados con las vacunas génicas a los 52 dpv. a) Se muestran los *dot plots* representativos de los ratones estudiados para cada tratamiento. Los números representan los porcentajes de células CD8+ en la región correspondiente a los linfocitos, tomada para realizar el análisis. b) Número absoluto promedio de células CD8+ ± DS correspondiente a los ratones inmunizados con las diferentes formulaciones. N= 5 animales por grupo. *p<0,05 test de ANOVA y un post test *Dunnet.*

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

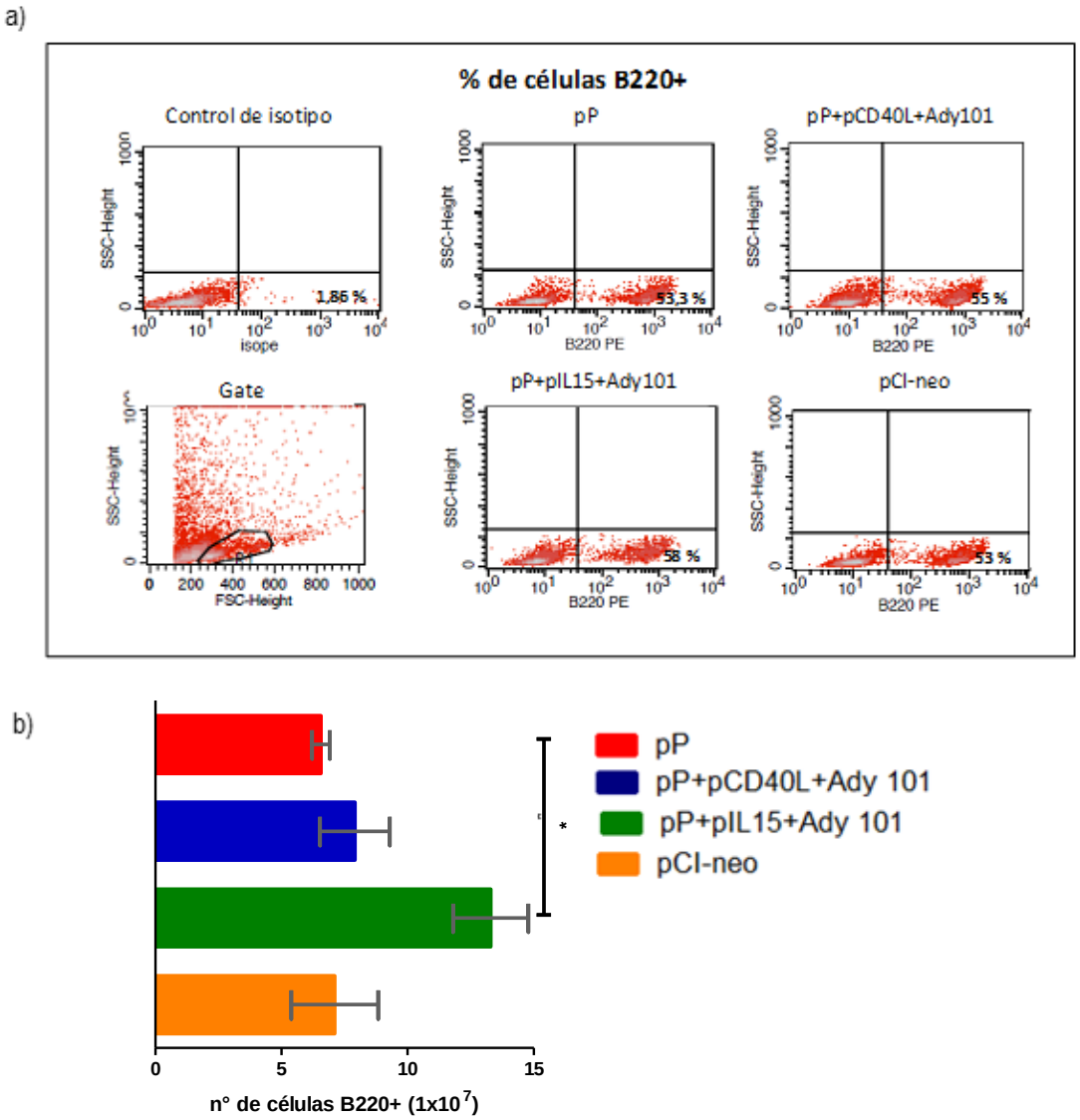


Fig. 23: Evaluación de la subpoblación de LB B220+ presente en el bazo de ratones inmunizados con las vacunas génicas a los 52 dpv. a) *Dot plots* representativos de los ratones estudiados para cada tratamiento. Los números representan los porcentajes de células B220+ en la región correspondiente a los linfocitos, tomada para realizar el análisis. b) Número absoluto medio de células B220+ ± DS correspondiente a los ratones inmunizados con las diferentes formulaciones. N= 5 animales por grupo. *p<0,05 test de ANOVA y un post test *Dunnet*.

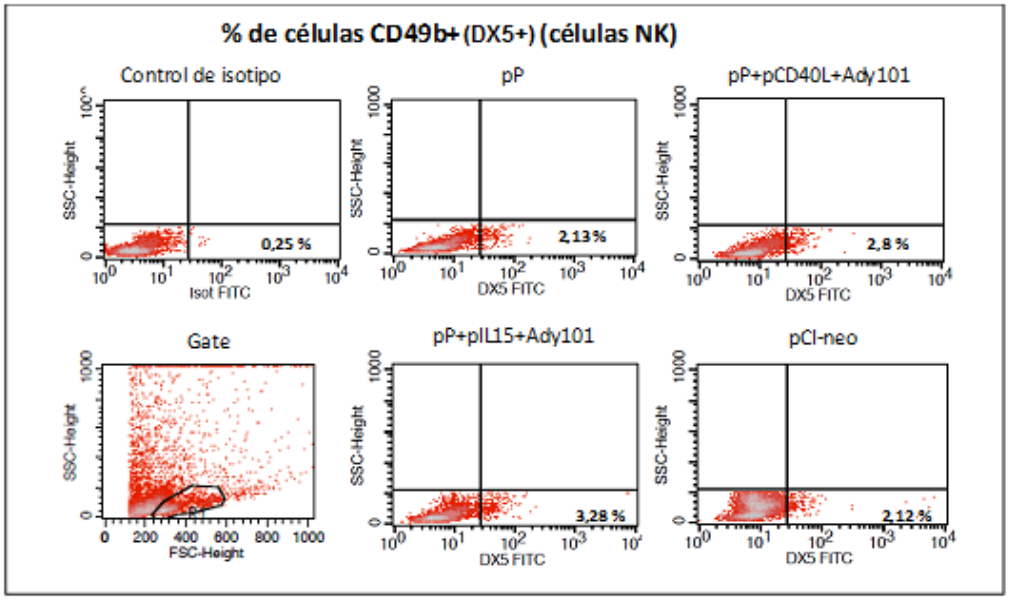
Como se muestra en las Fig. 21, 22 y 23, el número absoluto de LT CD4 y CD8 y de células B220+ (principalmente LB) fueron estadísticamente más altos en los bazos de los ratones inmunizados con pP+pIL15+Ady en comparación con los del grupo pP y los controles.

4.2.3. <u>Los ratones inoculados con pP+pIL15+Ady101 presentan un incremento en el número de células NK</u>

Las células NK median poderosos mecanismos microbicidas efectores durante las etapas tempranas del proceso infeccioso provocada por todo tipo de patógenos intracelulares y tienen particular relevancia en las infecciones virales, esta población participa en la inmunidad mediante la destrucción de células infectadas y por la secreción de citoquinas y quimoquinas (Vojvodic ' and Popovic et al 2010). Por otro lado, se ha demostrado que las células NK procedentes de animales infectados con VFA tienen un nivel elevado de citotoxicidad *in vitro* contra células diana derivadas de bovinos (Patch Jr et al., 2014).

Para evaluar esta población se marcaron los esplenocitos con el anticuerpo anti CD94b y se determinaron el número total de células marcadas por este anticuerpo (Fig. 24).

a)



b)

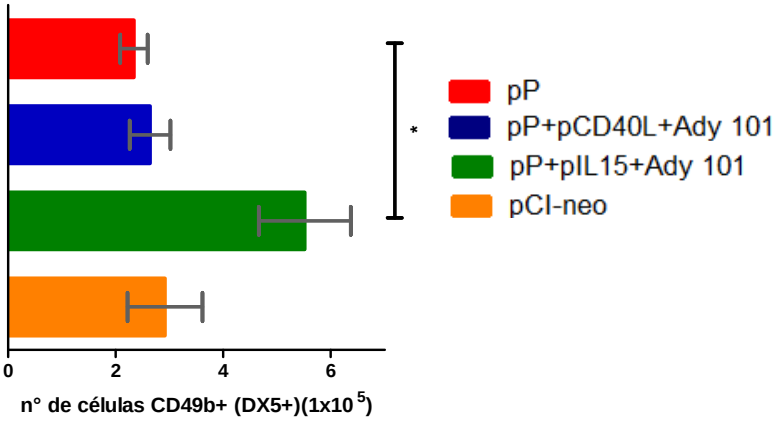


Fig 24: Evaluación de la subpoblación de células CD49b presente en el bazo de ratones inmunizados con las vacunas génicas a los 52 dpv. a) Se muestran los *dot plots* representativos de los ratones estudiados para cada tratamiento. Los números representan los porcentajes de células CD49b+ (DX5+) en la región indicada en el gráfico de SSC vs FSC, tomada para realizar el análisis. b) Número absoluto medio de células T CD49b+ ± DS correspondiente a los ratones inmunizados con las diferentes formulaciones. N= 5 animales por grupo. **p<0,01test de ANOVA y un post test *Dunnet.*

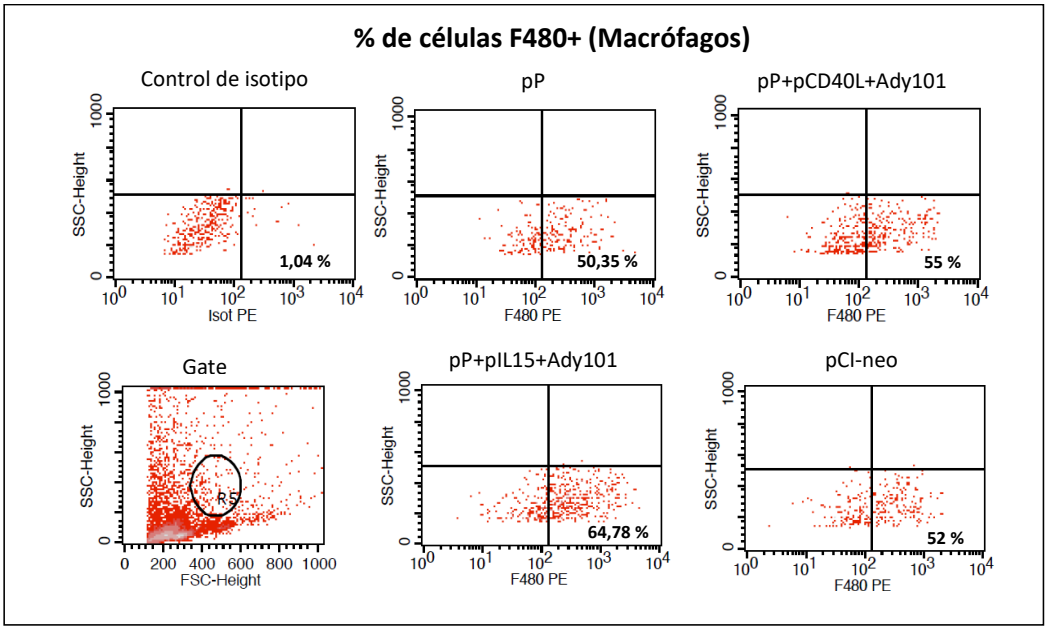
En la Fig. 24, se observa un aumento significativo de la población CD49b+ en el grupo pP+pIL15+Ady con respecto a pP ($p<0,001$).

4.2.4. Los ratones inoculados con pP+pIL15+Ady101 presentan un incremento en el número de MO

Por otro lado, decidimos estudiar la población de MO por sus cualidades en la respuesta frente a virus. Esta población tiene una alta capacidad fagocítica y pueden presentar péptidos derivados de los microorganismos fagocitados, a LT activados. Se demostró que los MO juegan un papel central en la protección temprana contra VFA y que la opsonización fue suficiente para la protección (Quattrocchi et al., 2011). Para estudiar esta población utilizamos el marcador F4/80 y se determinó el número de células marcadas del bazo de cada uno de los ratones inmunizados con las diferentes formulaciones (Fig. 25).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

a)



b)

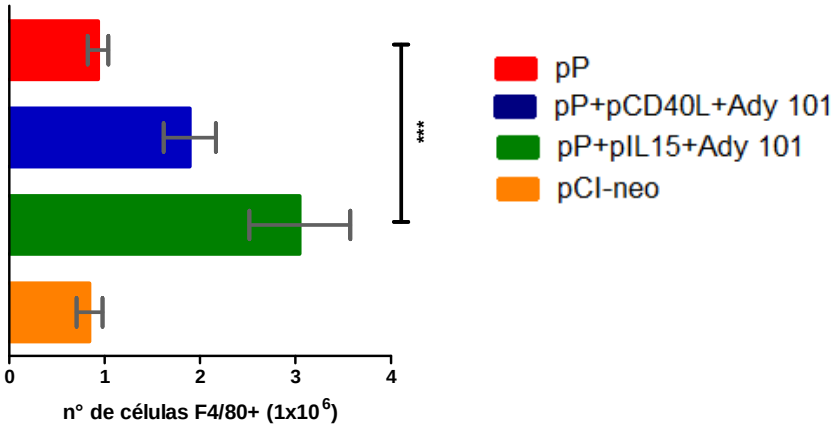


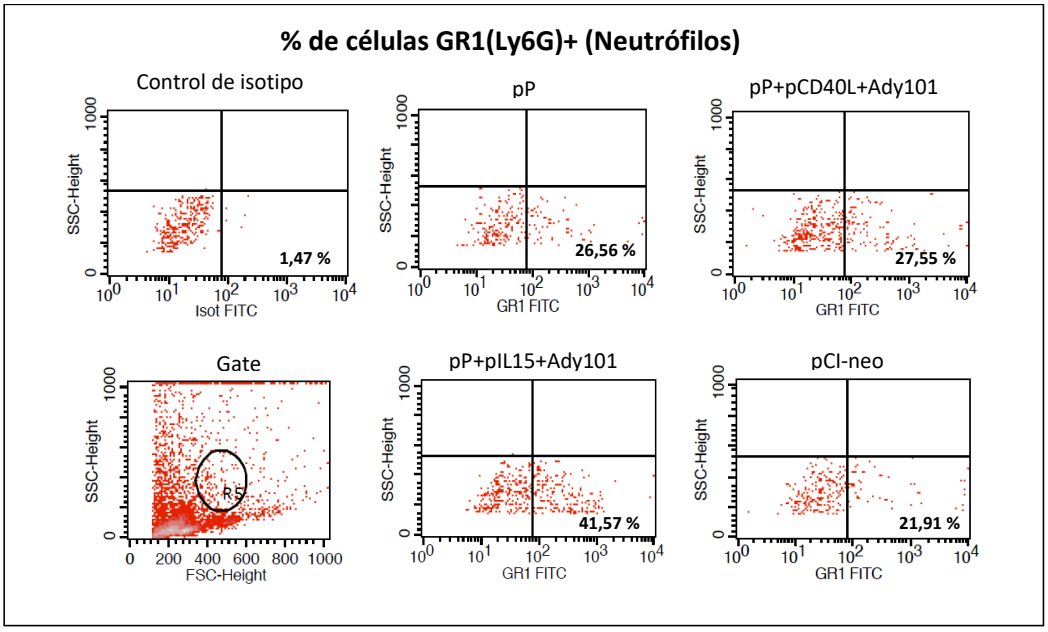
Fig. 25: Evaluación de la subpoblación de células F4/80+ presente en el bazo de ratones inmunizados con las vacunas génicas a los 52 dpv. a) Se muestran los *dot plots* representativos de los ratones estudiados para cada tratamiento. Los números representan los porcentajes de células F4/80+ en la región indicada en el gráfico de SSC vs FSC, tomada para realizar el análisis. b) Número absoluto medio de células F4/80 ± DS correspondiente a los ratones inmunizados con las diferentes formulaciones. N= 5 animales por grupo. ***p<0,001; test de ANOVA y un post test *Dunnet*

Como se observa en la Fig. 25, se muestra un aumento en la frecuencia (Fig.25 a) y un incremento significativo (p<0,01) en el número absoluto de la población F4/80 correspondiente a los MO en el grupo pP+pIL15+Ay101 con respecto al grupo pP (Fig.25b).

4.2.5. <u>Los ratones inoculados con pP+pIL15+Ady101 presentan un incremento en el número de células de neutrófilos</u>

Se sabe que la población de neutrófilos son células reclutadas rápidamente a los sitios de inflamación, allí son capaces de fagocitar y eliminar microorganismos. Asimismo, poseen la capacidad de secretar un amplio abanico de citoquinas que cumplen una función relevante en el tropismo de otras poblaciones celulares y en la modulación de la respuesta adaptativa que se generará posteriormente. Con el propósito de estudiar esta población celular utilizamos el anticuerpo monoclonal anti-GR1 (Ly6G) (Fig. 26).

a)



b)

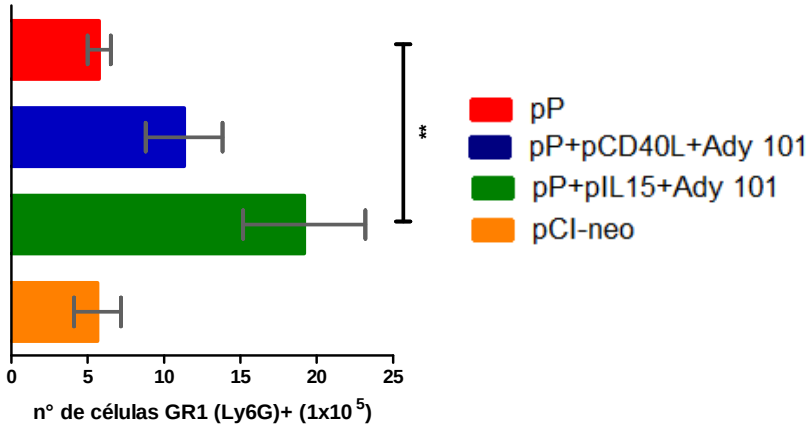


Fig. 26: Evaluación de la subpoblación de células Gr1+ presente en el bazo de ratones inmunizados con las vacunas génicas a los 52 dpv. a) Se muestran los *dot plots* representativos de los ratones estudiados para cada tratamiento. Los números representan los porcentajes de células Gr1+ en la región indicada en el gráfico de SSC vs FSC, tomada para realizar el análisis. b) Número absoluto medio de células Gr1+ ± DS correspondiente a los ratones inmunizados con las diferentes formulaciones. N= 5 animales por grupo. **p<0,01; test de ANOVA y un post test *Dunnet.*

En la Fig. 26, se observa un aumento significativo de neutrófilos en el grupo pP+pIL15+Ady con respecto al grupo pP ($pP<0,01$).

En conjunto, estos datos indican que el tratamiento con pP+pIL15+Ady por un lado favoreció un estado inflamatorio con un aumento de las poblaciones de granulocitos y MO. Paralelamente, los LB (B220+) y LT (CD8+ y CD4+) fueron activados produciendo una expansión en el número total de células presentes en el bazo ($2,66.10^8$ ±0,67 y $1,32.10^8$ ±0,16 para el grupo de ratones inoculados con pP+pIL15+Ady y pP, respectivamente).

4.2.6. Estudio de las citoquinas secretadas por los ratones de los diferentes tratamientos

Una respuesta característica de los LT activados por un antígeno es su capacidad de responder secretando citoquinas que a su vez puedan atraer otras poblaciones celulares. Por lo tanto, la determinación de la presencia de una citoquina indica no sólo la activación de los linfocitos como consecuencia de la estimulación antigénica sino el tipo de respuesta inducida (Th1 o Th2 o Th17). Así la secreción de IFNγ, IL2, TNFα indica un perfil Th1. La IL4 e IL5 un perfil Th2 y la IL17 o IL22 un perfil Th17. Por otra parte, IFNγ tiene una actividad antiviral contra el VFA, promueve la activación de células NK y MO, que pueden contribuir a controlar la replicación y propagación de la VFA, como hemos expresado anteriormente (Summerfield et al., 2009).

La producción de IFNγ e IL4 se evaluó en el sobrenadante de esplenocitos de los ratones inmunizados con las diferentes vacunas génicas y los controles. Para ello 5 días post último refuerzo (52 dpv), se extrajeron las células del bazo de los ratones y los esplenocitos fueron reestimulados *in vitro* con VFAi durante 72 h. Posteriormente, los sobrenadantes se ensayaron por medio de un ELISA de captura para determinar la concentración de IFNγ (Fig.27) e IL4 (Fig.28).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

4.2.7. Incremento en la secreción de IFNγ en los grupos pP+pCD40L+Ady101 y pP+pIL15+Ady101

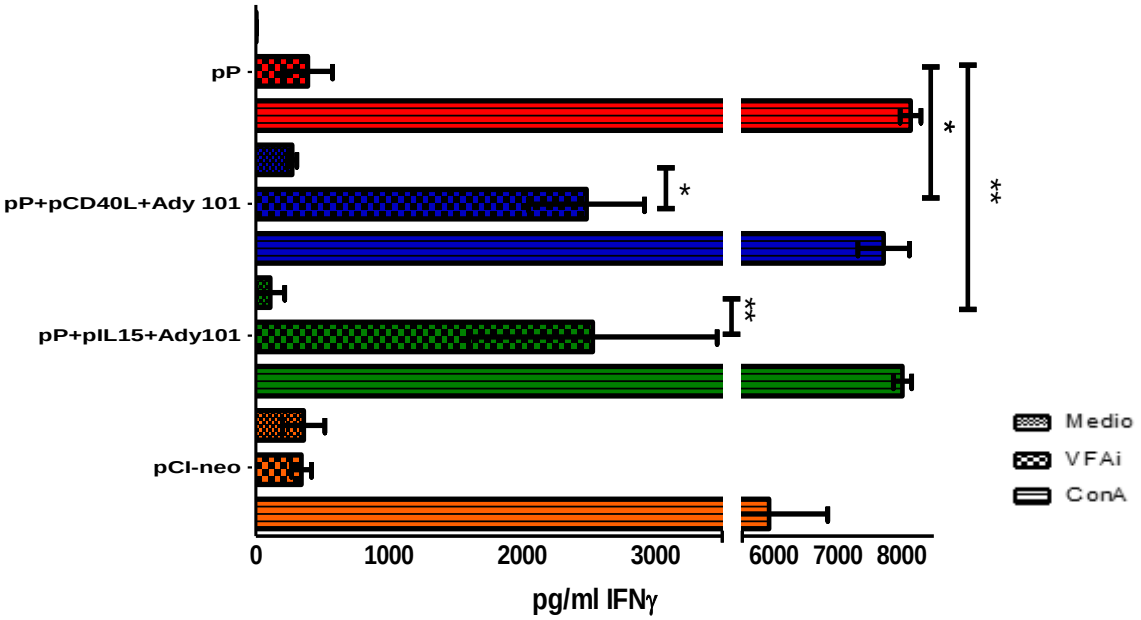


Fig. 27: Inducción de la síntesis de IFNγ por los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con las vacunas génicas. Cuantificación de IFNγ en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos provenientes de los ratones inmunizados con las diferentes vacunas a los 52 días post vacunación, sin estimular y estimulados durante 72 h con VFAi o ConA por ELISA. Las barras representan el promedio de las concentraciones de IFNγ observadas ± DS, en tres experimentos independientes (***p<0,001, p**<0,01, *p<0,05; test ANOVA y un post test Bonferroni).

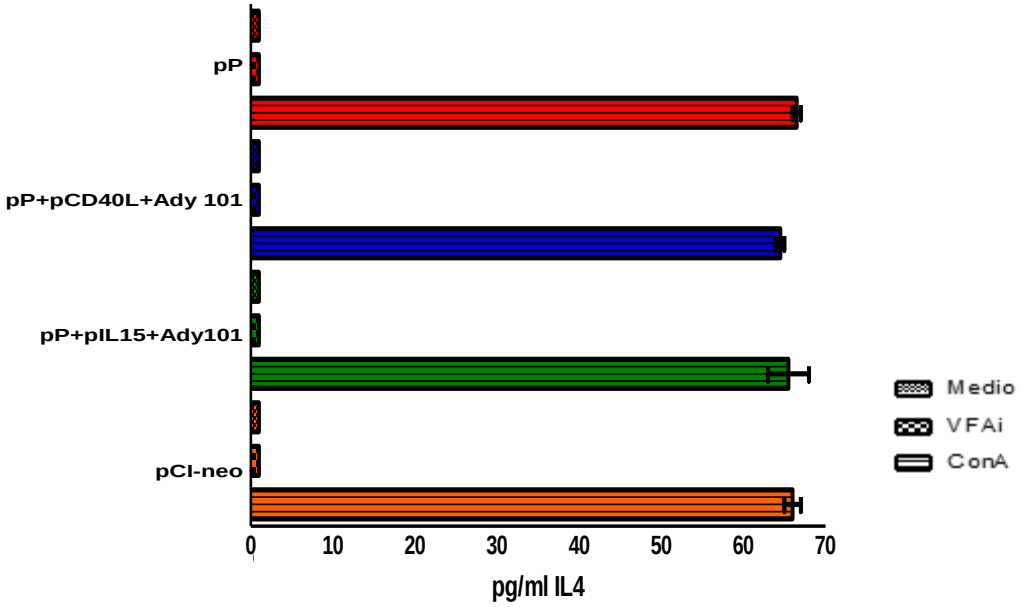


Fig. 28: Inducción de la síntesis de IL4 por los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con las vacunas génicas. Cuantificación de IL4 en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos provenientes de los ratones inmunizados con las diferentes vacunas a los 52 días post vacunación, sin estimular y estimulados durante 72 h con VFAi o ConA por ELISA. Las barras representan el promedio de las concentraciones de IL4 ± DS.

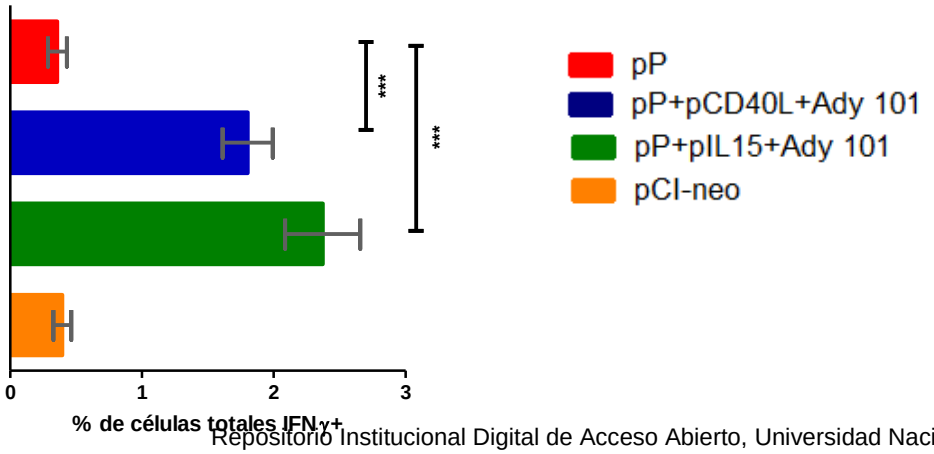
Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los resultados demostraron un aumento significativo de la producción de IFNγ por los esplenocitos de los grupos inoculados con pP+pIL15+Ady101 y pP+pCD40L+Ay101 y re-estimulados con VFAi (Fig.27) con respecto al control sin estímulo ($p< 0,001$ y $p<0,05$ respectivamente). Es de destacar que también se observó un aumento significativo ($p<0,01$) en la producción de IFNγ en los sobrenadante provenientes del grupo pP+pIL15+Ady101 y pP+pCD40L+Ady101 respecto de los de las células de los ratones del grupo pP.

En la Fig. 28, se muestra la ausencia de producción de IL4 en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos provenientes de todos los grupos inmunizados, frente a la estimulación específica con VFAi.

Los LT son la principal fuente de producción de IFNγ durante una respuesta inmune adaptativa. Con el fin de estudiar las poblaciones linfocitarias responsables de la producción de IFNγ (LT CD4 y/o LT CD8), los esplenocitos de los animales inmunizados, a los 52 dpv (5 días post último refuerzo) fueron reestimulados *in vitro* durante 16 h con VFAi y se determinó por doble marcación en membrana e intracelular y posterior análisis por citometría de flujo, la producción intracitoplasmática de IFNγ en las subpoblaciones linfocitarias T CD4+ y CD8+. En la Fig. 29 se observa que los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados con las vacunas pP+pIL15+Ady101 y pP+pCD40L+Ady101 presentaron un aumento significativo en la frecuencia de células linfocitarias secretoras de IFNγ respecto de pP ($p<0,001$). Dicho aumento se correlacionaría con un aumento de las células CD4+ productoras de IFNγ en el grupo pP + pIL15 + Ady 101 (0,43 ± 0,49 y 0,159 ± 0,148, respectivamente; $p<0,05$; con respecto al grupo control pP) (Fig. 30). Por otra parte, no se observaron diferencias en la frecuencia de las células CD8+ IFNγ+ entre los grupos con respecto al grupo control pP (Fig. 31 b). Teniendo en cuenta que el porcentaje total de células secretoras de IFNγ es superior a los LT CD4+ productores de IFN□ , inferimos que habría otra población que estaría produciendo IFNγ, que pueden ser las células NK ya que se vio también un aumento de esta población en el grupo pP+pIL15+Ady101 (Fig.24).

4.2.8. Incremento en el porcentaje de células secretoras de IFNγ en los grupos pP+pCD40L+Ady101 y pP+pIL15+Ady101

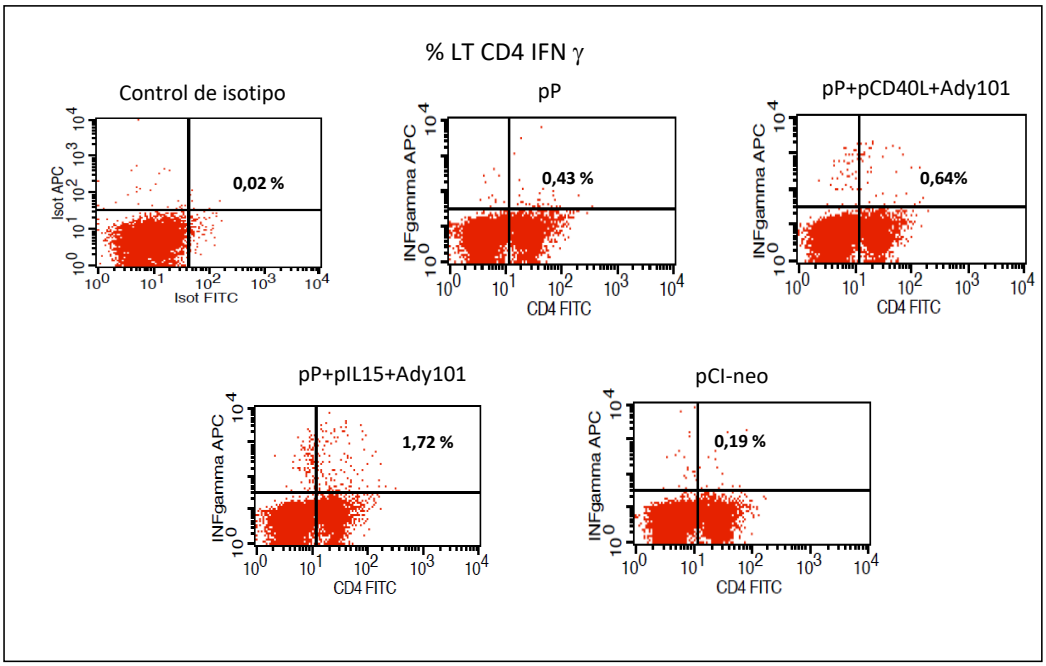


Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Fig. 29: Determinación de las células productoras de IFNγ. . Esplenocitos de ratones inmunizados las vacunas génicas a los 52 dpv, re-estimulados *in vitro* con VFAi, en presencia de Brefeldin A fueron permeabilizadas y marcadas con Acs anti- IFNγ o control de isotipo. % de células totales IFNγ+. N= 5 animales por grupo. ***p<0,001, *p<0,05 test ANOVA.y un post test *Dunnet.*

4.2.9. Incremento en el porcentaje de células CD4 secretoras de IFNγ en el grupo pP+pIL15+Ady101

a)



b)

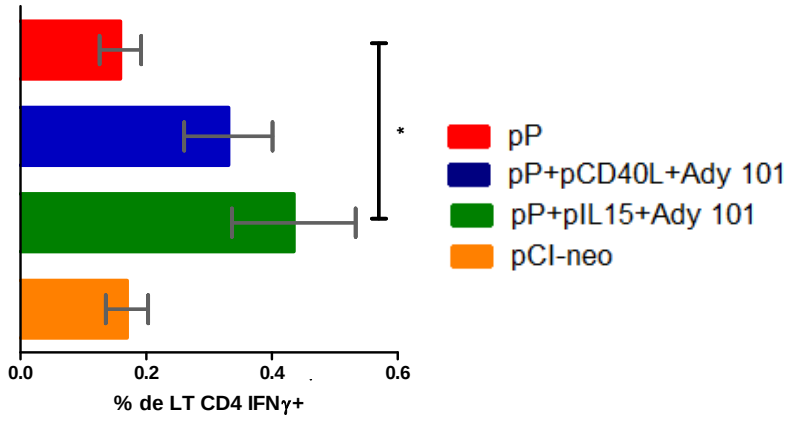
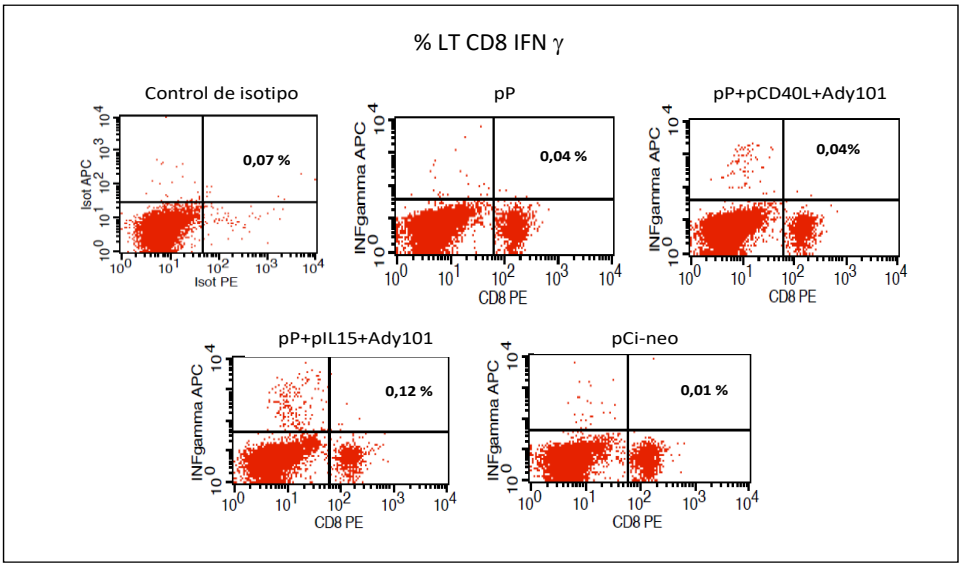


Fig. 30: Determinación de los LT CD4 productoras de IFNγ. Esplenocitos de ratones inmunizados con las vacunas génicas a los 52 dpv, re-estimulados *in vitro* con VFAi, en presencia de Brefeldina y marcados con Acs anti-CD4. Posteriormente las células fueron permeabilizadas y se marcaron con Acs anti- IFNγ o control de isotipo. **a**) *Dot plots* representativos de los ratones estudiados para cada tratamiento. Los números representan los porcentajes de células CD4+ positivas en la región correspondiente a los linfocitos, tomada para realizar el análisis**. b)** Porcentaje de LT CD4+, IFNγ+ *p<0,05 test ANOVA y un post test *Dunne*t.

4.2.10. Porcentaje de los LT CD8 secretoras de IFNγ en el grupo pP+pIL15+Ady101

a)



b)

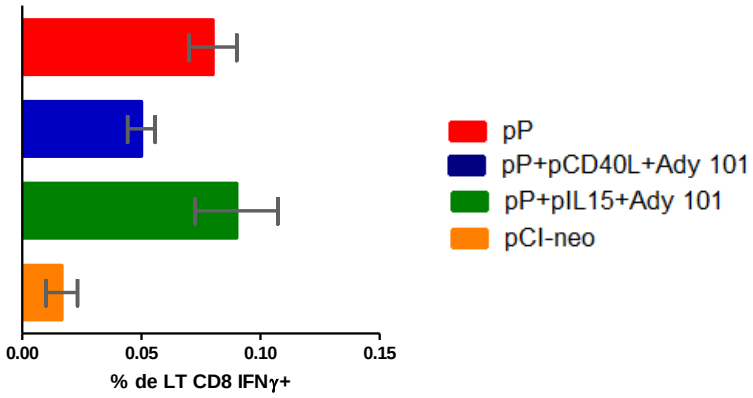


Fig 31. Determinación de los LT CD8 productoras de IFNγ. Esplenocitos de ratones inmunizados con las vacunas génicas a los 52 dpv, re-estimulados *in vitro* con VFAi, en presencia de Brefeldina y marcados con acs anti-CD8. Posteriormente las células fueron permeabilizadas y se marcaron con acs anti- IFNγ o control de isotipo. **a**) *Dot plots* representativos de los ratones estudiados para cada tratamiento. Los números representan los porcentajes de células CD8+ positivas en la región correspondiente a los linfocitos, tomada para realizar el análisis**. b)** Porcentaje de LT CD8+, IFNγ+ ± DE. N= 5 animales por grupo. *p<0,05 test ANOVA.y un post test *Dunnet.*

En conjunto, estos resultados sugieren que la respuesta inmune celular evidenciada al inmunizar los ratones con la vacuna génica pP+pIL15+Ady101 estaría representada por un perfil Th1 secretor de IFNγ.

5. Determinación de la respuesta inmune de memoria inducida por las vacunas génicas

Habiendo demostrado que los grupos: pP+pCD40L+Ady101 y pP+pIL15+Ady101 presentaron una protección frente al desafío viral del 60 y 80 % respectivamente, se evaluó la incorporación de un último refuerzo con el VFAi (dosis subinmunizante) con el propósito de estimular una respuesta de memoria para amplificar la respuesta específica contra los antígenos virales y evocar otros mecanismos complementarios a los inducidos por la vacuna génica.

Para ello, se vacunaron animales con el esquema usado hasta ahora (100 µg de cada vacuna), 4 veces con un intervalo de 14 días entre inoculaciones, por vía id y se les dio un último refuerzo con una dosis de VFAi subinmunizante por la misma vía.

5.1. Determinación de la dosis subinmunizante de VFAi

Con el fin de seleccionar la dosis subinmunizante de VFAi, se realizó una curva dosis respuesta. Para ello se inmunizaron grupos de ratones (n= 5) con diferentes concentraciones de VFAi (0,025; 0,05; 0,1; 0,75; 1 y 5 µg /ratón) y a los 7 dpv se los desafió con $10^{4,2}$ DICT50 de VFA O1Campos activo y posteriormente se evaluó el porcentaje de ratones vacunados protegidos/ratones desafiados (Fig. 32)

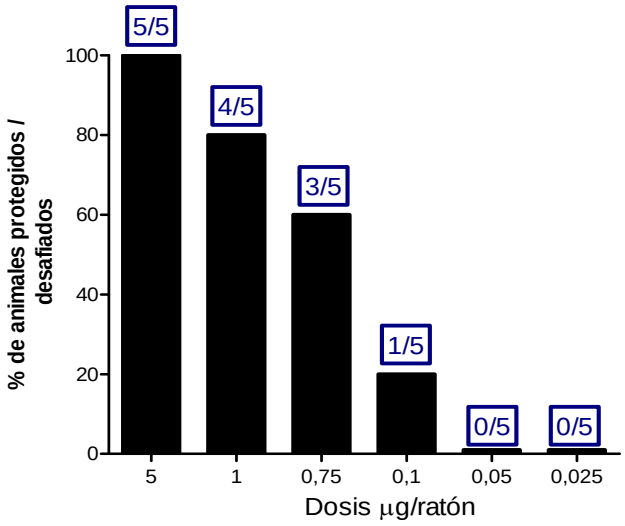


Fig. 32.: Selección de dosis subinmunizante de VFA: en el gráfico se muestra el porcentaje de protección inducido en los animales luego de vacunar los ratones BALB/c con diferentes dosis de VFAi a los 7 dpv. Cada barra representa el % de ratones vacunados protegidos/total de animales vacunados desafiados. El recuadro indica el número de animales con viremia indetectable (protegidos) / el número de animales desafiados.

Como se observa en la Fig. 32, a los 7 dpv, los grupos vacunados con 5, 1 y 0,75 µg /dosis presentaron un alto porcentaje de animales protegidos (100, 80 y 60%, respectivamente). Se seleccionó por lo tanto, como dosis subinmunizante 0,1 µg/ml ya que induce protección solamente en el 20% de los ratones vacunados.

Habiendo determinado la dosis, se realizó un esquema de vacunación con la vacuna génica como se muestra en la Fig. 33 inoculando como se describió anteriormente con 100µg de pP en presencia de pCD40L o pIL15 y 0,1 µg de VFAi a los 7 días previos al

desafío viral. Para ello se inmunizaron ratones BALB/c, evaluando la respuesta protectora inducida por las diferentes formulaciones.

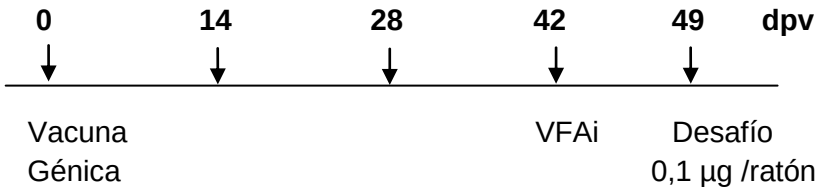


Fig. 33: Esquema de inmunización. Se inmunizaron ratones BALB/c 4 veces con 100 µg de cada vector cada 14 días, a los 49 dpv se vacunó con una dosis subinmunizante de VFAi (0,1µg/D) y a los 49 dpv se realizó el desafío viral con VFA O1Campos.

	% protección (sin refuerzo con VFAi)	% protección (con refuerzo con VFAi)
pP	0	80
pP+pCD40L+Ady 101	60	100
pP+pIL15+Ady 101	80	100
pCI-neo	0	20
VFAi	0	20
*Vacuna comercial	100	100

Tabla 6. Protección inducida en ratones inmunizados con las diferentes formulaciones vacunales: A los 49 dpv los ratones fueron vacunados con VFAi (dosis subinmunizante) y a los 49 dpv desafiados con $10^{4,2}$ DICT50 de VFA O1Campos. Se midió la viremia sobre células BHK-21 a las 24 h post desafío como fue detallado en materiales y métodos. Se representa el porcentaje de protección alcanzado para cada grupo. Los números indican el porcentaje de animales protegidos/cantidad de animales desafiados.*Nota: la vacuna comercial se aplicó en una sola dosis y el desafío se realizó a los 21 dpv.

En la tabla 6, se observa que al incorporar una dosis mínima de virus inactivado se obtuvo el 100 % de protección en los grupos: pP+pIL15+Ady101, y pP+pCD40L+Ady101; 80 % en pP y sólo un 20 % en los grupos VFAi y pCI-neo.

Como se observa en la tabla 6, con este esquema de vacunación y refuerzo con virus inactivo se logró inducir una protección similar a la generada por una vacuna comercial. Indicando una respuesta adaptativa de memoria.

5.2. Esquemas de vacunación *prime and boost* con virus inactivo con menor dosis de vacuna génica y con una dosis subinmunizante de VFAi

Por último con el objetivo de estudiar si se podía potenciar la respuesta a VFA utilizando dosis subinmunizantes ya sea de la vacuna génica como del VFAi se evaluaron diferentes protocolos de vacunación utilizando una concentración de vacuna génica que

induce un título bajo de acs como se mostró en la tabla 3 (50 µg /ratón), y con un refuerzo utilizando una dosis subinmunizante de VFAi (0,1 µg /dosis). También se evaluó la respuesta inducida cuando se inoculan los animales con: 3, 2 y una dosis de ADN (50 µg /ratón) y una dosis de 0,1 µg /ratón de VFAi.

5.3. Esquema de inmunización con 3 dosis de vacuna génica (50 µg/dosis) y refuerzo

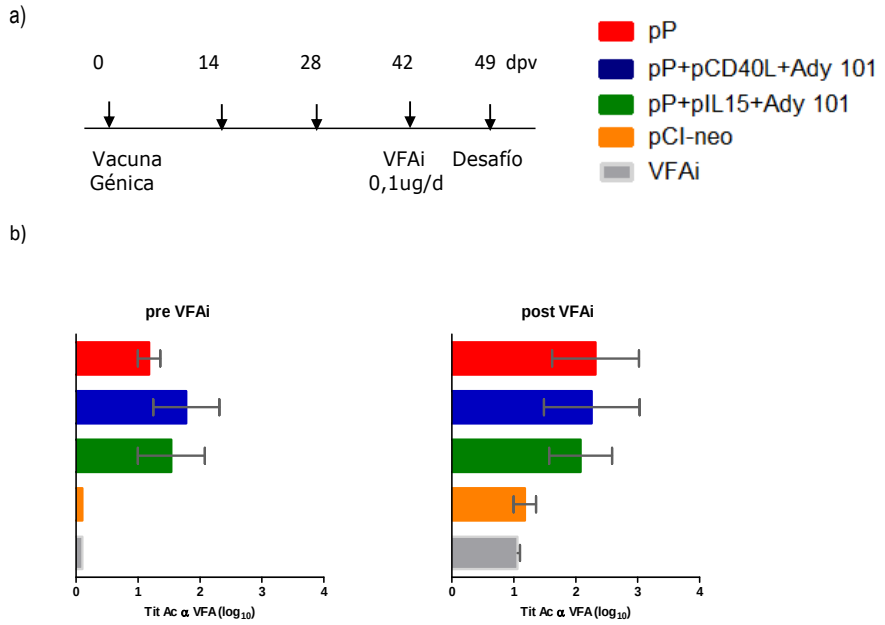


Fig. 34: Respuesta inmune humoral y protectora inducida en los ratones inmunizados con diferentes formulaciones vacunales utilizando 50 µg /ratón en el plásmido pP y con un último refuerzo con VFAi. a) Esquema de inmunización. Se inmunizaron ratones BALB/c con 50 µg de cada vacuna ,3 veces con un intervalo de 14 días entre inoculaciones, por vía i.d (5 ratones/grupo), a los 42 dpv los ratones recibieron una dosis subinmunizante de VFAi (0,1µg/dosis) y finalmente a los 49 dpv se realizó el desafío viral con VFA. **b) Respuesta inmune humoral**: A los 42 y el 49 dpv, se determinó por ELISA, la presencia de acs específicos anti-VFA en muestras de suero. El título de cada suero se calculó como el logaritmo en base 10 de la mayor dilución que supera en DO al punto de corte, siendo el punto de corte la media de la absorbancia de los sueros provenientes de ratones inmunizados con pCI-neo + 2 DS.

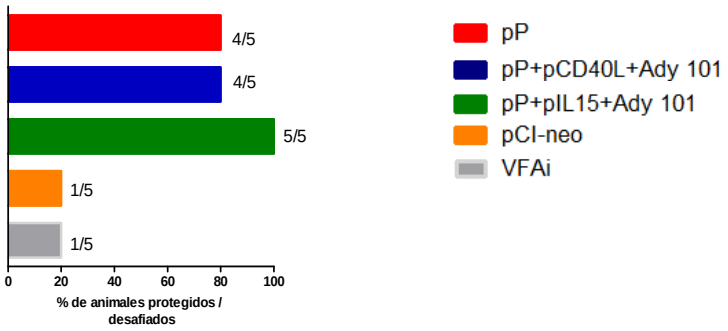


Fig. 35: Respuesta inmune protectora: A los 59 dpv los ratones inmunizados fueron desafiados con $10^{4,2}$ DICT50 del VFA O1Campos**.** Se midió la viremia sobre células BHK-21 a las 24 h post desafío como fue detallado en materiales y métodos. Se representa el porcentaje de protección alcanzado para cada grupo. Los números indican la cantidad de animales protegidos/cantidad de animales desafiados.

En la Fig. 34b se muestra el análisis de la respuesta inmune humoral pre y post inoculación de VFAi (dosis subinmunizante). Como se observa, se indujeron bajos títulos de acs dirigidos contra el VFA (con títulos < 2) cuando se inmuniza con esta dosis de ADN (50 µg), de acuerdo a lo esperado según lo descripto en la tabla 3, esos niveles de acs fueron manifiestamente aumentados al inocular con el virus inactivo alcanzando niveles de acs superiores a 2.

En la Fig. 35 se observa que luego de aplicar la dosis de 0,1 µg/ratón de VFAi, se obtuvo el 100% de protección en el grupo de pP+pIL15+Ady101, un 80% de protección en los grupos pP y pP+pCD40L+ Ady101 mientras que en los grupos VFAi y PCI-neo sólo un 20 % de los ratones estuvieron protegidos. Al realizar un estudio más detallado de la respuesta inmune humoral se observó que si bien no hay diferencias en el título de acs IgG totales (Fig. 34) o en sus los isotipos (Fig.36 c) ni el nivel de IgA (Fig. 36 b); se encontraron diferencias significativas en el título de acs IgM del grupo pP+pCD40L+Ady101 y pP+pIL15+Ady101 con respecto al grupo pP ($p<0.05$) (Fig. 36a).

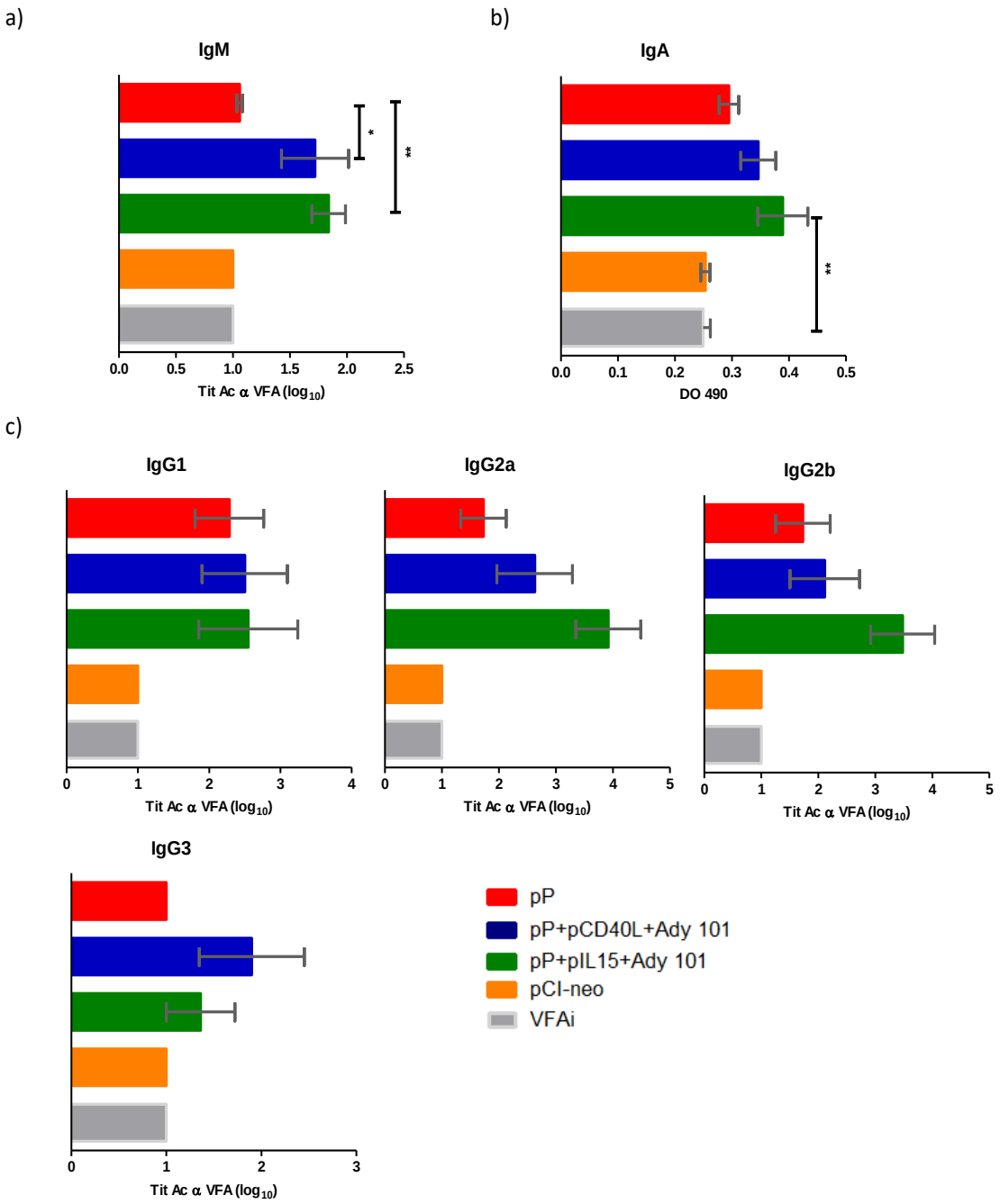


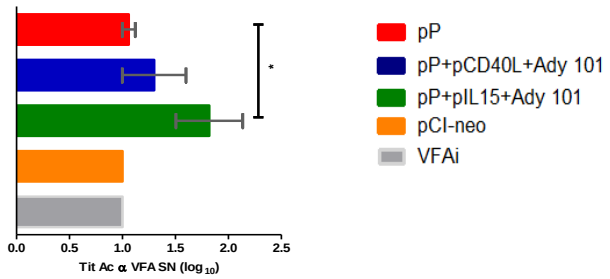
Fig. 36: Respuesta humoral inducida en los ratones inmunizados con diferentes formulaciones vacunales utilizando 50 μg/ratón del plásmido pP y con un último refuerzo con VFAi a) A los 49 dpv, 7 días post refuerzo con VFAi se determinó por ELISA, la presencia de acs específicos IgM anti-VFA O1Campos en muestras de suero. Se expresa el título de cada suero como la inversa de la última dilución igual o mayor a la del punto de corte, calculado como la DO media de los sueros provenientes de los ratones inmunizados con pCI-neo ± 2DS. (*p<0,05, **p<0,01 test ANOVA post test Dunnet). b) Niveles de IgA sérica específica para VFA en ratones vacunados con las diferentes formulaciones a los 49 dpv. Los sueros en dilución 1:50 se evaluaron por la técnica de ELISA. Los valores graficados en eje de las ordenadas corresponden al valor de densidad óptica medida a 490 nm. c) A los 49 dpv se midieron por medio de un ELISA los títulos de las inmunoglobulinas específicas anti-VFA IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 presentes en los sueros de ratones inoculados con las diferentes formulaciones vacunales. El título de cada suero se calculó como el logaritmo en base 10 de la mayor dilución que supera en DO al punto de corte, siendo el punto de corte la media de la absorbancia de los sueros provenientes de ratones inmunizados con pCI-neo + 2 DS.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Por otro lado, como se observa en la Fig. 37 a, el nivel de los acs seroneutralizantes de los ratones inmunizados con pP+pIL15+Ady101 fue significativamente superior ($p<0.05$) al grupo pP. En el grupo pP+pCD40L+Ady101 si bien no se detectó un incremento significativo de los acs neutralizantes, se encontró en uno de los sueros (de 5 analizados) un nivel alto de acs SN de 2,5 (dato no mostrado).

Las medias de los indices de avidez de los acs específicos contra el virus, presentes en los sueros de los ratones inmunizados con las diferentes vacunas génicas fue superior al 60 %.

a)



b)

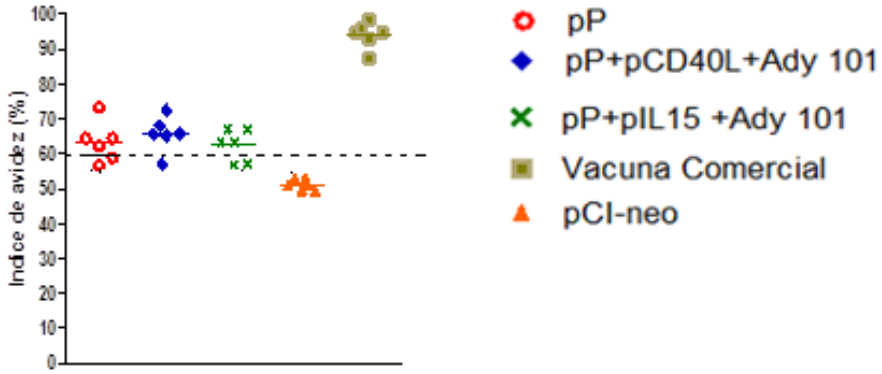


Fig. 37: **Estudio de las propiedades de los acs anti-VFA inducidos por la vacunación.a) Títulos de Acs SN inducidos**: El título seroneutralizante está expresado como el logaritmo de la inversa de la última dilución de suero incapaz de neutralizar 100 DICT50 de VFA. (*p< 0,05 test ANOVA y un post test de Dunnet). **b) Índice de avidez de los acs anti-VFA O1Campos** a los 49 dpv. El índice de avidez se calculó como el porcentaje de la relación entre: la densidad óptica del pocillo que contenía el suero de cada uno de los animales inmunizados con las diferentes formulaciones vacunales tratado con urea y la densidad óptica de otro pocillo idéntico pero sin tratar con urea. Cada punto representa el índice de avidez de cada ratón dentro del grupo vacunal. Las líneas indican la avidez promedio de cada grupo. La línea punteada representa un índice avidez del 60 % que correlacionaría con buena protección.

5.4. Esquema de inmunización con 2 dosis de vacuna génica (50 μg) y refuerzo con VFAi (0,1 μg/dosis)

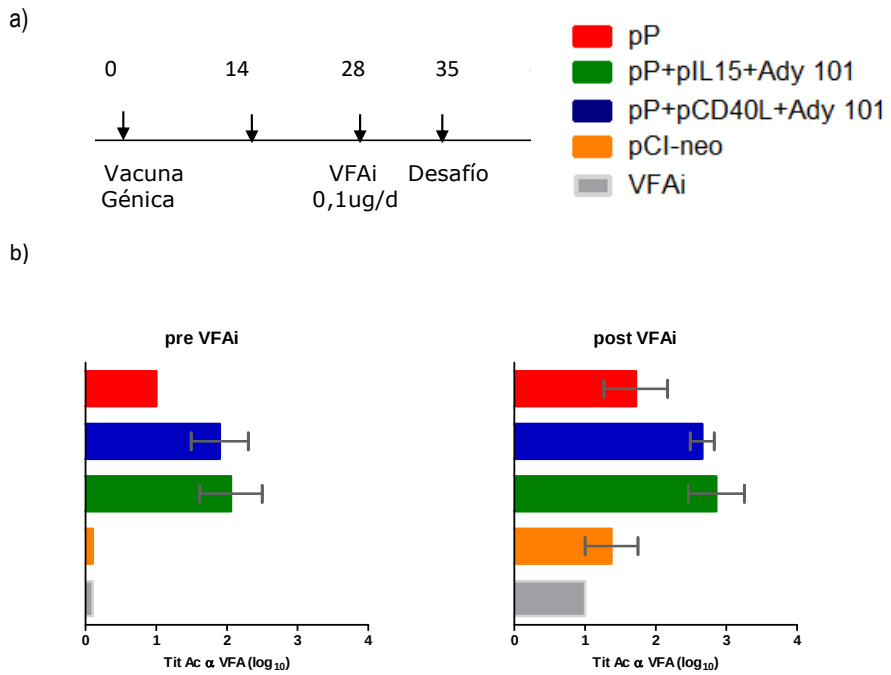


Fig. 38. Respuesta inmune humoral inducida en los ratones inmunizados con diferentes formulaciones vacunales utilizando 50 μg /ratón en el plásmido pP y con un último refuerzo con VFAi. a) Esquema de inmunización. Se inmunizaron ratones BALB/c con 50 μg de cada vacuna 2 veces con un intervalo de 14 días entre inoculaciones, por vía i.d (5 ratones/grupo), a los 28 dpv recibieron una dosis subinmunizante de VFAi (0,1 μg /dosis) y finalmente a los 35 dpv se realizó el desafío viral con VFA. **b) Respuesta inmune humoral**: A los 28 y 35 dpv, se determinó por ELISA, la presencia de acs específicos anti-VFA en muestras de suero. El título de cada suero se calculó como el logaritmo en base 10 de la mayor dilución que supera en DO al punto de corte, siendo el punto de corte la media de la absorbancia de los sueros provenientes de ratones inmunizados con pCI-neo + 2 DS.

En las Fig. 38a se muestra el esquema de inmunización de los ratones que recibieron 2 dosis de vacuna génica previa y posterior al refuerzo con VFAi (dosis subinmunizante). En las Fig. 38b y Fig. 39 se representan el nivel de acs y la protección inducida en los ratones. En la Fig. 38 se observa un rápido aumento de casi un logaritmo en el título de acs totales contra VFA para todas las vacunas en el esquema de dos dosis de vacuna génica y refuerzo con VFAi. Estos resultados indicarían la presencia de LB de memoria, generados durante la sensibilización con la vacuna génica.

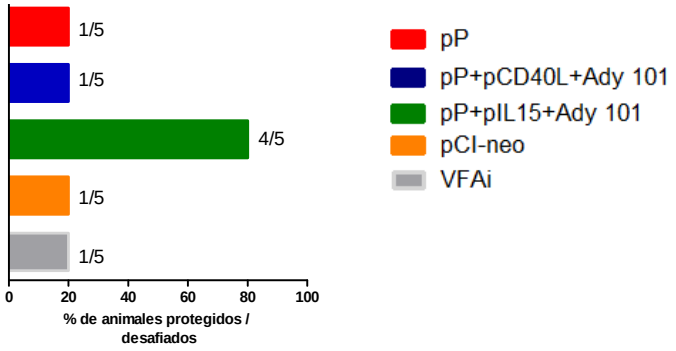


Fig. 39: Respuesta inmune protectora inducida en los ratones inmunizados con diferentes formulaciones vacunales utilizando 50 μg /ratón en el plásmido pP y con un último refuerzo **con VFAi.** A los 35 dpv los ratones inmunizados fueron desafiados con $10^{4,2}$ DICT50 del VFA O1Campos**.** Se midió la viremia sobre células BHK-21 a las 24 h post desafío como fue detallado en materiales y métodos. Se representa el porcentaje de protección alcanzado para cada grupo. Los números indican la cantidad de animales protegidos/cantidad de animales desafiados.

Al reducir el número de dosis con la vacuna génica de tres a dos dosis (Fig. 39) se observa una clara disminución en el número de ratones protegidos para los grupos vacunados con pP y pP+pCD40L+Ady101, ya que de una protección del 80 % se redujo a una protección del 20 %, valor similar al obtenido en el grupo que sólo recibió VFAi. Sorprendentemente, no fue así para el grupo pP+pIL15+Ady101 en donde la protección se mantuvo alta con un valor del 80 %. Al realizar un estudio más detallado de la respuesta inmune humoral se observó que no se han encontrado diferencias en el título de acs IgG totales (Fig. 38) o en sus los isotipos (Fig. 40 c) ni el nivel de IgA (Fig. 40b).

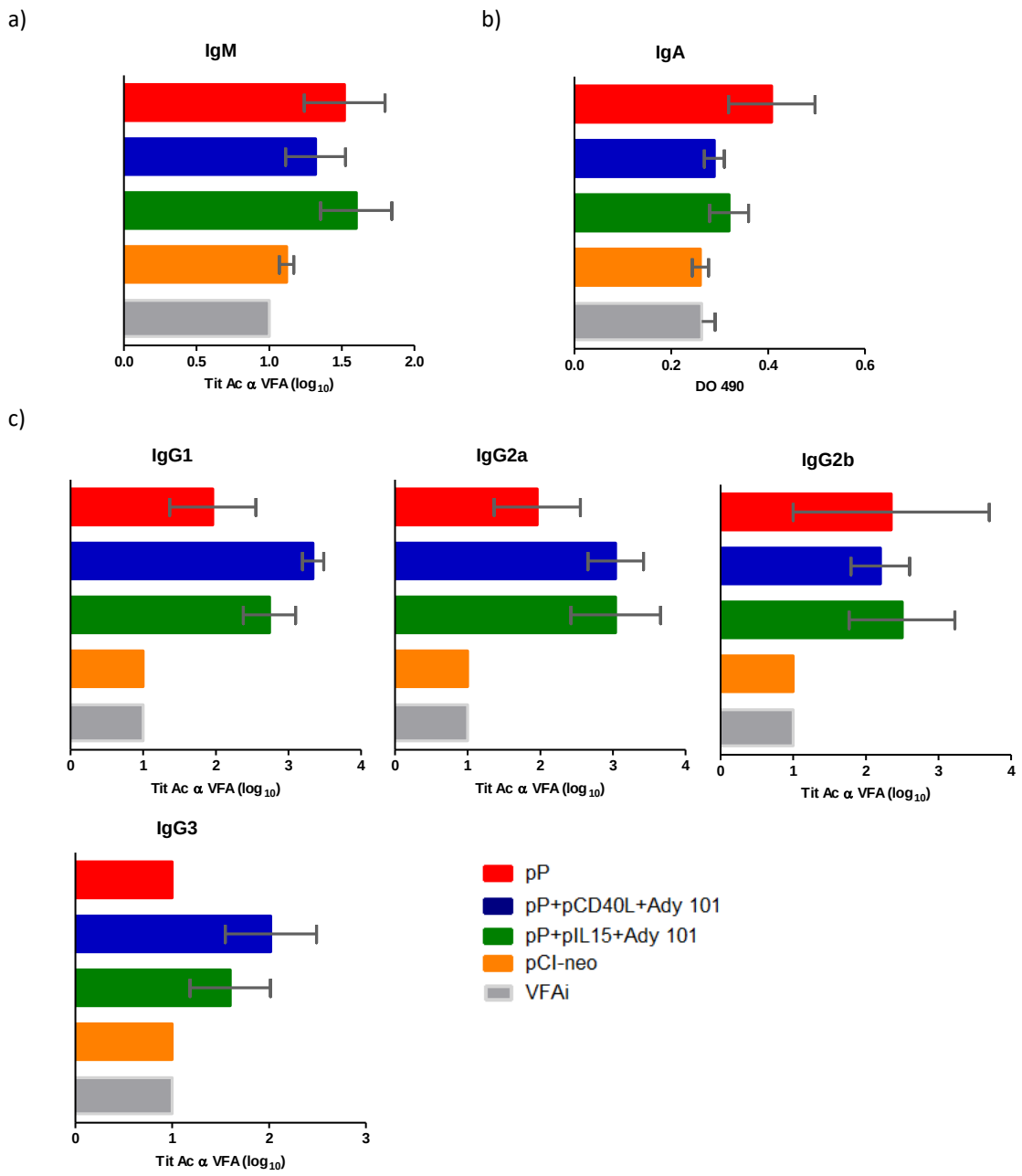


Fig. 40: Respuesta humoral inducida en los ratones inmunizados con diferentes formulaciones vacunales utilizando 50 µg/ratón del plásmido pP y con un último refuerzo con VFAi a) A los 35 dpv, 7 días post refuerzo con VFAi se determinó por ELISA, la presencia de acs específicos IgM anti-VFA en muestras de suero (*p<0,05, **p<0,01 test ANOVA post test Dunnet) b) Niveles de IgA sérica específica para VFA en ratones vacunados con las diferentes formulaciones a los 35dpv. Los sueros en dilución 1:50 se evaluaron por la técnica de ELISA. Los valores graficados en eje de las ordenadas corresponden al valor de densidad óptica medida a 490 nm. c) A los 35 dpv se midieron por medio de un ELISA los títulos de las inmunoglobulinas específicas anti-VFA O1Campos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 presentes en los sueros de ratones inoculados con las diferentes formulaciones vacunales. El título de los subtipos de IgGs y la IgM de cada suero se calculó como el logaritmo en base 10 de la mayor dilución que supera en DO al punto de corte, siendo el punto de corte la media de la absorbancia de los sueros provenientes de ratones inmunizados con pCI-neo + 2 DS.

Por otra parte, las medias de los índices de avidez de los acs específicos contra el virus, presentes en los sueros de los ratones inmunizados con las diferentes vacunas génicas fueron superiores al 60% (Fig. 41).

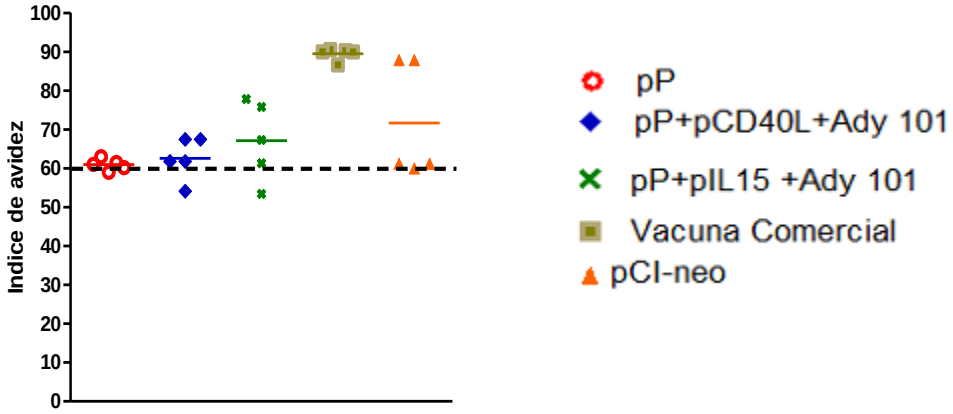


Fig 41. Estudio de las propiedades de los acs anti-VFA inducidos por la vacunación. Indice de avidez de los acs anti-VFA a los 35 dpv. El índice de avidez se calculó como el porcentaje de la relación entre: la densidad óptica del pocillo que contenía el suero de cada uno de los animales inmunizados con las diferentes formulaciones vacunales tratado con urea y la densidad óptica de otro pocillo idéntico pero sin tratar con urea. Cada punto representa el índice de avidez de cada ratón dentro del grupo vacunal. Las líneas indican la avidez promedio de cada grupo. La línea punteada representa un índice avidez del 60 % que correlacionaría con buena protección.

Finalmente, se realizo un esquema de una sola dosis de vacuna génica y un refuerzo con VFAi subinmunizante (Fig. 42a).

5.5. Esquema de inmunización con una dosis de vacuna génica (50 μg) y refuerzo con VFAi (0,1 μg/dosis)

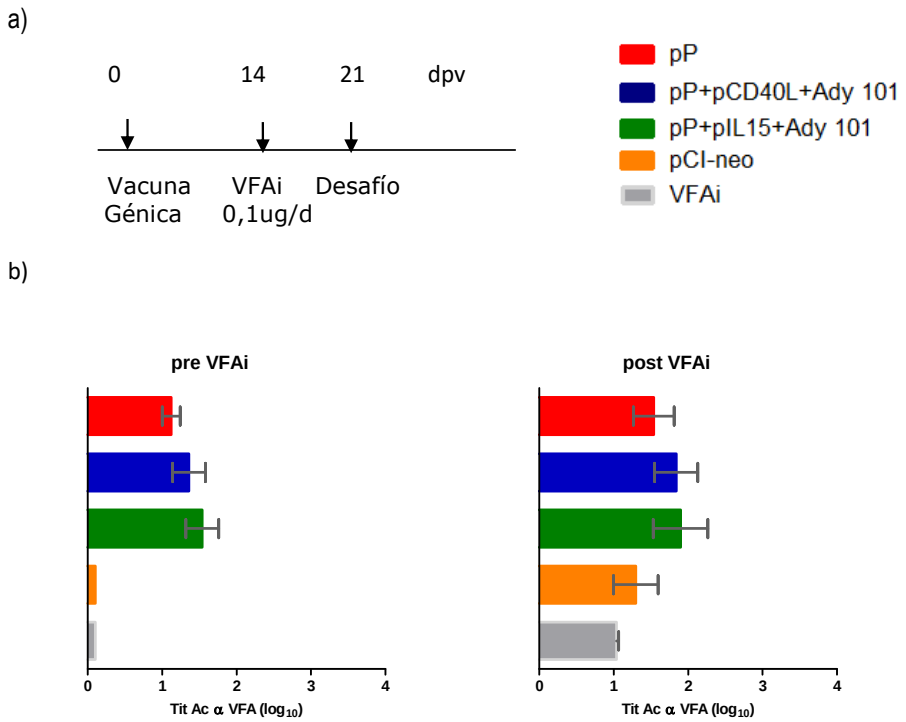


Fig. 42. Respuesta inmune humoral inducida en los ratones inmunizados con diferentes formulaciones vacunales utilizando 50 μg /ratón en el plásmido pP y con un último refuerzo con VFAi. a) Esquema de inmunización. Se inmunizaron ratones BALB/c con 50 μg de cada vacuna 1 vez por vía i.d (5 ratones/grupo), a los 14 dpv recibieron una dosis subinmunizante de VFAi (0,1 μg/dosis) y finalmente a los 21 dpv se realizó el desafío viral con VFA. **b) Respuesta inmune humoral**: A los 14 y 21 dpv, se determinó por ELISA, la presencia de acs específicos anti-VFA en muestras de suero. El título de cada suero se calculó como el logaritmo en base 10 de la mayor dilución que supera en DO al punto de corte, siendo el punto de corte la media de la absorbancia de los sueros provenientes de ratones inmunizados con pCI-neo + 2 DS.

Con el esquema de una sola dosis de vacuna génica y un refuerzo con VFAi subinmunizante, se manifestó la presencia de mecanismos efectores alternativos a la inmunidad humoral en el grupo vacunado con pP+pIL15+Ady101, ya que en estos animales los acs estimulados fueron bajos (<2) (Fig. 42b), y aun así, luego del desafío con virus activo aunque se observó una baja protección (Fig. 43a), presentaron una reducción de la viremia (Fig. 43b).

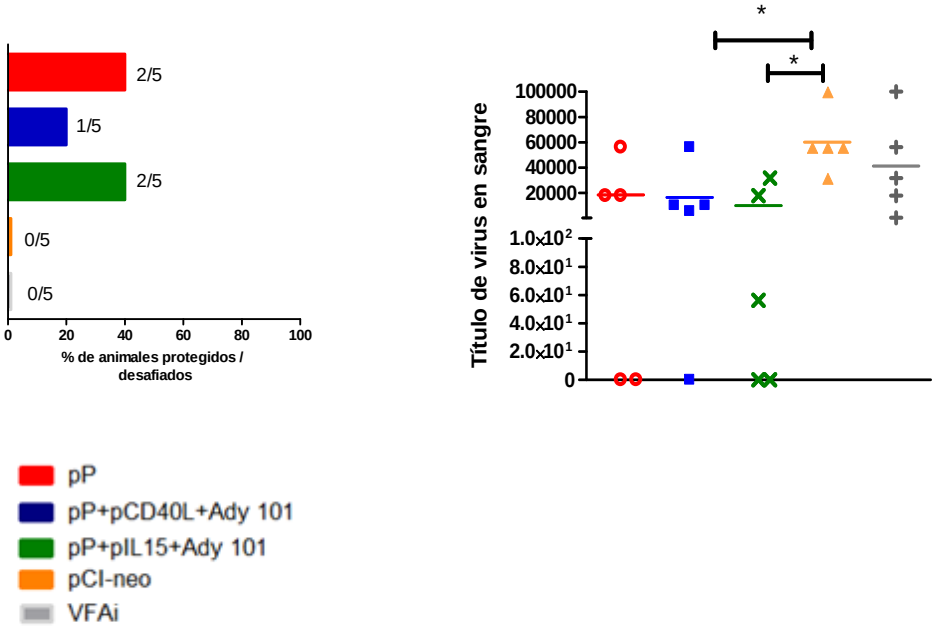


Fig. 43. Respuesta protectora inducida en los ratones inmunizados con diferentes formulaciones vacunales utilizando 50 μg /ratón en el plásmido pP y con un último refuerzo con VFAi. a) Respuesta inmune protectora: A los 21 dpv los ratones inmunizados fueron desafiados con $10^{4,2}$ DICT50 del VFA O1Campos**.** Se midió la viremia sobre células BHK-21 a las 24 h post desafío como fue detallado en materiales y métodos. Se representa el porcentaje de protección alcanzado para cada grupo. Los números indican la cantidad de animales protegidos/cantidad de animales desafiados. **b) Titulación de virus en sangre**: la sangre heparinizada de los animales vacunados y desafiados fue evaluada sobre BHK21, para ello se sembraron diluciones de la misma y se leyó el efecto citopático. (*p<0,05 test ANOVA y un post test *Dunnet*).

En resumen, estos últimos resultados permiten concluir que el refuerzo con el VFAi, no solamente indujo un rápido aumento en el título de acs sino que con este tratamiento se activaron mecanismos inmunes complementarios que colaboraron con los estimulados en un primer término con la vacuna génica y consecuentemente frente a una exposición con el VFA activo llevaron a la protección total del 100 % de los ratones. La disminución de la concentración de ADN y del número de dosis junto con la estimulación con virus inactivo (dosis subinmunizante), manifestó la presencia de una respuesta inmune para las todas las vacunas génicas y destacó la efectividad de pP+pIL15+Ady para alcanzar una buena activación de las células inmunocompetentes para combatir la infección al VFA.

DISCUSIÓN

La FA es una infección viral altamente contagiosa. Características como su amplio rango de hospedadores, su capacidad de infectar en bajas dosis, su rápida tasa de replicación, sus altos niveles de excreción y sus múltiples formas de transmitirse, hacen de la FA una enfermedad difícil y costosa de erradicar.

La vacuna actual es dependiente del uso de virus inactivado producido en instalaciones de alta contención, la misma tiene varios puntos conflictivos como los altos gastos de instalación y de funcionamiento, la limitación en el almacenamiento, la pobre estabilidad de la vacuna a temperatura ambiente y su dificultad de distinguir animales vacunados de los infectados por tener en su formulación proteínas no estructurales. Por otro lado, si bien las vacunas inactivadas químicamente son capaces de controlar la enfermedad con éxito, sólo ofrecen protección a corto plazo contra la infección por el VFA del mismo serotipo que la cepa vacunal (Barterling et al., 2002). Además, estas vacunas tienen potenciales problemas de seguridad como la inactivación incompleta del virus usado como inmunógeno y el escape del virus vivo desde las plantas de fabricación. Por eso, a lo largo de estos años se han evaluado diferentes vacunas alternativas como la vacuna génica, vacunas a subunidades proteicas o peptídicas, partículas similares al VFA (VLPs), plataformas con vectores virales y vacunas a microorganismos vivos modificados. De todas estas alternativas, la vacuna de ADN es el método más versátil, económico y simple de inducir respuestas inmunes humorales y celulares protectoras. Además, las vacunas de ADN son atractivas porque el ADN plasmídico no requiere instalaciones de alta contención para la producción, es relativamente estable para el almacenamiento, permite la rápida incorporación de las nuevas secuencias de cepas de campo y permite la discriminación entre animales infectados y vacunados contra el VFA (Anderson ED et al., 1996).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo de tesis fue evaluar la eficacia de vacunas génicas que codifican para antígenos del VFA en presencia de adyuvantes moleculares y un adyuvante químico para potenciar la respuesta inmune y dilucidar algunos de los mecanismos inmunológicos inducidos por las formulaciones que llevaron a una mejor respuesta protectora *in vivo*.

En este trabajo de tesis, inicialmente se obtuvieron los plásmidos vacunales con los genes que codifican para la proteína VP1 y la poliproteína P1 las proteinasas 2A y 3C del VFA de la cepa O1 Campos, y posteriormente, se realizó una selección de la mejor construcción a utilizar. Se trabajó con el antígeno VP1 debido a su alta capacidad inmunogénica (Zou et al., 2010; Xiao et al., 2007; Carrillo C, et al., 2001). En el caso de la forma VP1 secretada, se eligió con el objetivo de inducir una respuesta humoral para producir acs neutralizantes y para activar los mecanismos efectores dependientes de acs como son la opsonización, la fagocitosis y la activación del complemento por la vía clásica.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La proteína VP1s sería endocitada por las CPAs, procesada en péptidos y estos serían presentados en el contexto de MHCII a los LT CD4. En el caso de la VP1 citosólica, se seleccionó para inducir una respuesta citotóxica, ya que la mencionada proteína expresada por las células transfectadas *in vivo*, sería procesada en fragmentos y éstos serían presentados asociados a las moléculas del MHCI, a los LT CD8 *naive*, activándolos y diferenciándolos en LT CD8 efectores, los cuales podrían lisar a las células infectadas por el virus. Por otro lado, se seleccionó como inmunógeno a la poliproteína P1 ya que en numerosos trabajos se ha propuesto que el empleo de cápsides vacías del VFA induce una respuesta inmune comparable a la obtenida con la infección viral (Rweyemamu et al.,1979; Zheng et al., 2006; Li et al., 2006) debido a que posee epítopes T y B importantes para la protección frente al desafío (Asfort et al., 2014) y porque se observó que este antígeno utilizado en diferentes vacunaciones inducen una respuesta inmune contra VFA, como en su forma de vacuna génica (Fowler et al., 2012); de vacunas a proteínas (Wang et al., 2012); de vacunas que utilizan vectores virales (D´Antuono et al., 2010) y de las VLPs (Migniaqui et al., 2012).

El vector pVP1s, que expresa la proteína VP1 secretada de la cepa O1 Campos del VFA fue construido insertando un péptido señal de secreción del plásmido comercial pSegTag2b. Si bien la expresión *in vitro* de VP1s en células BHK no pudo ser demostrada por Western blot ni en el sobrenadante de las células transfectadas por ELISA, se demostró dicha expresión *in vivo* cuando se indujo una respuesta de acs específicos contra el VFA co-inoculando el pVP1s junto a pCD40L en ratones. Esto puede deberse a que la baja expresión de la VP1s no podría ser detectado en el sobrenadante de cultivo de las células transfectadas por *western blot* o por ELISA; pero sí por el sistema inmune. Por otro lado, la expresión de pVP1c se demostró por transfección *in vitro* y *western blot*.

En relación a pP, se demostró su expresión por *western blot*, detectándose no sólo VP1 sino también VP3. Asimismo, por citometría de flujo, se pudo comprobar la expresión de las moléculas CD40L y RANKL en células BHK transfectadas.

Con el objeto de evaluar la capacidad de las vacunas génicas mencionadas de inducir inmunidad, se inocularon por vía intradérmica ratones BALB/c con los diferentes plásmidos y posteriormente se midieron los acs específicos contra VFA ya que se ha comprobado que la inducción de una respuesta con altos niveles de acs específicos contra proteínas capsidales garantiza una inmunidad adecuada y protección contra este virus (Periolo et al., 1993; Van Bekkum et al., 1969; Van Maanen and Terpstra 1989; Maradei et al., 2008). Además, para evaluar la potencia de las vacunas, se utilizó el modelo de inmunización y desafío viral desarrollado y validado en nuestro grupo para la selección de vacunas de buena calidad (Gnazzo et al., 2013).

La construcción pVP1c indujo en los ratones bajo niveles de acs contra VFA (títulos menores a 2) y no estuvieron protegidos frente al desafío viral. Se trató entonces, de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

mejorar su respuesta inmune adicionando a pVP1c los genes que codifican para las moléculas coestimuladoras CD40L o RANKL. En este trabajo, con el objeto de incrementar la respuesta inmune humoral y protectora, se usó un solo vector, en el que los genes de las moléculas coestimuladoras fueron unidos al gen VP1c por el IRES. Esta secuencia es un sitio interno de entrada al ribosoma que consisten en regiones que actúan en *cis* reclutando a la maquinaria de traducción a una posición interna en el ARNm permitiendo la traducción del marco abierto de lectura de un ARN mensajero a pesar de carecer de la modificación Cap en su extremo 5'. Si bien otros investigadores también han utilizado exitosamente esta estrategia para unir genes (Mingzi Jiang et al., 2014; Cui Ba et al., 2006), en este trabajo de investigación, el uso del IRES en el plásmido no llevó a un incremento en la respuesta humoral ni en la respuesta protectora. Por lo cual, habría que realizar un estudio de transfección *in vitro* para evaluar si las construcciones VP1c-CD40L y pVP1c-RANKL, afectan la expresión de los genes de VP1c, CD40L o RANKL en comparación a la expresión al inocular los 2 genes en plásmidos por separado (VP1c y CD40L o VP1c y RANKL). Por otro lado, estos resultados podrían deberse a que VP1c por ser una versión citosólica, no estaría bien expuesta al sistema inmune para inducir acs o el antígeno expresado no es suficiente para generar una respuesta inmune efectiva. Lo cual, está en concordancia con varios estudios, en los que se ha observado que la respuesta inmune humoral contra enfermedades virales puede mejorar si los antígenos transgénicos son diseñados de forma secretada como el antígeno 45 W de *Taenia ovis* (Drew DR et al., 2000), la glicoproteína de HIV (Fomsgaard A et al., 1999) y la glicoproteína de la rabia (Xiang ZQ et al., 1995). En este sentido, Boyle y colaboradores evidenciaron que la localización de los antígenos afecta a la activación de los LB para una vacuna génica que codifica para ovalbúmina. En este estudio, se demostró que la forma citosólica y de membrana de la ovalbúmina tanto inoculadas por vía intradérmica como intramuscular inducían en los ratones una respuesta humoral más baja que la forma secretada (Boyle et al., 1997). Asimismo, este fenómeno también se ha observado en vacunas génicas contra el VFA, como en el trabajo reportado por Kim en el que se muestra que la inoculación tanto por vía intramuscular como por la inoculación seguida de una electroporación de un plásmido que codifica para VP1s induce un mejor título de acs contra VP1 que una vacunación con un plásmido que codifica para VP1c (Kim et al., 2006). Por lo tanto, se decidió estudiar la respuesta inmune humoral y protectora inducida por pVP1s. Sin embargo, esta construcción arrojó resultados similares a los producidos al inmunizar con pVP1c. Entonces, para incrementar la respuesta inmune se co-inocularon los plásmidos pCD40L y pRANKL junto a pVP1 ya que los resultados obtenidos con pVP1c unidos a CD40L o RANKL no fueron exitosos. Cuando se co-inoculó pCD40L junto a pVP1s se observó un leve incremento de la respuesta inmune humoral y una pequeña disminución de la viremia en los ratones vacunados y desafiados. Este resultado se correlaciona con lo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

visto por Tripp y por Ihata y colaboradores, los cuales observaron que la expresión de la molécula CD40L incrementa la respuesta en acs de la vacuna génica que codifica para la proteína F y G del Virus Sincicial Respiratorio (VSR) (Tripp RA et al., 2000), o cuando se inmunizaron ratones con una vacuna génica contra el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) y la molécula CD40L (Ihata A. et al., 1999).

Cuando se adicionó pRANKL a la formulación de pVP1s, en este trabajo de investigación no se indujo respuesta humoral ni protección contra VFA en contraposición a lo reportado por Miyahira y colaboradores (Miyahira et al., 2003) quienes lograron inducir un incremento de la respuesta humoral cuando inmunizaron ratones con una vacuna génica que codifica para la proteína TSSA del *Tripanozoma cruzi* asociada a esta molécula coestimuladora.

A diferencia de lo observado en los grupos vacunados con pVP1s y pVP1c, la inoculación de pP indujo buenos niveles de acs específicos contra VFA. Esto puede ser debido a que pP codifica para varios antígenos, no sólo para VP1 sino también para las proteínas VP2 y VP3 que contienen determinantes antigénicos importantes para la protección frente al desafío con el VFA (Asfort et al., 2014). Por otro lado, se ha observado en trabajos previos que este antígeno P1 es mejor que la VP1 ya que podría estar emulando mejor la respuesta del VFA, como en el trabajo de Kim (Kim et al., 2006) y Yang (Yang et al., 2005), en el que se han inmunizado ratones por medio de una incoulación seguida de la electroporación o utilizando el *gene gun* con vacunas génicas formuladas para expresar al antígeno VP1 en diferentes compartimientos celulares (en membrana, citoplasma o secretado) y a la proteína la poliproteína del virus O Taiwan. En este último trabajo, demostraron que la vacuna génica que codificaba para la poliproteína generó una mejor respuesta protectora frente al desafío. Asimismo, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demostraron que para inducir una buena respuesta humoral utilizando el vector plasmídico pP como inmunógeno requiere de al menos uno o más refuerzos. En varios trabajos previos se demostró que las vacunas génicas necesitan al menos 2 inoculaciones para generar un buen título de acs como en el trabajo de Liu (Liu et al., 2006) en el que inmunizaron cobayos con P12X3C3D (que incluye a P1, 3D y parte de 2B) junto a la citoquina IFNα o en el trabajo de Mingxiao (Mingxiao et al., 2007) en el que inmunizaron cerdos con una vacuna génica que codificada para P1 y la IL18.

En esta investigación, si bien el antígeno P1 indujo una buena respuesta humoral contra el VFA después de varios refuerzos, no generó una respuesta protectora, incluso cuando se adicionó a la vacuna génica la molécula coestimuladora CD40L o una citoquina como la IL15, la cual en vacunas contra otros patógenos como la *Brucella abortus* incrementó la respuesta inmune humoral (Hu XD et al., 2010). Posiblemente la diferencia en los resultados obtenidos en este trabajo usando vacunas que contienen al plásmido que codifica para P1 con las vacunas previamente citadas que utilizan el mismo antígeno, es la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

forma de inocularlas (Kim et al., 2006 y Yang et al., 2005). Podría ser que el tipo de administración de la vacuna, *gene gun* y la electroporación post-inyección, mejorarían la transfección *in vivo* de los plásmido. Sin embargo a pesar de mejorar la transfección, este tipo de administración de ADN es dolorosa para el animal, requiere de personal entrenado en el uso de estos dispositivos y por lo tanto es más costosa comparada con la administración del ADN desnudo por aguja.

Dado que los adyuvantes moleculares solos no lograron potenciar la respuesta, se decidió incorporar a la formulación el Ady 101, desarrollado por la empresa *Seppic* y que fue seleccionado a partir de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en el marco de una colaboración con dicha empresa. Es un adyuvante experimental que contiene polímeros cargados de alto peso molecular entrecruzados dispersos en agua. Posee las propiedades clásicas de estimular a las células inmunocompetentes, y además, favorece la transfección celular.

Sorprendentemente, el agregado del Ady101 a la vacuna pP, en presencia o no de los adyuvantes moleculares, no mejoró la respuesta humoral con respecto a pP, no se observaron diferencias significaticas en el título ni en la calidad de las inmunoglobulinas inducidas entre estos grupos y el grupo pP. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los isotipos de las inmunoglobulinas, ni en la avidez de los acs y no se detectaron acs seroneutralizantes.

No obstante, cuando se evaluó la respuesta inmune protectora inducida por la vacunación, se alcanzó una protección en el 80% de los ratones del grupo de pP+pIL15+Ady101 y un 60% en los ratones del grupo pP+pCD40L+Ady101. Asimismo, en los ratones no protegidos totalmente se observó una reducción en los títulos de viremia post desafío. El resultado obtenido en relación a los títulos de los acs posiblemente podría deberse a que el nivel de acs inducido en los ratones podrían haber llegado a un *plateau*, en el cual no se puede incrementar dicho título (Tizzard I, 1987). Por lo tanto, la protección frente al VFA observada en los grupos pP+pCD40L+ Ady101 y pP+pIL15+Ady101 podría corresponder a una respuesta inmune celular ya que no se han encontrado acs seroneutralizantes en estos grupos y no se ha visto una diferencia significativa en acs con respecto al grupo pP.

Desde hace muchos años se conoce que la presencia de acs neutralizantes para el VFA no es en muchos casos suficiente para asegurar la protección (Brown and Graves, 1959) y que es posible encontrar animales protegidos con niveles de acs sub-neutralizantes (Liebermann et al., 1993), lo cual señala la importancia que la inmunidad celular podría tener en el control de la enfermedad (Becker et al., 1994). Estos resultados de protección en ausencia de acs seroneutralizantes encontrados en este trabajo, son concordantes con los descriptos por Saenz-Parra y colaboradores, quienes encuentran una protección parcial en cerdos inmunizados con un vector adenoviral que porta el gen

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

P1 del VFA, (Sanz-Parra et al., 1999). Es por ello, que a continuación en este trabajo de tesis se propuso estudiar la participación de mecanismos complementarios a los mediados por la respuesta inmune humoral para alcanzar la protección frente al VFA generada en los grupos inmunizados con pP+pIL15+Ady101 y pP+pCD40L+Ady101, como la activación de los LT y el tipo de respuesta inducida según el tipo de citoquina secretada (IFNγ o IL4) para la activación de una respuesta Th1 o Th2.

Los estudios realizados en este trabajo con los esplenocitos de los ratones inmunizados con las vacunas génicas mostraron la producción de IFNγ frente a la estimulación específica con VFAi, pero no de IL4, indicando la activación de linfocitos asociados a un perfil Th1, con un aumento significativo en la producción de esta citoquina en los grupos vacunados con pP+pIL15+Ady101 y pP+pCD40L+Ady101. Estos resultados se correlacionan con los estudios de Xi Dan Hub et al., 2009, Dubie et al., 2009, en Dong B et al., 2013, en los que se muestra que además de observar un incremento en las poblaciones CD4+ y CD8+ al adicionar a la vacuna génica IL15, se inducen altos niveles de IFNγ. Asimismo, el incremento de IFNγ también ha sido observado en otro estudio en el que la molécula coestimuladora CD40L incrementa la producción de IFNγ cuando se inoculan ratones con una vacuna génica contra el VSR (Ralph A.et al., 2000). Por otra parte, el aumento de IFNγ observado en los ratones inmunizados con pP+pIL15+Ady101 y pP+pCD40L+Ady101 podría deberse además, al estímulo proporcionado por el Ady101 presente en la vacuna ya que en trabajos realizados en nuestro laboratorio se demostró que adicionando el Ady 101 a vacunas génicas contra el virus del herpes bovino I, se obtiene un aumento de esa citoquina (Gammela et al., 2014).

El incremento IFNγ se corroboró cuando se realizaron marcaciones intracelulares de los esplenocitos de los ratones vacunados, ya que se observó un aumento significativo de células productoras de IFNγ en el grupo pP + pIL15 + Ady 101 ($p<0,001$) y en el grupo pP + pCD40L + Ady 101 ($p<0\ ,001$) con respecto al grupo pP. Además, los resultados obtenidos por citometría de flujo en esta tesis demostraron que los LT CD4 fueron una de las poblaciones mayoritariamente responsables del IFNγ producido en respuesta a la vacunación con pP+pIL15+Ady101 pero no la única. Inferimos que existiría otra población, probablemente las células NK o NKT secretoras de IFNγ ya que no se detectó un aumento significativo de los LT CD8 secretoras de IFNγ. En el caso del grupo pP+pCD40L+Ady101, se debería en un futuro estudio examinar qué población está produciendo el IFNγ en este grupo.

Por lo cual, la protección generada por estas formulaciones podría estar relacionada con este incremento de IFNγ ya que esta citoquina posee un reconocido efecto antiviral (Biron, C. A et al., 2001). El efecto antiviral del IFNγ puede ser por una acción directa, o indirecta estimulando a las células efectoras del sistema inmune (Chesler, D. A et al.,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2002). Se ha observado esta actividad antiviral contra varios virus, incluyendo entre otros al Virus del Herpes Simple, Virus de la Hepatitis C y el virus vaccinia (Cantin, E., B. et al., 1999; Frese et al., 2002; Karupiah, G et al., 1990). Además, se ha reportado la potente actividad antiviral contra el VFA, reduciendo drásticamente los niveles antigénicos y del ARN viral en el sobrenadante de células epiteliales BTY infectadas con el VFA tratadas con IFNγ (Zhang et al., 2002). Asimismo, se ha observado que el IFNγ promueve la activación de células NK y MOs, que pueden contribuir a controlar la replicación y propagación del VFA (Summerfield et al., 2009).

A continuación, para estudiar cómo fueron estimuladas las diferentes subpoblaciones celulares por la vacunación, se estudiaron las principales células inmunomoduladoras presentes en el bazo de los ratones inmunizados con las vacunas génicas. En los ratones inoculados con pP+pIL15+Ady101 se comprobó una gran estimulación caracterizada por la alta expansión del número total de esplenocitos, comparado con los otros grupos, que podría deberse al efecto sinérgico de la IL15 y el Ady 101. Por inmunomarcación específica y citometría de flujo se determinó que el grupo pP+pIL15+Ady101 tiene un mayor número de los LT (CD4 y CD8) y LB con respecto al grupo pP. Estos resultados se correlaciona con lo reportado en estudios previos, en los que se ha visto que al agregar el gen IL15 a un vector que codifica para una proteína de *Brucella* o a uno que codifica para la proteína N1 y NP del virus de la Influenza aviar se aumentan las poblaciones CD4+ y CD8+ de los animales inmunizados (Xi Dan Hub et al., 2009; Lim KL et al., 2012). Además, este incremento también se ha observado al inmunizar macacos con una vacuna génica que contiene el gen para el virus de la inmunodeficiencia de los simios y el adyuvante molecular (Dubie et al., 2009).

Cuando se estudió el grupo inmunizado con pP+pCD40L+Ady101, no se encontraron diferencias significativas en las poblaciones celulares estudiadas con respecto al grupo pP, lo cual se contrapone a lo esperado ya que se ha demostrado que esta molécula coestimuladora, al igual que otros miembros de la familia del TNF, es crucial para la expansión y la supervivencia de los LT, B y CDs durante las fases iniciales de la respuesta inmune (Quezada SA et al., 2004; Sugamura K et al., 2004; Borrow et al., 1998; Bachmann MF et al., 2004; Hernandez MG et al., 2007). Además, varios estudios han demostrado la eficacia de CD40L exógena como un adyuvante de la vacuna para promover el aumento de los LT (Lin F et al., 2009; Manoj S et al., 2004; Tripp RA et al., 2000; Yao Qet al., 2010; Cao J et al 2010).

Las células NK median poderosos mecanismos efectores microbicidas durante las etapas tempranas del proceso infeccioso de patógenos intracelulares y tienen particular relevancia en las infecciones virales (Vojvodic and Popovic 2010). Esta población participa en la respuesta inmune mediante la destrucción de células infectadas y por la secreción de citoquinas y quimoquinas. Cuando se midió esta población, se observó un aumento

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

significativo en el grupo pP+pIL15+Ady 101 con respecto al grupo pP. Este incremento podría deberse por un lado al adyuvante molecular: desde hace varios años se conoce que la IL15 es una citoquina que media la homeostasis de las células NK, NKT y LT (Kennedy MK et L 2000; Gordy et al. 2011; Lodolce et al., 1998) y la proliferación de las mismas. A su vez, la citotoxicidad de las células NK contra células infectadas contra VFA podrían estar incrementadas por la IL15, como ya se ha reportado en un trabajo previo (Toka et al., 2009), en el que células NK porcinas cultivadas *in vitro* después de la estimulación con IL15, aumentan su citotoxicidad frente a células infectadas con VFA. Por otro lado, el adyuvante químico podría estar colaborando con esta estimulación ya que varios agentes, incluyendo adyuvantes bacterianos, inducen un aumento en de células NK.

Por otro parte, se estudió la población de los MOs por sus cualidades en la respuesta frente a los virus. Esta población tiene una alta capacidad fagocítica y puede presentar péptidos derivados de los microorganismos fagocitados a los LT activados. Dicha capacidad fagocítica se encuentra muy aumentada si la partícula a ser fagocitada se encuentra unida a acs y/o proteínas del sistema complemento. Los MOs secretan un amplio espectro de citoquinas que median numerosas acciones, como el reclutamiento y activación de neutrófilos, maduración y migración de las CDs a órganos linfáticos, reclutamiento y potenciación de células NK y su propia modulación. Cuando se estudió esta población en los diferentes grupos, se observó un aumento significativo en el grupo pP+pIL15+Ady101 con respecto al grupo pP. Posiblemente, este incremento pudo haber sido estimulado por el IFNγ, el cual se ve incrementado en este grupo experimental. Asimismo, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio se demostró en ratones inmunizados con VFA inactivo y adyuvantes comerciales, que los MOs juegan un papel central en la protección temprana y que la opsonización y no los acs neutralizantes son suficientes para inducir una protección temprana contra el VFA. Estos datos podrían explicar por qué los animales que no tienen acs seroneutralizantes están protegidos contra el desafío viral. Sorprendentemente, en el grupo pP+ pCD40L+ Ady101 no se han observado diferencias en la población de MOs con respecto a pP, siendo que CD40L estimula la activación de los MOs (Grewal IS et al., 1997). El incremento en la cantidad de esplenocitos obtenida al vacunar ratones con pP+ pIL15+ Ady101 con respecto a pP+ pCD40L+ Ady101, podría deberse a una mayor activación de las células presentes en el bazo, favorecido por el efecto proliferativo de la IL15 sobre las mismas. También podría deberse a una menor eficiencia de transfección *in vivo* del plásmido pCD40L en comparación con pIL15.

Por último, estudiamos a los neutrófilos ya que son células que migran rápidamente a los sitios de inflamación. Allí son capaces de fagocitar y destruir microorganismos y de secretar un amplio abanico de citoquinas que cumplen una función relevante en el reclutamiento de otras poblaciones celulares y en la modulación de la respuesta adaptativa

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

que se generara posteriormente. La importancia de los neutrófilos en las respuestas inmunes protectoras tanto contra infecciones virales (Tumpey et al., 2005), como frente a bacterias y parásitos (Tateda et al., 2001; Bliss et al., 2001; Denkers et al., 2004) está ampliamente reportada. Los neutrófilos liberan numerosas moléculas proinflamatorias, entre las cuales se cuentan tanto citoquinas (TNFα e IFNγ, entre otras) como quimioquinas (CXCL1, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10, CXCL9 y CCL2), capaces de atraer más polimorfonucleares, monocitos/MO y CDs. También secretan proteínas derivadas de los gránulos (como catepsina, azurocidina y α-defensinas) capaces de atraer a LT CD4+ y CD8+ (Cherloy et al., 2000). Si bien los neutrófilos producen menor cantidad de citoquinas por célula que las CDs (Casatella et al., 1995), la gran cantidad de polimorfonucleares circulantes y su rápida migración a los sitios de infección/inflamación, convierten a estas células en una fuente muy importante de citoquinas proinflamatorias durante las infecciones. Cuando evaluamos esta población, se observó un aumento significativo de la población en el grupo pP+pIL15+Ady101 con respecto al grupo pP. Por lo cual esta población también podría estar ayudando a la protección generada por este grupo, a través de las diferentes funciones mencionadas previamente. Este aumento, como con los MO podría estar siendo estimulado por el IFNγ, el cual se ve aumentado en este grupo (Ellis and Bearm et al., 2004).

Asimismo, esta población al igual que las demás, podría haberse incrementado por el adyuvante químico que como describimos antes mejoraría el *delivery* del ADN plasmídico y también induce la secreción de moléculas proinflamatorias que estarían atrayendo a los MO y neutrófilos

Con los resultados obtenidos y la información previa que se conoce de la transfección *in vivo* de los plásmidos al ser inoculados por vía intradérmica, se diseñaron los modelos hipotéticos de la respuesta inmune humoral y celular inducidos luego de la inmunización intradérmica en los ratones vacunados con pP+pIL15+Ady101 y pP+CD40L+Ady101 (Fig. 44).

Inicialmente luego de la vacunación, las células de la dermis (CDs y queratinocitos) se transfectarían *in vivo* con los plásmidos que codifican para el antígeno P1 las proteinasas 2A y 3C del VFA. Cuando los plásmido ingresan a la célula se translocarían al núcleo, donde se inicia la trascripción del transgén; a continuación, los transcriptos pasarían al citoplasma y allí se traducen. Las proteínas recién sintetizadas se degradarían en el proteosoma hasta péptidos de 8-10 aminoácidos y mediante un sistema especializado de transporte que emplea proteínas transportadoras (TAP-I y TAP-II) serían transportados al retículo endoplásmico. Una vez allí, se asocian con las moléculas de MHC clase I. Los péptidos de gran afinidad con su respectiva molécula de MHC I se estabilizan y entrarían en la vía secretoria, con lo que alcanzan la superficie celular, donde se

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

acoplarían con el receptor de los LT (TcR) presentes en la superficie de los LT citotóxicos CD8+ para inducir su activación.

Estas células de la dermis podrían entrar en apoptosis por una respuesta citotóxica de LT CD8, liberando péptidos antigénicos al espacio extracelular y serían tomados por las CDs. Las proteínas exógenas endocitadas o fagocitadas entrarían a la vía endosómica y en ella se degradan en pequeños péptidos de 12 a 25 aminoácidos que luego se unen con moléculas del MHC II y se translocarían hacia la superficie de la célula, donde se presentan y unen a los TcR en los LT *helper* CD4; y consecuentemente se produciría su activación y expansión.

De esta forma, la unión del complejo MHC-péptido y TcR en las CPA y LT, respectivamente provee la denominada señal 1 de la activación de los LT. Sin embargo, esta señal 1 es insuficiente para generar una buena respuesta inmunitaria y es necesaria una segunda señal para completar la activación de los LT CD4+ y CD8+. La señal 2 se induce mediante las moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de las CPA (en su mayor parte CDs). Con anterioridad, las CDs requieren una señal para su activación inicial y maduración; esta señal llamada señal 0, o señal de alarma, la estaría proporcionando las citoquinas inflamatorias secretadas como consecuencia de la acción del adyuvante químico. El resultado de la señal 0 es la sobreexpresión de moléculas del MHC y coestimuladoras en su superficie, lo que favorece después el proceso de presentación de antígeno (señal 1). En esta etapa, las CD activadas cambian su morfología y perfil de expresión de receptores para quimoquinas, dejan la periferia y migran hacia los ganglios linfáticos donde participan en la activación de LT y LB inmaduros

Posteriormente a la etapa de activación se iniciaría la etapa efectora; los LT activados dejan los ganglios linfáticos hacia la periferia y siguen un gradiente de quimioquinas y tras la unión de sus TcR con los antígenos expresados en el contexto de MHC apropiado comienzan su etapa efectora mediante la secreción de interleuquinas con actividad antiviral como el INFγ (LT CD4), sustancias citotóxicas como las perforinas (LT CD8). Los LT activados, se diferencirían además en LT de memoria.

Por otro lado, los LB *naive* se activarían al unirse, mediante su receptor (BcR), con los antígenos que sintetizan y secretan las células que se transfectaron en la inmunización con el ADN o los que se liberan por apoptosis de estas células. Con posterioridad, los LB activados cambian de isotipo; las secuencias que codifican a la región variable de las inmunoglobulinas sufren hipermutación y los clones con un receptor con mayor afinidad por el antígeno se seleccionan y expanden. Los LB se diferenciarían en células de memoria o células plasmáticas; estas últimas pueden: a) continuar la síntesis de acs o b) establecerse en la medula ósea y continuar también la producción de acs; por lo tanto, es posible encontrar acs presentes en el suero y mucosas por largos periodos.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Por otra parte, las células de las dermis serían transfectadas con los plásmidos que codifican para CD40L en la forma de transmembrana. Esta molécula coestimulatoria interactuaría con CD40 expresada en CDs y LB, incrementando la expansión y la supervivencia de los LT, B y CDs; además induciría la producción de acs y el *switching* de los mismos.

A su vez, la IL15 secretada por las células de la dermis transfectadas *in vivo* con los plásmidos pIL15 sería liberada localmente y trasportada por el torrente sanguíneo. Esta citoquina estimularía la proliferación de los LT y B, activaría a las células NK; estimularía la diferenciación de los LB y a la amplificación de los LT de memoria. Además, la presencia del adyuvante polimérico incrementaría la transfección *in vivo* de las células en el sitio de inyección y reclutaría células proinfalmatorias (Fig. 44).

De acuerdo a los resultados obtenidos se ha demostrado que la vacunación génica utilizando los plásmidos pP y pIL15 adicionados con el adyuvante ESSAI 95201 (Ady101) es eficaz para desencadenar una respuesta inmune que estimularía la activación de LT CD4 en un perfil Th1 con la secreción de IFNγ capaz de incrementar el porcentaje de animales protegidos contra el VFA. El efecto antiviral del IFNγ puede ser por una acción directa o indirecta sobre las células efectoras del sistema inmune Asimismo, se ha observado que el IFNγ promueve la activación de células NK y MO, que pueden contribuir a controlar la replicación y propagación del VFA. Por lo tanto, esta citoquina estaría activando a las células NK, MO y también a los LT CD8. El incremento de las poblaciones de LB, LT y de los neutrófilos podría deberse a que la IL15 podría además de estar activando células por medio de IFNγ, estimulando la proliferación de las poblaciones. Los neutrófilos disminuyen con el tiempo, pero como citamos previamente secretan citoquinas y proteínas derivadas de gránulos que cumple una función relevante en el reclutamiento de otras poblaciones celulares como los MO y los LT CD4 y T CD8. Luego a los 10 dpv, cuando se realizaría el desafío con VFA vía intraperitoneal, los MO que se encuentran en el peritoneo se unirían al complejo anticuerpo-virus para opzonofagocitar el virus, como lo observado por el trabajo previamente citado de Quattrocchi (Quattrocchi et al 2011). Además los linfocitos y las células NK podrían estar produciendo IFNγ, que estaría actuando de forma indirecta, activando a los MO. El virus que no sería eliminado en el peritoneo, ingresaría al páncreas, en donde se ha observado en trabajos previos que es el sitio de duplicación viral (Fernández et al., 1989). En el páncreas actuarían los mismos mecanismos inmunológicos que en el peritoneo. Además, en este compartimiento el IFNγ también actuaría de forma directa, evitando que las células pancreáticas sean infectadas por el virus. Por otro lado, las células que llegarían a ser infectadas, serían eliminadas por LT CD8 y por las células NK con el mecanismo de citotoxicidad mediada por acs. Asimismo, en el trabajo previamente citado de Toka, se observó que la citotoxicidad de las células NK de porcinos contra células SK6 infectadas con VFA podrían estar

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

incrementadas por la IL15 (Toka et al 2009). A su vez, en el trabajo de Xiao Wang, se observa que la incorporación IL15 a una vacuna génica que codifica para VP1, incrementa la respuesta citotóxica de los LT CD8 en ratones inmunizados (Wang et al 2008).

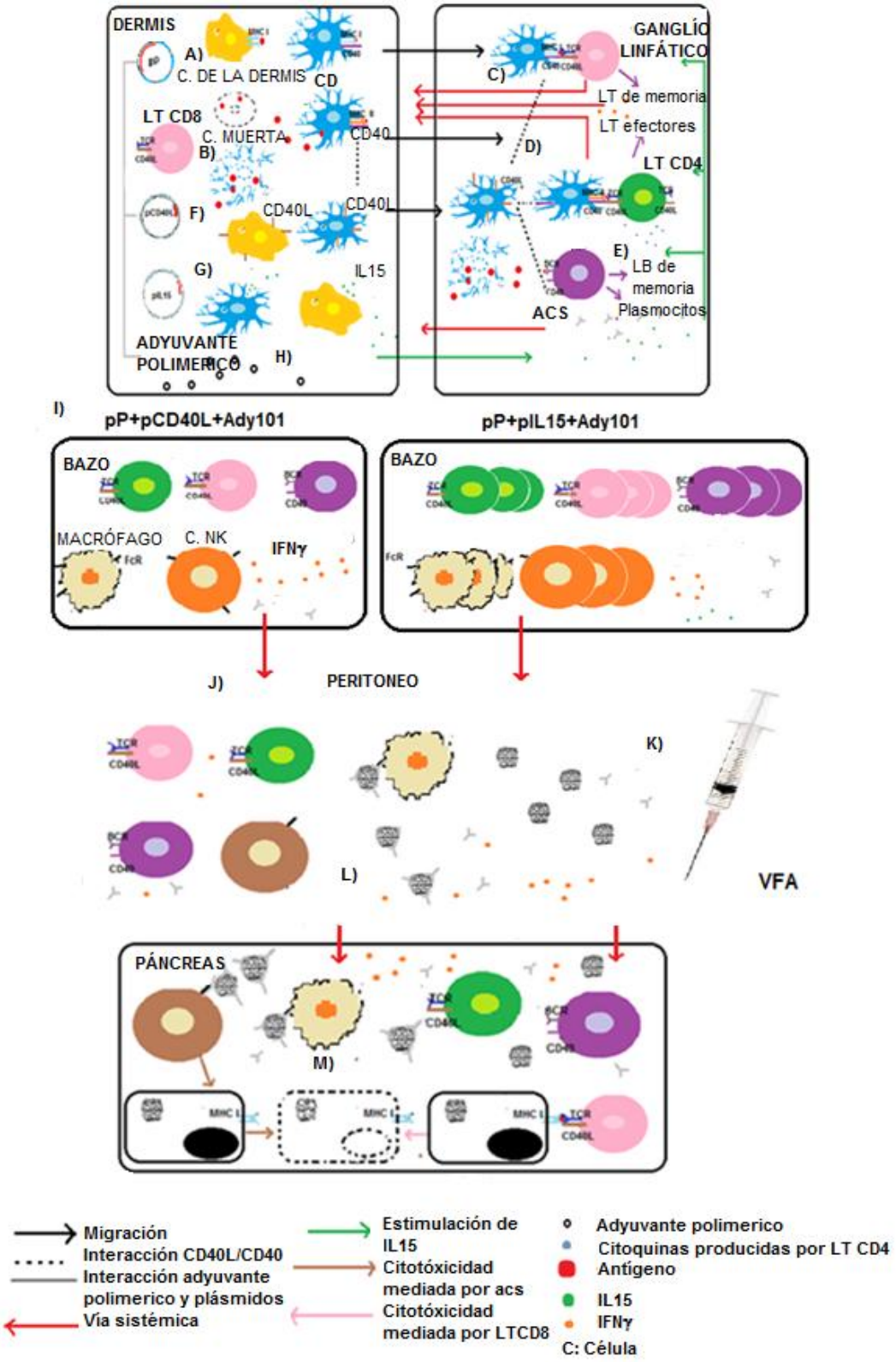


Fig 44. Presentación antigénica por las CDs y respuesta inmune humoral y celular luego de la inmunización intradérmica. A) El plásmido pP se transfectarían *in vivo* en las células de la dermis y las CDs. Luego, dentro de las células este plásmido expresaría el antígeno intracelular y éste posteriormente sería procesado y presentado en MHC I. **B)** Las células transfectadas *in vivo* con el tiempo podrían entrar en apoptosis por la acción de los LT CD8, liberando los antígenos. Posteriormente, los mismos serían tomados por las CDs y procesados para ser presentados en MHC II. **C)** Las CDs por vía sistémica irían hacia el ganglio linfático más cercano y presentarían los antígenos a LT CD8 por medio del MHC I. Luego, estas células se diferenciarían en los LT CD8 efectores y de memoria que viajarían vía sistémica hacia todo el cuerpo **D)** Otras CDs que también llegarían al ganglio linfático, presentarán los antígenos a los LT CD4 por medio del MHC II. Esta presentación activaría a los LT CD4, que de acuerdo al contexto de citoquinas, podrían diferenciarse a T Helper, secretar citoquinas y colaborar con los LB para la producción de acs. A su vez, también se producen los LT CD4 de memoria. **F)** Los LB *naive* activados por el reconocimiento de antígenos liberados por CDs apoptóticas encontradas en el ganglio linfático, se diferenciarían en plasmocitos y LB de memoria **G)** El plásmido pCD40L se transfectaría *in vivo* en las células de la dermis y CDs, expresando CD40L. El CD40L se uniría a CD40, la cual es expresada en CDs y LB, incrementando la expansión y la supervivencia de los LT, LB y CDs; además aumentaría la producción de acs y el switching de los mismos. **H)** El pIL15 se transfectaría en las CDs y las células de las dermis, secretando IL15. Esta citoquina estimularía la proliferación de los LT y LB, activando a las células NK y a la diferenciación de los LB. Asimismo interviene en la amplificación de los LT de memoria **I)** El adyuvante polimérico incrementaría la transfección en el sitio de inyección y reclutaría células proinfalmatorias. **Modelo hipotético de protección de los ratones vacunados con pP+CD40L+Ady101 y pP+pIL15+Ady101** I) En el grupo pP+pCD40L+Ady101 se ve un incremento en la producción de IFNγ en el bazo y en el grupo pP+pIL15+Ady101 además del incremento del IFNγ en el bazo, también se observa un incremento en las poblaciones que esta citoquina estimula, como los LT, LB y células NK. J) Estas poblaciones y el IFNγ se dispersan vía sistémica. K) Al desafiar a los ratones el virus entra al organismo por el peritoneo. Allí se encuentran, las células NK, los MO, los LT y B incrementados así como los acs inducidos por la inmunización L) Los MO que están en el peritoneo actuarían uniéndose al complejo virus-acs, activando el mecanismo de opzonofagocitosis. Asimismo, los LT y B y las células NK producirían IFNγ, el cual tiene una actividad antiviral. M) El virus que no es eliminado ingresaría al páncreas a replicarse e infectaría a las células pancreáticas. En este órgano, también se activaría los mismos mecanismos del peritoneo. Además, las células infectadas podrían ser eliminadas por los LT CD8 citotóxicos o por las células NK mediante el mecanismo de citotoxicidad mediada por acs.

En este trabajo se ha demostrado que los adyuvantes pCD40L e pIL15 incrementan la respuesta inmune protectora inducida por una vacuna génica que codifica para pP. Además, es la primera vez que utilizando un adyuvante molecular y un adyuvante químico en una vacuna génica sin un refuerzo con virus inactivo y utilizando una inoculación no dolorosa, como la inyección intradérmica en el modelo de ratón BALB/c puede inducir una respuesta protectora del 80% contra el VFA, que estaría relacionada con una incremento en la respuesta celular. En trabajos previos en donde se inmunizaron ratones con vacunas génicas, utilizando solo los adyuvantes moléculares como IL1 (Shao et al., 2005); IL2 (Zhang et al., 2008); IL6 o TNF alfa (Su et al., 2008); IL9 (Zou et al., 2010); IL18 (Xia 2007), IL15 (Wang et al., 2008), OX40L (Xia et al., 2007) , CD40L (Xiu 2010), GMCSF (Sedeh et al., 2012) y la conjunción de varias citoquinas (Su et al., 2012); adyuvante quimico (Jin et al., 2004) solo han logrado un incremento en la repuesta humoral y celular, pero no una respuesta protectora del 80%. Por otro lado, cuando se ha logrado inducir una respuesta protectora total se han utilizado métodos más complejos y costosos que el utilizado en el presente estudio como en el trabajo de Joyappa, en el que recubrían nanopartículas con el ADN (Joyappa et al., 2009) o el trabajo de Nammada en el que se

asoció al ADN con partículas de quitosano y a una proteína de membrana de *Salmonella typhimurium*, que se utilizó como ligando de TLR (Nanda RK et al., 2014).

Si bien en cerdos y ovinos (Niborski et al., 2006; Li et al., 2008) como ya hemos mencionado se ha logrado inducir una protección total, en vacas solo se pudo inducir un protección parcial utilizando el método de electroporación, el cual es un método costoso y doloroso para el animal, lo cual es complejo para implementar a campo. En bovinos se ha logrado inducir protección frente al desafío viral, administrando por medio de la electroporación *in vivo* altas dosis de ADN de una vacuna génica que codifica para P12A3C3D junto al gen del factor de crecimiento de MO, PEG, GM-CSF y un refuerzo con VFA inactivo (Fowler et al., 2012).

Por otro lado, el enfoque de este trabajo puede proporcionar una mejor solución para el control de esta enfermedad que las otras alternativas de vacunación contra el VFA descriptas en este trabajo. Es un método seguro, a diferencia de las plataforma vacunal que utilizan un vector viral, no presenta los riesgos asociados a las propiedades replicativas, la reversión de la virulencia la estabilidad genética, la recombinación con otros virus o la insercción del ADN del virus en algun lugar del genoma del animal y generar una respuesta inmune primaria inducida por antígenos expresados por el vector (Ferreira et al., 2005).

Asimismo, el desarrollo de vacunas a microorganismos vivos atenuadas contra VFA ha tenido un éxito limitado debido a que la atenuación sea incompleta y reversible y a que la atenuación sea efectiva en una especie y en la otra no. Por otro lado, este método es mejor que las vacunas a proteínas ya que como las vacunas a VLPs requieren un proceso de producción y purificación más complejo y costoso que los utilizado para las vacunas ADNs producidas en bacterias.

Estrategias de tipo prime-and-boost heterólogo

Para mejorar la protección obtenida por el grupo pP+pIL15+Ady101 y el grupo pP+pCD40L+Ady101, se utilizó la estrategia de tipo *prime-and-boost* heterólogo.

Existen numerosos estudios que han reportado el efecto del *prime-boost*, utilizando como *prime* a la vacuna génica y como *boost* o refuerzo a una proteína o una vacuna a microorganismos muertos contra protozoo, bacterias o virus infecciosos. (Dunachie, S. J et al., 2006; Larsen, D. et al., 2001; Davtyan et al., 2010; Vaine et al., 2010; Duke et al., 2007)

Asimismo, la vacuna de ADN ha sido considerada como un *prime* eficaz porque el período de expresión es de larga duración y porque induce inmunidad celular y / o humoral (Ramshaw IA et al., 2000). En relación al uso de los vectores virales no replicativos que contiene el gen de interés que codifica el antígeno como refuerzo, se vio que pueden aumentar la respuesta inmune, especialmente la respuesta inmune celular, infectando a las células huésped y produciendo una proteína antigénica contra la infección dentro de las

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

células huésped (Ramshaw IA et al., 2000). Por otro lado, cuando se utilizan vacunas a microorganismos muertos que contienen patógenos enteros inactivados como refuerzo, no sólo se logra incrementar la respuesta inmune al antígeno expresado por la vacuna con la que se estimuló al sistema inmune, sino que también puede inducir respuestas inmunes contra antígenos adicionales (Larsen DL et al., 2001).

Además, como ya hemos descripto previamente en el trabajo de V. Fowler et al., 2012, se ha demostrado por primera vez que los bovinos pueden ser clínicamente protegidos contra el desafío del VFA siguiendo una estrategia de *prime* DNA-proteína, y particularmente cuando la vacuna de ADN se combina con GM-CSF y administrado por electroporación. Por lo tanto, para mejorar la eficacia de la protección contra la infección en los diferentes grupos estudiados, se reemplazo el último refuerzo con VFAi y se observo un incremento en la respuesta protectora de todas las vacunas génicas, obteniendose un 100% de protección total para el grupo pP+pIL15+Ady101 y pP+pCD40L+Ady101 y un 80% de protección total para el grupo pP.

Por otro lado, se utilizó esta estrategía, tomando como *prime* a las diferentes formulaciones vacunales con 50 µg del vector pP y como refuerzo a una dosis subimnuzante de VFA inactivo (VFAi). Se eligió esa dosis de ADN por que a pesar de que no haber encontrado una buena respuesta inmune en ratones, ofrecía la posibilidad de mejorarla con VFAi; además es una forma de disminuir los costos y los tiempos necesarios para las formulaciones a gran escala.

En este trabajo, la incorporación de un último refuerzo con una dosis subimnunizante de VFAi en los ratones vacunados con una menor dosis de pP junto con pIL15 o pCD40L y el Ady101 indujo una respuesta protectora en el 100 % de los animales del grupo pP+pIL15+Ady y del 80 % en los ratones de los otros 2 grupos.

Además, se detectó un incremento en el nivel de acs específicos contra el virus. En los animales que recibieron pP+pIL15+Ady101 y pP+pCD40L+Ady101 estuvieron aumentadas los acs isotipo IgM específicos contra VFA posiblemente debido a la incorporación de nuevos epítopes presentes en el VFAi. Asimismo, en el grupo pP+pIL15+Ady101 se encontraron aumentados los acs seroneutralizantes en forma significativa con respecto al grupo pP, sin embargo el no haber logrado detectar estos acs neutralizantes en los sueros de los ratones pP+pCD40L+Ady101 o pP podría estar vinculado con el método seleccionado para su detección, en el cual se requiere que 100 DICT50% de VFA activo sean neutralizados. Tal vez si se utilizase el método suero fijo, virus variable, se lograrían detectar estos acs que seguramente son bajos.

Posteriormente, se analizó la avidez de estos sueros por el VFA, si bien superaron el indice de avidez del 60%, vinculado con vacunas contra aftosa que inducen alta protección, sorprendentemente se detectó un índice de avidez inferior al determinado en los sueros de los animales que recibieron vacuna génica en mayor dosis sin el refuerzo de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

virus inactivo. Estos resultados, podían asociarse a la presencia de IgM en los sueros de los animales que recibieron refuerzo con VFA inactivado subinmunizante.

Cuando se inmunizaron los ratones con 2 dosis de vacuna génica y el VFA inactivado, se observo que la mejor respuesta protectora fue la obtenida por el grupo pP+pIL15+Ady101 con un 80% de protección. Por otro lado, en el bazo de los ratones inmunizados con pP+pIL15+Ady101, se observo un aumento en los LT CD4+ secretoras de IFN□ □ (datos no mostrados). Lo cual lleva a pensar que al igual que lo observado anteriormente en los ratones pP+pIL15+Ady101 (que solo recibieron una mayor dosis de vacuna génica) hubo una estimulación de la respuesta inmune celular que es importante para la protección. Este efecto de sostener la respuesta protectora podría estar dado por la presencia de IL15 sobre el *pool* de células de memoria. Esta molécula fue estudiada, ya sea como un terapéutico o junto a una vacuna, para mejorar la proliferación y longevidad de los LT de memoria CD8+ o CD4+ a través de la regulación de moléculas anti-apoptóticas (Boyer et al., 2007;. Kutzler et al., 2005; Lin et al., 2005; Oh et al., 2008; Picker et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren, entonces, que en los grupos inmunizados con la combinación heteróloga, utilizando el esquema con 4 inoculaciones, el mecanismo de protección podría ser el de los acs seroneutalizantes. Además, se ha visualizado un incremento de IgM en el grupo pP+pIL15+Ady101 con respecto al grupo pP. Por lo cual, estos acs seroneutralizantes podrían ser IgM. Este resultado, se puede comparar con los datos obtenidos en el trabajo de Pega J et al., 2013, en el que vieron una correlación entre el pico de las IgM con una fuerte disminución en la detección del ARN viral en la sangre a los 5 días post infección, lo cual apoya el papel de IgM como elemento crítico para controlar y eliminar la infección viral en los bovinos. Además, vieron que una gran proporción de la actividad neutralizante observada en los sueros de estos bovinos infectados a los 5 y 6 días después de la infección se debió a los acs del VFA-IgM específica. Por otro lado, cuando se disminuye una inoculación de ADN, la protección del grupo pP+pIL15+Ady 101, podría ser debido a un mecanismo de la respuesta inmune celular.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

CONCLUSIONES

- ✓ Las vacunas génicas que utilizan pVP1 ya sea en su forma citoplasmática o secretada no inducen una buena inmunidad contra VFA.
- ✓ La incorporación de los genes CD40L y RANKL en el mismo vector de expresión de VP1c no lograron mejorar la respuesta inmune humoral y protectora inducida en los ratones inmunizados con la vacuna génica.
- ✓ Si bien la incorporación de pCD40L a la vacuna génica que contiene pVP1s logró mejorar la respuesta inmune humoral, en relación a la respuesta protectora, luego del desafío viral solo se redujo el título de virus en sangre.
- ✓ La incorporación de pCD40L, pIL15 o el adyuvante químico ESSAI 95201 (Ady101) por separado a la vacuna génica pP no logró mejorar la respuesta inmune humoral y protectora inducida por la vacuna génica pP. Solo la incorporación de CD40L logró disminuir el título de virus en sangre.
- ✓ La incorporación de pCD40L o pL15 junto al Ady101 a la vacuna génica pP, logró mejorar la respuesta protectora, se indujó una protección total en el 80% de los ratones vacunados con pP+pIL15+Ady101 y en el 60 % de los ratones que recibieron pP+pCD40L+Ady101. Los adyuvantes moleculares junto con el adyuvante químico no lograron incrementar la respuesta inmune humoral inducida por la vacuna génica pP.
- ✓ Los sueros de los ratones inmunizados con las formulaciones vacunales que incluyeron a pP, presentaron un índice de avidez similar a los obtenidos con vacunas comerciales que han generado protección en ratones frente a un desafío viral.
- ✓ La incorporación de pCD40L en la vacuna pP+pCD40L+Ady101 logró incrementar la producción de IFNγ, aún cuando no incrementó los LT, LB y la producción de acs.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

- ✓ La incorporación de pIL15 en la formulación vacunal pP+pIL15+Ady101 no solo indujo la secreción de IFNγ, sino también una expansión celular en los bazos de los animales inmunizados indicando una clara activación de las células inmunocompetentes. La IL15 actuó como una citoquina proliferativa, estimulando un incremento en las poblaciones de LT, LB, células *Natural Killer* (NK), macrófagos (MO) y neutrófilos.
- ✓ Se logró mejorar la respuesta protectora de las vacunas génicas, reemplazando el último refuerzo con una dosis subinmunizante de VFAi logrando el 100 % de protección en el grupo pP+pIL15+Ady101 y en el grupo pP +pCD40L+ Ady101 y un 80% en el grupo pP. Por lo cual, se evidenció una respuesta inmune de memoria generada por la vacuna génica que estaría acompañada por una respuesta inmune primaria hacia nuevos epitopes presentes en el virus.
- ✓ Cuando se realizaron diferentes esquemas de vacunación, en los cuales se disminuyeron las inmunizaciones con una dosis baja de vacuna génica y un último refuerzo con una dosis subinmunizante de VFAi, se logró inducir la mejor respuesta protectora en el grupo pP+pIL15+Ady101 ya que se manifestó esta respuesta en los diferentes esquemas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

BIBLIOGRAFÍA

Abbas A.K., Lichtman A.H. 2004. Células y tejidos del sistema inmune. En Inmunología celular y molecular pag. 16-40. Editado por: Elsevier Science. Madrid/Espana.

Acharya R., Fry, E., Stuart D., Fox G., Rowlands D., Brown F. 1989. The threedimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 A resolution. Nature 337, 709-716.

Alexandersen S., Oleksiewicz M.B., Donaldson A.I. 2001. The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR. The Journal of general virology 82, 747-755.

Alexandersen S., Donaldson A. I. 2002. Further studies to quantify the dose of natural aerosol of foot and mouth disease virus to pigs. Epidemiol.Infect., 128, 313-323.

Alexandersen S., Quan M., Murphy C., Knight J., Zhang Z. 2003. Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. Journal of comparative pathology 129, 268-282.

Anderson D.M., Maraskovsky E., Billingsley W.L., Dougall W.C., Tometsko M.E., Roux E.R., Teepe M.C., DuBose R.F., Cosman D., Galibert L. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature 390, 175-179.

Anderson E.D., Mourich D.V., Leong J.A. 1996. Gene expression in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) following intramuscular injection of DNA. Mol Mar Biol Biotechnol 5, 105-113.

Asfor A.S., Upadhyaya S., Knowles N.J., King D.P., Paton D.J., Mahapatra M. 2014. Novel antibody binding determinants on the capsid surface of serotype O foot-and-mouth disease virus. J Gen Virol. 95, 1104-1116.

Bachmann M.F., Wong B.R., Josien R., Steinman R.M., Oxenius A., Choi, Y. 1999. TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. The Journal of experimental medicine 189, 1025-1031.

Bachrach H.L., Moore D.M., McKercher P.D., Polatnick J. 1975. Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. J Immunol 115, 1636-1641.

Bae J.Y., Moon S.H., Choi J.A., Park J.S., Hahn B.S., Kim K.Y., Kim B, Song J.Y., Kwon D.H., Lee S.C., Kim J.B., Yang J.S. 2009. Recombinant DNA and Protein Vaccines for Foot-and-mouth Disease Induce Humoral and Cellular Immune Responses in Mice. Immune Netw 9, 265-273.

Bahnemann H.G. 1975. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. Arch Virol 47, 47-56.

Balamurugan V., Renji R., Saha S.N., Reddy G.R., Gopalakrishna S., Suryanarayana V.V. 2003. Protective immune response of the capsid precursor polypeptide (P1) of foot and mouth disease virus type 'O' produced in Pichia pastoris. Virus research 92, 141-149.

Balasa B., Krahl T., Patstone G., Lee J., Tisch R., McDevitt H.O., Sarvetnick N. 1997. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulitis and diabetes in nonobese diabetic mice.J Immunol. 159, 4620-4627.

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 18, 767-811.

Barnett P.V., P. Keel, S., Reid R.M., Armstrong R. J., Statham C., Voyce N., Aggarwal S.J., Cox. 2004. Evidence that high potency foot-and-mouth disease vaccine inhibits local virus replication and prevents the "carrier" state in sheep. Vaccine 22, 1221-1232.

Barteling, S.J., Vreeswijk, J. 1991. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. Vaccine 9, 75-88.

Barteling S. J. 2002. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz 21 , 577-588

Beard C., Ward G., Rieder E., Chinsangaram J., Grubman M.J., Mason P.W. 1999. Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. J. Biotechnol. 73, 243–249.

Becker T.C., Wherry E.J., Boone D., Murali-Krishna K., Antia R., Ma A., Ahmed R. 2002. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. The Journal of experimental medicine 195, 1541-1548.

Becker Y. 1994. Need for cellular and humoral immune responses in bovines to ensure protection from foot-and-mouth disease virus (FMDV)--a point of view. Virus Genes 8, 199-214.

Bennett S.R., Carbone F.R., Karamalis F., Flavell R.A., Miller J.F., Heath W.R. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. Nature. 393, 478-480.

Benvenisti L., Rogel A., Kuznetzova L., Bujanover S., Becker Y., Stram Y. 2001. Gene gun mediated DNA vaccination against foot-and-mouth disease virus. Vaccine 19, 3885–3895

Bergman P.J., Camps-Palau M., McKnight J. 2006. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. Vaccine 24, 4582–4585.

Bertley F.M., Kozlowski P.A., Wang S.W. 2004. Control of simian/human immunodeficiency virus viremia and disease progression after IL-2-augmented DNA-modified vaccinia virus Ankara nasal vaccination in nonhuman primates. J. Immunol.172, 3745–3757.

Bhat S.A., Saravanan P., Hosamani M., Basagoudanavar S.H., Sreenivasa B.P., Tamilselvan R.P., Venkataramanan R. 2013. Novel immunogenic baculovirus expressed virus-like particles of foot-and-mouth disease (FMD) virus protect guinea pigs against challenge. Res Vet Sci. 95, 1217-1223.

Bittle J. L., Houghten R. A.., Alexander H., Shinnick T.M., Sutcliffe J.G., Lerner R.A., Rowlands D.J., Brown F. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by inmunitation with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. Nature 298, 30-33.

Biron C.A., Brossay L. 2001. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. Curr Opin Immunol. 4, 458-464.

Blanco E., Cubillos C., Moreno N., Bárcena J., de la Torre BG., Andreu D., Sobrino F. 2013. B epítope multiplicity and B/T epítope orientation influence immunogenicity of foot-and-mouth disease peptide vaccines**.** Clin Dev Immunol. 2013, 475960.

Bliss S.K., Gavrilescu L.C., Alcaraz A., Denkers E.Y. 2001. Neutrophil depletion during Toxoplasma gondii infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. Infect Immun 69, 4898-4905

Boothroyd J.C., Harris T.J., Rowlands D.J., Lowe P.A. 1982. The nucleotide sequence of cDNA coding for the structural proteins of foot-and-mouth disease virus. Gene 17, 153-161.

Borrego B., Argilaguet J.M., Perez-Marin E. 2011. A DNA vaccine encoding foot-and mouth disease virus B amd T-cell epítopes targeted to class II swine leukocyte antigens protects pigs against viral challenge. Antivir. Res. 92, 359–363.

Borca M.V., Fernandez F.M., Sadir A.M., Braun, M., Schudel A.A. 1986. Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. Immunology 59, 261-267.

Borca M.V., Garmendia A.E., Baxt B., Moore D.M., Srikumaran S., Morgan D.O., 1993. Cross-reactive idiotopes among anti-foot and mouth disease virus neutralizing antibodies. Immunology 79, 368-374.

Borrow P., Tishon A., Lee S., Xu J., Grewal I.S., Oldstone M.B., Flavel, R.A. 1996. CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8+ CTL response. The Journal of experimental medicine 183, 2129-2142.

Borrow P., Tough D.F., Eto D., Tishon A., Grewal I.S., Sprent J., Flavell R.A., Oldstone M.B. 1998. CD40 ligand-mediated interactions are involved in the generation of memory CD8 (+) cytotoxic T lymphocytes (CTL) but are not required for the maintenance of CTL memory following virus infection. Journal of virology 72, 7440-7449.

Boyer J.D., Robinson T.M., Kutzler M.A., Vansant G., Hokey D.A., Kumar S., Parkinson R., Wu L., Sidhu M.K., Pavlakis G.N., Felber B.K., Brown C., Silvera P., Lewis M.G., Monforte J., Waldmann T.A., Eldridge J., Weiner D.B. 2007. Protection against simian/human immunodeficiency virus (SHIV) 89.6P in macaques after coimmunization with SHIV antigen and IL-15 plasmid. Proc Natl Acad Sci U S A 104; 18648-18653

Boyle J.S., Koniaras C., Lew A.M.1997. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. Int Immunol; 9: 1897–1906.

Broekhuijsen M.P., Blom T., Kottenhagen M., Pouwels P.H., Meloen R.H., Barteling S.J., Enger-Valk, B.E. 1986. Synthesis of fusion proteins containing antigenic determinants of foot-and-mouth disease virus. Vaccine 4, 119-124.

Brown C.C., Piccone M.E., Mason P.W., McKenna T.S., Grubman M.J. 1996. Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle. J. Virol. 70, 5638–5641

Brown F. 1987. Progress and perspectiveness in the development of a foot-and-mouth disease vaccine by recombinant DNA technology. Progr. Vet. Microbiol. Immunol. 3, 59–72.

Brown F., Graves J.H. 1959. Changes in specificity and electrophoretic mobility of the precipitating antibodies present in the serum of cattle recovering from foot-andmouth disease. Nature 183, 1688-1689

Brown F. 1991. An overview of the inactivation of FMDV and the implications when residual virus is present in vaccines. Developments in biological standardization 75, 37-41.

Brown F. 1992. New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. Vaccine 10, 1022–1026.

Brown, F. 1993, Review of accidents caused by incomplete inactivation of viruses. Dev Biol Stand 81, 103-107

Burrows R. 1968. The persistence of foot-and mouth disease virus in sheep. The Journal of hygiene 66, 633-640.

Burroughs J.N., Rowlands D.J., Sangar D.V., Talbot P., Brown F. 1971, Further evidence for multiple proteins in the foot-and-mouth disease virus particle. J Gen Virol 13, 73-84.

Calarota S.A., Dai A., Trocio J.N., Weiner D.B., Lori F., Lisziewicz J. IL-15 as memory T-cell adjuvant for topical HIV-1 DermaVir vaccine. Vaccine 26, 5188–5195.

Cantin E., Tanamachi B., Openshaw H. 1999. Role for gamma interferon in control of herpes simplex virus type 1 reactivation. J Virol. 73, 3418-3423.

Cao J., Wang X., Du Y., Li Y., Wang X., Jiang P. 2010. CD40 ligand expressed in adenovirus can improve the immunogenicity of the GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. Vaccine. 28, 7514-7522.

Cao Y., Lu Z., Sun J., Bai X., Sun P., Bao H., Chen Y., Guo J., Li D., Liu X., Liu Z. 2009. Synthesis of empty capsid-like particles of Asia I foot-and-mouth disease virus in insect cells and their immunogenicity in guinea pigs. Veterinary microbiology 137, 10-17.

Cardoso A.I., Gerlier D., Wild T.F., Rabourdin-Combe C. 1996. The ectodomain of measles virus envelope glycoprotein does not gain access to the cytosol and MHC class I presentation pathway following virus-cell fusion. The Journal of general virology 77, 2695-2699.

Carrillo C., Borca M., Moore D.M., Morgan D.O., Sobrino F. 1998. *In vivo* analysis of the stability and fitness of variants recovered from foot-and-mouth disease virus quasispecies. The Journal of general virology 79, 1699-1706.

Carrillo C., Wigdorovitz A., Trono K., Dus Santos M.J., Castanon S., Sadir A.M., Ordas R., Escribano J.M., Borca, M.V. 2001. Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. Viral immunology 14, 49-57.

Cassatella M.A. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. Immunol Today 16, 21-6.

Clarke B.E., Brown A.L., Currey K.M., Newton S.E., Rowlands D.J., Carroll A.R., 1987. Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot and mouth disease virus. Nucleic acids research 15, 7067-7079.

Cedillo-Barron L., Foster-Cuevas M., Belsham G.J., Lefevre F., Parkhouse R.M. 2001. Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase. J Gen Virol 82, 1713-1724.

Cedillo-Barron L., Foster-Cuevas M., Cook A. 2003. Immunogenecity of plasmids encoding T and B cell epítopes of foot-andmouth disease virus (FMDV) in swine. Vaccine 21, 4261–4269.

Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A., Alber G. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. J Exp Med. Aug 184, 747-752.

Clarke S.R. 2000. The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. Journal of leukocyte biology 67, 607-614.

Chen C.H., Lin Y.L., Liu Y.K., He P.J., Lin C.M., Chiu Y.H., Wu C.J., Cheng T.L., Liu S.J., Liao K.W. 2012. Liposome-based polymer complex as a novel adjuvant: enhancement of specific antibody production and isotype switch.. Int J Nanomedicine 7, 607-621.

Chen L., Lin T., Zhang H.X., Su Y.B. 2012. Immune response to foot and mouth disease DNA vaccines can be enhanced by co injection with the Isatis indigotica extract. Intervirology 48, 207–212.

Chen Y.S., Hung Y.C., Lin W.H., Huang G.S. 2010. Assessment of gold nanoparticles as a size-dependent vaccine carrier for enhancing the antibody response against synthetic foot-and-mouth disease virus peptide. Nanotechnology. 21,195101.

Cherloy O.D., Yang O.M., Oppenheim J.J. 2000. Leukocyte granule protein mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. Immunol. Rev. 177, 68-81.

Chesler D.A., Reiss C.S. 2002. The role of IFN-gamma in immune responses to viral infections of the central nervous system. Cytokine Growth Factor Rev. 13, 441-454.

Chinsangaram J., Beard C., Mason P.W., Zellner M.K., Ward G., Grubman M.J., 1998. Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. Journal of virology 72, 4454-4457.
.
Choudary S., Ravikumar P., Ashok Kumar C., Suryanarayana V.V., Reddy G.R. 2008. Enhanced immune response of DNA vaccine (VP1-pCDNA) adsorbed on cationic PLG for foot and mouth disease in guinea pigs. Virus Genes. 37, 81-87

Collen T., Pullen L., Doel. T. R. 1989. T cell-dependent induction of antibody against foot-andmouth disease virus in a mouse model. J Gen Virol 70, 395-403.

Correa Melo E., Saraiva V., Astudillo V. 2002. Review of the status of foot-and-mouth disease in countries of South America and aproaches to control and erradication. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 21, 429-436.

Cox G.J., Lamb T.J., Babiuk L.A. 1993. Bovine herpesvirus-1: immune response in mice and cattle injected with plasmid DNA. J. Virol. 67, 5664–5667

Crisci E., Fraile L., Moreno N., Blanco E., Cabezón R., Costa C., Mussá T., Baratelli M., Martinez-Orellana P., Ganges L., Martínez J., Bárcena J., Montoya M. 2012. Chimeric calicivirus-like particles elicit specific immune responses in pigs. Vaccine. 30, 2427-2439.

Cox J.C., Coulter A.R. 1997. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. Immunol. Res. 15, 248-256.

Cubillos C., de la Torre B.G., Jakab A., Clementi G., Borrás E., Bárcena J., Andreu D., Sobrino F., Blanco E. 2008. Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. J Virol. 82, 7223-7230.

Cui B.A., Wei Z.Y., Wang X.B., Huang K.H., Jin X.X., Dong Z.J., Zheng L.L. 2006. Construction of the eukaryotic expression vector with IL-2 gene and VP2 gene of PPV and research on immunogenicity. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 22, 425-430.

Curry S., Fry E., Blakemore W., Abu-Ghazaleh R., Jackson T., King A., Lea S., Newman J., Stuart D. 1997. Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. J Virol 71, 9743-9752.

D'Antuono A., Laimbacher A.S., La Torre J., Tribulatti V., Romanutti C., Zamorano P., Quattrocchi V., Schraner E.M., Ackermann M., Fraefel C., Mattion N. 2010. HSV-1 amplicon vectors that direct the in situ production of foot-and-mouth disease virus antigens in mammalian cells can be used for genetic immunization. Vaccine. 28, 7363-7372.

Davidson A.H., Traub-Dargatz J., Roeheaver R. 2005. Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. J. Am. Vet. Med. Assoc. 226, 240–245.

Davtyan H, Mkrtichyan M, Movsesyan N, Petrushina I, Mamikonyan G, Cribbs DH, Agadjanyan MG, Ghochikyan A. 2010. DNA prime-protein boost increased the titer, avidity and persistence of anti-Abeta antibodies in wild-type mice. Gene Ther. 17, 261-271.

De Waal Malefyt R. 1998. Interleukin-10. In Cytokines. A Mire-Sluis and R. Thorpe, editors, London.

Denkers E.Y., Butcher B.A., Del Rio L, Bennouna S. 2004. Neutrophils, dendritic cells and Toxoplasma. Int J Parasitol. 34, 411-421.

Doel, T.R. 2003. FMD vaccines. Virus research 91, 81-99.

Doel T.R., David D.J., 1984. The stability and potency of vaccines prepared from inactivated foot-and-mouth disease virus concentrates. J Biol Stand 12, 247-255.

Donaldson A.I., Ferris N.P. 1980. Sites of release of airborne foot-and-mouth disease virus from infected pigs. Research in veterinary science 29, 315-319.

Donaldson A.I., Gibson C.F., Oliver R., Hamblin C., Kitching R.P. 1987. Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O1 and SAT 2 strains. Research in veterinary science 43, 339-346.

Dong .B, Feng J., Lin H., Li L., Su D., Tu D., Zhu W., Yang Q., Ren X. 2013. Immune responses of mice immunized by DNA plasmids encoding PCV2 ORF 2 gene, porcine IL-15 or the both. Vaccine. 31, 5736-44.

Donnelly J.J., Friedman A., Ulmer J.B., Liu, M.A. 1997. Further protection against antigenic drift of influenza virus in a ferret model by DNA vaccination. Vaccine 15, 865-868.

Drew D.R., Lightowlers M., Strugnell R.A. 2000. Humoral immune responses to DNA vaccines expressing secreted, membrane bound and non-secreted forms of the Tania ovis 45W antigen.Vaccine 18, 2522–2532.

Dubie R.A., Maksaereekul S., Shacklett B.L., Lemongello D., Cole K.S., Villinger F., Blozis S.A., Luciw P.A., Sparger E.E. 2009. Co-immunization with IL-15 enhances cellular immune responses induced by a vif-deleted simian immunodeficiency virus proviral DNA vaccine and confers partial protection against vaginal challenge with SIVmac251. Virology. 386, 109-121.

Duke C.M., Maguire C.A., Keefer M.C., Federoff H.J., Bowers W.J., Dewhurst S. 2007. HSV-1 amplicon vectors elicit polyfunctional T cell responses to HIV-1 Env, and strongly boostresponses to an adenovirus prime Vaccine. 25, 7410-7421.

Dunachie S.J., Walther M., Vuola J.M., Webster D.P., Keating S.M., Berthoud T., Andrews L., Bejon P., Poulton I., Butcher G., Watkins K., Sinden R.E., Leach A., Moris P., Tornieporth N., Schneider J., Dubovsky F., Tierney E., Williams J., Heppner D.G. Jr, Gilbert S.C., Cohen J., Hill A.V. 2006. A clinical trial of prime-boost immunisation with the candidate malaria vaccines RTS,S/AS02A and MVA-CS. Vaccine. 24, 2850-2859.

Dus Santos M.J., Wigdorovitz A., Maradei E., Periolo O., Smitsaart E., Borca M.V., Sadir A.M., 2000. A comparison of methods for measuring the antibody response in mice and cattle following vaccination against foot and mouth disease. Veterinary research communications 24, 261-273.

Dus Santos, M.J., Wigdorovitz A., Trono K., Rios R.D., Franzone P.M., Gil F., Moreno J., Carrillo C., Escribano J.M., Borca M.V. 2002. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. Vaccine 20, 1141-1147.

Dus Santos M.J., Carrillo C., Ardila F., Ríos R.D., Franzone P., Piccone M.E., Wigdorovitz A., Borca M.V. 2007. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. Vaccine. 23, 1838-1843.

Eble P.L., Bouma M.G., de Bruin F., Van Hemert-Kluitenberg J. T., Van Oirschot, Dekker. 2004. Vaccination of pigs two weeks before infection significantly reduces transmission of footand- mouth disease virus. Vaccine 22, 1372-1378.

Eblé P.L., Bouma A., Weerdmeester K., Stegeman J.A., Dekker A. 2007. Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. Vaccine. 25, 1043-1054.

Eldridge J.H., Hammond C.J., Meulbroek J.A., Staas J.K., Gilley R.M., Tice T.R. 1990. Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. J. Control Release 11, 205-214.

Elnekave M., Furmanov K., Hovav A.H. 2011. Intradermal naked plasmid DNA immunization: mechanisms of action. Expert review of vaccines 10, 1169-1182.

Ellis N.T., Bearman B.L. 2004. Interferon-γ activation of polymorphonuclear neutrophil function. Immunology. 112, 2–12.

Ewenstein B.M., Hoots W.K., Lusher J.M., DiMichele D., White G.C., Adelman, B., Nadeau, K. 2000. Inhibition of CD40 ligand (CD154) in the treatment of factor VIII inhibitors. Haematologica 85, 35-39.

Fagg R.H., Hyslop N.S. 1966. Isolation of a variant strain of foot-and-mouth disease virus (type O) during passage in partly immunized cattle. The Journal of hygiene 64, 397-404.

Farahnaz Motamedi Sedeh, Hoorieh Soleimanjahi, AmirReza Jalilian and Homayoon Mahravani. 2012. Comparison of Immune Responses against FMD by a DNA Vaccine Encoding the FMDV/O/IRN/2007 VP1 Gene and the Conventional Inactivated Vaccine in an Animal Model. VIROLOGICA SINICA, 27, 286-291

Feigelstock D., Mateu M.G., Piccone M.E., De Simone F., Brocchi E., Domingo E., Palma E.L. 1992. Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site. J Gen Virol 73, 3307-3311.

Feltquate D.M., Heaney S., Webster R.G., Robinson H.L. 1997. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. Journal of immunology 158, 2278-2284.

Fernandez F.M., Borca M.V., Sadir A.M., Fondevila N., Mayo, J., Schudel A.A. 1986. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. Veterinary microbiology 12, 15-24.

Ferreira T. B., Alves P. M., Aunins, J. G. Carrondo, M. J. T. 2005. Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines. Gene Ther 12 ((Suppl. 1),), S73–S83.

Ferrer-Orta C., Arias A.., Agudo R., Perez-Luque R., Escarmis, C., Domingo E., Verdaguer N. 2006. The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. EMBO J, 25, 880-888.

Ferrer-Orta C., Arias A., Escarmis C., Verdaguer,N. 2006b. A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. Curr. Opin. Struct. Biol., 16, 27-34.

Fynan E.F., Webster R.G., Fuller D.H., Haynes J.R., Santoro J.C., Robinson H.L. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 24, 11478–11482.

Fooks A.R., Jeevarajah D., Warnes A., Wilkinson G.W., Clegg J.C. 1996. Immunization of mice with plasmid DNA expressing the measles virus nucleoprotein gene. Viral immunology 9, 65-71.

Fomsgaard A. 1999. HIV-1 DNA vaccines. Immunol Lett 65, 127–131.

Fowler V.L., Barnett P.V. 2012. Progress in the development of DNA vaccines against foot-and-mouth disease. Expert Rev Vaccines 11, 481-493.

Fowler V., Robinson L., Bankowski B., Cox S., Parida S., Lawlor C, Gibson D., O'Brien F., Ellefsen B., Hannaman D., Takamatsu H.H., Barnett P.V. 2012. A DNA vaccination regime including protein boost and electroporation protects cattle against foot-and-mouth disease. Antiviral Res. 94, 25-34.

Frese M., Schwärzle V., Barth K., Krieger N., Lohmann V., Mihm S., Haller O., Bartenschlager R. 2002. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. Hepatology 35, 694-703.

Frenkel H.S. 1947. La culture de virus de la fievre aphteuse sur l'epithelium de la langue des bovides. Bull. Off. Int. Epiz 28, 155-162.

Gallagher S., Winston S.E., Fuller S.A., Hurrell J.G. 2008. Immunoblotting and immunodetection. Curr Protoc Immunol. Nov; Chapter 8: Unit 8.10.

Gammella M; Soria I., Bellusci C; Langellotti C; Quattrocchi V; Zamorano P. 2014. Uso del plásmido cd40l y adyuvantes químicos para mejorar una vacuna génica contra herpes virus bovino-1. XXI Congreso Nacional de Inmunología mexicana y 1er Simposio Internacional con la ALAI. Querétaro, Mexico

Ganges L., Borrego B., Fernandez-Pacheco P. 2011. DNA immunisation of pigs with foot and-mouth disease virus minigenes: from partial protection to disease exacerbation. Vaccine 15, 121–125

Garver K.A., LaPatra S.E., Kurath G. 2005. Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. Dis. Aquat. Org. 64, 13–22.

Gebauer F., de la Torre J.C., Gomes I., Mateu M.G., Barahona H., Tiraboschi B., Bergmann I., de Mello P.A., Domingo E. 1988. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. Journal of virology 62, 2041-2049.

Geissler M., Gesien A., Tokushige K., Wands J.R. 1997. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokineexpressing plasmids. J. Immunol.158, 1231–1237.

Ghias H, Cai S, Slanina S, Nesburn AB, Wechsler SL. 1995. Vaccination of mice with herpes simplex virus type 1 glycoprotein D DNA produces low levels of protection against lethal HSV-1 challenge. *Antiviral Res.* 28, 147–157.

Gnazzo V, Pereyra E, Quattrocchi V, Soria I , Langellotti C, Mongini, C.; Lopez V, Smitsaart E, and Zamorano. 2013. Evaluation of vaccines against foot and mouth disease in the mouse model, correlation with efficacy in cattle. P. 15 th International Congress of Immunology. Milán, Italia.

Gomez C.E., Najera J.L., Sanchez R., Jimenez V., Esteban M. 2009. Multimeric soluble CD40 ligand (sCD40L) efficiently enhances HIV specific cellular immune responses during DNA prime and boost with attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC expressing HIV antigens. Vaccine 27, 3165–3174.

Gordy, L.E., Bezbradica J.S., Flyak A.I., Spencer C.T., Dunkle A., Sun J., Stanic A.K., Boothby M.R., He Y.W., Zhao Z., Van Kaer L., Joyce S. 2011. IL-15 regulates homeostasis and terminal maturation of NKT cells. Journal of immunology 187, .6335–6345

Granelli-Piperno A., Golebiowska A., Trumpfheller C., Siegal F. P., Steinman R. M. 2004. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. Proc Natl Acad Sci U S A 18, 101, 7669-7674.

Granelli-Piperno A., Golebiowska A., Trumpfheller C., Siegal F.P., Steinman R.M. 2004. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 101 7669-74.

Grewal I.S., Flavell, R.A., 1997. The CD40 ligand. At the center of the immune universe? Immunologic research 16, 59-70.

Grubman M.J., 2003. New approaches to rapidly control foot-and-mouth disease outbreaks. Expert review of anti-infective therapy 1, 579-586.

Grubman M.J., Baxt B., 2004. Foot-and-mouth disease. Clinical microbiology reviews 17, 465-493.

Grubman M.J., Moraes M.P., Schutta C. 2010. Adenovirus serotype 5-vectored foot-and mouth disease subunit vaccines: the first decade. Future Virol. 5, 51–64.

Grubman M. J., Robertson B., Morgan, D. O., Moore, D., Dowbenko D. 1984. Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. J. Virol., 50, 579-586.

Gurunathan S., Klinman D.M., Seder R.A. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. Annual review of immunology 18, 927-974.
He J., Hoffman S.L., Hayes C.G. 1997. DNA inoculation with a plasmid vector carrying the hepatitis E virus structural protein gene induces immune response in mice. Vaccine 15, 357-362.

Hernandez MG, Shen L, Rock KL. 2007. CD40-CD40 ligand interaction between dendritic cells and CD8+ T cells is needed to stimulate maximal T cell responses in the absence of CD4+ T cell help. J Immunol.178, 2844-52.

Hirao LA, Wu L, Khan AS, Satishchandran A, Draghia-Akli R, Weiner DB. 2008. Intradermal/ subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and Rhesus macaques. Vaccine. 26, 440–448.

Hogle, J.M., Chow, M., Filman, D.J., 1985.Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 A resolution. Science 229, 1358-1365.

House, J. A. y Mebus, C. A. 1998. Foot-and-mouth disease. En Foreign Animal Diseases pag. 213-224. Editado por C. o. F. A. D. i. t. U. S. A. H. Association. Richmond, VA, USA: Pat Campbell & Associates and Carter Printing Company.

Huang MH, Huang CY, Lin SC, Chen JH, Ku CC, Chou AH, Liu SJ, Chen HW, Chong P, Leng CH. 2009. Enhancement of potent antibody and T-cell responses by a single-dose, novel nanoemulsion-formulated pandemic influenza vaccine. Microbes Infect. 11, 654-60.

Huang, Y.H., Wu, J.C., Tao, M.H., Syu, W.J., Hsu, S.C., Chi, W.K., Chang, F.Y., & Lee, S.D., 2000, DNA-Based immunization produces Th1 immune responses to hepatitis delta virus in a mouse model. Hepatology 32, 104-110

Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., Di Santo, J.P., 2009. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation *in vivo*. The Journal of experimental medicine 206, 25-34.

Hu XD1, Chen ST, Li JY, Yu DH, Yi-Zhang, Cai H. 2010. An IL15 adjuvant enhances the efficacy of a combined DNA vaccine against Brucella by increasing the CD8+ cytotoxic T cell response. Vaccine. 28, 2408-15.

Ihata A, Watabe S, Sasaki S, Shirai A, Fukushima J, Hamajima K, Inoue J, Okuda K. 1999. Immunomodulatory effect of a plasmid expressing CD40 ligand on DNA vaccination against human immunodeficiency virus type-1. Immunology. 98, 436-42.

Jadav SK[1], Reddy KS, Rashmi BR, Dechamma HJ, Ganesh K, Suryanarayana VV, Reddy GR. 2011. Improved immune response by ID-pVAC: a secretory DNA vaccine construct delivered by PLG micro particles against foot and mouth disease in guinea pigs. Res Vet Sci. 91, 86-9.

Jin H, Li Y, Ma Z, Zhang F, Xie Q, Gu D, Wang B. 2004. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. *Vaccine* 22, 2925–2935.

Jin H, Kang Y, Xiao C. 2005. DNA prime followed by protein boost enhances neutralisation and Th1 type immunity against FMDV. Viral Immunol. 18, 539–548.

Jiang M., Yao J., Feng G. 2014. Protective effect of DNA vaccine encoding pseudomonas exotoxin A and PcrV against acute pulmonary P. aeruginosa Infection. PLoS One. 9, e96609.

Jiang W., Swiggard W.J., Heufler C., Peng M, Mirza A., Steinman R.M., Nussenzweig M.C. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. Nature 375, 151-155.

Josien R, Wong BR, Li HL, Steinman RM, Choi Y. 1999. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells.J Immunol. 162, 2562-2568.

Joyappa D.H., Kumar C.A., Banumathi N., Reddy G.R., Suryanarayana V.V. 2009. Calcium phosphate nanoparticle prepared with foot and mouth disease virus P1-3CD gene construct protects mice and guinea pigs against the challenge virus. Vet Microbiol. 139, 58-66.

Karupiah G., Blanden R.V., Ramshaw I.A. 1990. Interferon gamma is involved in the recovery of athymic nude mice from recombinant vacciniavirus/interleukin 2 infection. J Exp Med. 172, 1495-503.

Kennedy M.K., Glaccum M., Brown S.N., Butz E.A., Viney J.L., Embers M. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. J Exp Med 191, 771–780.

Khan A.S., Pope M.A., Draghia-Akli R. 2005. Highly efficient constant-current electroporation increases *in vivo* plasmid expression. DNA Cell Biol. 24, :810-818.

Kim S.A., Liang C.M., Cheng I.C., Cheng Y.C., Chiao M.T., Tseng C.J., Lee F., Jong M.H., Tao M.H., Yang N.S., Liang S.M. 2006. DNA vaccination against foot-and-mouth disease via electroporation: study of molecular approaches for enhancing VP1 antigenicity. J Gene Med. 8, 1182-1191.

Kim J.J., Trivedi N.N., Nottingham L.K. 1998. Modulation of amplitude and direction of *in vivo* immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. Eur. J. Immunol. 28, 1089-1103

Kim J.J., Yang J.S., VanCott T.C. 2000. Modulation of antigen-specific humoral responses in Rhesusmacaques by using cytokine cDNAs as DNA vaccine adjuvants. J. Virol. 74, 3427–3429.

Kim J.J., Yang J.S., Manson K.H., Weiner D.B. 2001. Modulation of antigen-specific cellular immune responses to DNA vaccination in Rhesus macaques through the use of IL-2, IFN-gamma, or IL-4 gene adjuvants. Vaccine. 19, 2496-2505

Kim S.A., Liang C.M., Cheng I.C. 2006. DNA vaccination against foot-and-mouth disease via electroporation: study of molecular approaches for enhancing VP1. J. Gene Med. 8, 1182–1191

King, A.M., Underwood, B.O., McCahon, D., Newman, J.W., Brown, F. 1981. Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot and mouth disease in the UK. Nature 293, 479-480.

Kitson J.D., McCahon D., Belsham G.J. 1990. Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot and mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. Virology 179, 26-34.

Klinman D.M., Currie D., Gursell Verthelyi D. 2004. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. Immunol. Rev. 199, 201–216

Kutzler M.A., Robinson T.M., Chattergoon M.A. 2005. Coimmunization with an optimized IL-15 plasmid results in enhanced function and longevity of CD8 T cells that are partially independent of CD4 T cell help. J. Immunol 175, 12–123

Kwissa M., Kroger A., Hauser H., Reimann J., Schirmbeck R. 2003. Cytokine-facilitated priming of CD8+ T cell responses by DNA vaccination. J Mol Med (Berl) 81, 91-101.

Laman J.D., Claassen E., Noelle R.J. 1996. Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L). Critical reviews in immunology 16, 59-108.

Langellotti, C.A., Pappalardo J.S., Quattrocchi V., Mongini C., Zamorano P. 2011. Induction of specific cytotoxic activity for bovine herpesvirus-1 by DNA immunization with different adjuvants. Antiviral research 90, 134-142.

Langellotti S., Romano M., Guarnaccia C., Granata V., Orrù S., Zagari A., Baralle F.E., Salvatore F. 2014 A novel anti-aldolase C antibody specifically interacts with residues 85-102 of the proteinMAbs.6, 708-17.

Larsen D.L., Karasin A., Olsen C.W. 2001. Immunization of pigs against influenza virus infection by DNA vaccine priming followed by killed-virus vaccine boosting. Vaccine. 19, 2842-2853

Lauwerys B.R., Garot N., Renauld J.C., Houssiau F.A. 2000. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. Journal of immunology 165, 1847-1853.

Lavoria M.Á., Di-Giacomo S., Bucafusco D., Franco-Mahecha O.L., Pérez-Filgueira D.M., Capozzo A.V. 2012. Avidity and subtyping of specific antibodies applied to the indirect assessment of heterologous protection against Foot-and-Mouth Disease Virus in cattle. Vaccine.30, 6845-6850.

Lewis P.A., Loomis D. 1924. Allergic irritability. The formation of anti-sheep hemolytic amboceptor in the normal and tuberculous guinea pig. J. Exp. Med. 40: 503-508.

Li J., Liu Y., Liu X., Shang Y., Liu J., An F., Yin H. 2008. Screening and stability of Madin-Darby bovine kidney cell strain co-expressing the capsid precursor protein P1-2A gene and the protease 3C gene of foot-and-mouth disease virus. Wei Sheng Wu Xue Bao. 48, 1520-1525.

Li S., Qi X., Gao Y., Hao Y., Cui L., Ruan L., He W. 2010. IL-15 increases the frequency of effector memory CD8+ T cells in rhesus monkeys immunized with HIV vaccine. Cellular & molecular immunology 7, 491-494.

Liebermann H.T., Thalmann G., Bartels T., Nockler A. 1993, Experiments on an early protection against foot-and-mouth disease virus. Acta Virol 37, 181-183.

Lin F.C., Peng Y., Jones L.A., Verardi P.H., Yilma T.D. 2009. Incorporation of CD40 ligand into the envelope of pseudotyped single-cycle Simian immunodeficiency viruses enhances immunogenicity. J Virol. 83, 1216-1227.

Liu M.A., Ulmer J.B. 2005. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. Adv Genet. 55, 25-40.

Li Y., Aggarwal N., Takamatsu H.H., Sterling C.M., Voyce C., Barnett P.V. 2006. Enhancing immune responses against a plasmid DNA vaccine encoding a FMDV empty capsid from serotype O. Vaccine 24, 4602-4606.

Li Y., Stirling C., Denyer M. 2008. Dramatic improvement in FMD DNA vaccine efficacy and cross-serotype antibody induction in pigs following a protein boost.Vaccine 26, 2647–2656

Li Y.G., Tian F.L., Gao F.S., Tang X.S., Xia C. 2006. Immune responses generated by Lactobacillus as a carrier in DNA immunization against foot-and-mouth disease virus. Vaccine. 25, 902-11.

Li W., Li S., Hu Y., Tang B., Cui L., He W. 2008. Efficient augmentation of a long-lasting immune responses in HIV-1 Gag DNA vaccination by IL-15 plasmid boosting. Vaccine. 26, 3282–3290.

Li Y., Aggarwal N., Takamatsu H.H., Sterling C.M., Voyce C., Barnett P.V. 2006. Enhancing immune responses against a plasmid DNA vaccine encoding a FMDV empty capsid from serotype O. Vaccine. 24, 4602-4606.

Li Z., Yi Y., Yin X., Zhang Z., Liu J. 2008. Expression of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. PLoS One. 3, e2273.

Li Z., Yin X., Yi Y., Li X., Li B., Lan X., Zhang Z., Liu J. 2010. FMD subunit vaccine produced using a silkworm-baculovirus expression system: protective efficacy against two type Asia1 isolates in cattle.Vet Microbiol. 149, 99-103.

Lim K.L., Jazayeri S.D., Yeap S.K., Alitheen N.B., Bejo M.H., Ideris A., Omar A.R. 2012. Co-administration of avian influenza virus H5 plasmid DNA with chicken IL-15 and IL-18 enhanced chickens immune responses. BMC Vet Res 8, 132.

Lin S.J., Yan D.C., Kuo M.L., Cheng P.J., Hsiao S.S., Tsai T.L. 2005. Effect of FK506 on the interleukin 15-driven proliferation and apoptosis of anti-CD3-activated umbilical cord blood T cells. Ann Allergy Asthma Immunol. 95, 586-592.

Li Z., Yin X., Yi Y., Li X., Li B., Lan X., Zhang Z., Liu J. 2010. FMD subunit vaccine produced using a silkworm-baculovirus expression system: protective efficacy against two type Asia1 isolates in cattle. Vet Microbiol. 149, 99-103.

Lodolce J.P., Boone D.L., Chai S., Swain R.E., Dassopoulos T., Trettin S. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. Immunity 9, 669–676.

Lopez O. J., Sadir A.M., Borca M.V., Fernandez F.M., Braun M., Schudel A.A. 1990. Immune response to foot-and-mouth disease virus in an experimental murine model. II. Basis of persistent antibody reaction. Vet Immunol Immunopathol 24:313-321.

Lori F., Weiner D.B., Calarota S.A., Kelly L.M., Lisziewicz J. 2006**.** Cytokine-adjuvanted HIV-DNA vaccination strategies. Springer Semin Immunopathol. 28**,** 231-238.

Loudon P.T., Yager E.J., Lynch D.T. 2010. GM-CSF increases mucosal and systemic immunogenicity of an H1N1 influenza DNA vaccine administered into the epidermis of nonhuman primates. PLoS One. 5,e11021.

Ma W., Wei J., Wei Y., Guo H., Jin Y., Xue Y., Wang Y., Yi Z., Liu L., Huang J., Wang L. 2014. Immunogenicity of the capsid precursor and a nine-amino-acid site-directed mutant of the 3C protease of foot-and-mouth disease virus coexpressed by a recombinant goatpox virus. Arch Virol. 159, 1715-1722.

Macatonia S.E., Taylor P.M., Knight S.C., Askonas B.A. 1989 Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. J. Exp. Med. 169, 3236-3244.

Manoj S., Griebel P.J., Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S. 2004. Modulation of immune responses to bovine herpesvirus-1 in cattle by immunization with a DNA vaccine encoding glycoprotein D as a fusion protein with bovine CD154. *Immunology* 112, 328–338.

Maradei E., La Torre J. L., Robiolo B., Esteves J., Seki C., Pedemonte A., Iglesias M., D'Aloia R., Mattion N. 2008. Updating of the correlation between IpELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphthovirus vacines in Argentina. Vaccine 26, 6577-6586.

Martín-Fontecha A., Thomsen L.L., Brett S., Gerard C., Lipp M., Lanzavecchia A., Sallusto F. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. Nat Immunol. 5, 1260-1265.

Mason P.W., Piccone M.E., McKenna T.S., Chinsangaram J., Grubman M.J., 1997. Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. Virology 227, 96-102.

Mattion N., Smitsaart E., Mazza M., Harrison N., Filippi J., Robiolo B. 1998. Emergency vaccine for foot-and-mouth disease: early inmunity inductionin susceptible species. Vet. Argentina, 148, 563-572.

Mattion N., Konig G., Seki C., Smitsaart E., Maradei E., Robiolo B., Duffy S., Leon E., Piccone M., Sadir A., Bottini R., Cosentino B., Falczuk A., Maresca R., Periolo O., Bellinzoni R., Espinoza A., Torre J.L., Palma E.L. 2004. Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: characterisation of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease. Vaccine 22, 4149-4162.

Mayr G.A., Chinsangaram, J., Grubman M.J., 1999. Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. Virology 263, 496-506.

McClements W.L., Armstrong M.E., Keys R.D., Liu M.A. 1996. Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease. Proc. Natl Acad. Sci. USA 93, 11414–11420.

Mc Cullough, K.C., Crowther J.R., Burcher R.N., Carpenter W.C., Brocchi E., Capucci L. De Simone F. 1986. Immune protection against foot and mouth disease virus studied using neutralizing and nonneutralizing concentration of monoclonal antibodies. Inmunology 58, 421-428

McCullough K.C., Parkinson D., Crowther J.R. 1988. Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. Immunology 65, 187-191.

McCullough K.C., De Simone F., Brocchi E., Capucci E., Crowther J.R., Kihm U. 1992. Protective inmune response against foot-and-mouth disease. J. Virol., 66, 1835-1840.

McCullough K.C., De Simone F., Brocchi E., Capucci L., Crowther J.R., Kihm U. 1992. Protective immune response against foot-and-mouth disease. J Virol 66, 1835-1840.

McCullough, K.C., Crowther J.R., Butcher R.N.,. Carpenter W.C, Brocchi E., Capucci L., De Simone F. 1986. Immune protection against foot-and-mouth disease virus studied using

virusneutralizing and non-neutralizing concentrations of monoclonal antibodies. Immunology 58, 421-428.

McVicar J.W., Sutmoller P., 1969. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. II. The carrier status of cattle exposed to foot-and-mouth disease following vaccination with an oil adjuvant inactivated virus vaccine, Archiv fur die gesamte Virusforschung, 1969/01/01, 217-224.

Mignaqui A.C., Ruiz V., Perret S., St-Laurent G., Singh Chahal P., Sammarruco A., Gnazzo V., Durocher Y., Wigdorovitz A. 2013. Transient gene expression in serum-free suspension-growing mammalian cells for the production of foot-and-mouth disease virus empty capsids. PLoS One. 20, e72800.

Mingxiao M., Ningyi J., Juan L.H. 2007. Immunogenecity of plasmid encoding P12A and 3C of FMDV and swine IL-18.Antivir. Res. 76, 59–67.

Miyahira Y., Akiba H., Katae M., Kubota K., Kobayashi S., Takeuchi T., Garcia-Sastre A., Fukuchi Y., Okumura K., Yagita H., Aok, T. 2003. Cutting edge: a potent adjuvant effect of ligand to receptor activator of NF-kappa B gene for inducing antigen-specific CD8+ T cell response by DNA and viral vector vaccination. Journal of immunology 171, 6344-6348.

Montgomery D.L., Shiver J.W., Leander K.R. 1993. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. DNA Cell Biol.12, 777–783.

Moore A.C., Kong W.P., Chakrabarti B.K., Nabel G.J. 2002. Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice. J. Virol. 76, 243–250.

Moraes M.P., Mayr G.A., Mason P.W., Grubman M.J., 2002. Early protection against homologous challenge after a single dose of replication-defective human adenovirus type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24. Vaccine 20, 1631-1639.

Morgan D.O., Moore D.M., McKercher P.D. 1980. Vaccination against foot-and-mouth disease. Prog Clin Biol Res 47, 169-78.

Mowat G.N., Brooksby J.B., Pay T.W. 1962. Use of BHK 21 cells in the preparation of mouse attenuated live foot-and-mouth disease vaccines for the immunization of cattle. Nature 196, 655-656

Nanda R.K., Hajam I.A., Edao B.M., Ramya K., Rajangam M., Chandra Sekar S., Ganesh K., Bhanuprakash V., Kishore S. 2014. Immunological evaluation of mannosylated chitosan nanoparticles based foot and mouth disease virus DNA vaccine, pVAC FMDV VP1-OmpA in guinea pigs. Biologicals.42, 153-159.

Nagarajan G., Ravikumar P., Ashok Kumar C., Reddy G.R., Dechamma H.J., Suryanarayana V.V. 2011. Self Replicating Gene Vaccine Carrying P1-2A Gene of FMDV Serotype O and its Effects on the Immune Responses of Cattle. Indian J Virol. 22, 50-58

Niborski V., Li Y., Brennan F., 2006. Efficacy of particle-based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV. Vaccine 24, 7204–7213.

Oh S., Berzofsky J.A., Burke D.S., Waldmann T.A., Perera L.P. 2003. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 3392-3397.

Oh S., Perera L.P., Terabe M., Ni L., Waldmann T.A., Berzofsky J.A. 2008. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 105, 5201-5206.

Oleksiewicz M.B., Donaldson A.I., Alexandersen S. 2001. Development of a novel real-time RT-PCR assay for quantitation of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues. Journal of virological methods 92, 23-35.

Ostrowski M., Vermeulen M., Zabal O., Geffner J.R., Sadir A.M., Lopez O.J. 2005. Impairment of thymus-dependent responses by murine dendritic cells infected with foot-and-mouth disease virus. J Immunol. 175, 3971-3979.

Ostrowski, M., Vermeulen M., Zabal O., Zamorano P. I., Sadir A. M., Geffner J. R., Lopez O. J. 2007. The early protective thymus-independent antibody response to foot-and-mouth disease virus is mediated by splenic CD9+ B lymphocytes. J Virol 81, 9357-9367

Oxenius A., Campbell, K.A., Maliszewski C.R., Kishimoto T., Kikutani H., Hengartner H., Zinkernagel R.M., Bachmann M.F. 1996. CD40-CD40 ligand interactions are critical in T-B cooperation but not for other anti-viral CD4+ T cell functions. The Journal of experimental medicine 183, 2209-2218.

Pacheco J.M., Brum M.C., Moraes M.P., Golde W.T., Grubman M.J. 2005. Rapid protection of cattle from direct challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by a single inoculation with an adenovirus-vectored FMDV subunit vaccine. Virology 337, 205-209.

Parida S., Oh Y., Reid S.M., Cox S.J., Statham R.J., Mahapatra M., Anderson J., Barnett P.V., Charleston B., Paton D.J. 2006. Interferon-gamma production *in vitro* from whole blood of foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccinated and infected cattle after incubation with inactivated FMDV. Vaccine 24, 964-969.

Patch J.R., Dar P.A., Waters R., Toka F.N., Barrera J., Schutta C., Kondabattula G., Golde W.T. 2014. Infection with foot-and-mouth disease virus (FMDV) induces a natural killer (NK) cell response in cattle that is lacking following vaccination. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 37, 249-257.

Paul A.V., van Boom J.H., Filippov, D., Wimmer E. 1998. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase.Nature 393, 280-284

Pega J., Bucafusco D., Di Giacomo S., Schammas J.M., Malacari D., Capozzo A.V., Arzt J., Pérez-Beascoechea C., Maradei E., Rodríguez L.L., Borca M.V., Pérez-Filgueira M. 2013. Early adaptive immune responses in the respiratory tract of foot-and-mouth disease virus-infected cattle. J Virol. 87, 2489-2495.

Pena L., Moraes M.P., Koster M., Burrage T., Pacheco J.M., Segundo F.D., Grubman M.J, 2008. Delivery of a foot-and-mouth disease virus empty capsid subunit antigen with nonstructural protein 2B improves protection of swine. Vaccine 26, 5689-5699.

Pecker A. (2007). *Fiebre Aftosa. Su paso por la Argentina.* Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

Perez Filgueira D.M., Berinstein A., Smitsaart E., Borca M.V., Sadir A.M. 1995. Isotype profiles induced in Balb/c mice during foot and mouth disease (FMD) virus infection or immunization with different FMD vaccine formulations. Vaccine 13, 953-960.

Periolo O., Seki C., Grigera P., Robiolo B., Fernandez G., Maradei E., La Torre J.L. 1993. Large scale use of liquid-phase blocking sandwich ELISA for the evaluation of protective

immunity against aphthovirus in catlle vaccinated with oil-adjuvanted vaccines in Argentina. Vaccine, 11, 754-760.

Pertmer T.M., Oran A.E., Madorin C.A., Robinson H.L. 2001. Th1 genetic adjuvants modulate immune responses in neonates. Vaccine. 19, 1764–1771.
Piatti P.G., Berinstein A., Lopez O.J., Borca M.V., Fernandez F., Schudel A.A.,Sadir A.M.. 1991. Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. J Gen Virol 72, 1691-1694.

Piccone M.E., Sira S., Zellner M., Grubman M.J., 1995. Expression in Escherichia coli and purification of biologically active L proteinase of foot-and-mouth disease virus. Virus research 35, 263-275.

Picker LJ., Reed-Inderbitzin E.F., Hagen S.I., Edgar J.B., Hansen S.G., Legasse A., Planer S., Piatak M. Jr, Lifson J.D., Maino V.C., Axthelm M.K., Villinger F. 2006. IL-15 induces CD4 effector memory T cell production and tissue emigration in nonhuman primates. J Clin Invest. 116, 1514-1524.

Pizzi J. C. 1998. *Fiebre Aftosa en Argentina.* EUDEBA.

Pulendran B., Banchereau J., Maraskovsky E., Maliszewski C. 2001 Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. Trends Immunol. 22, 41-47

Quezada S.A., Jarvinen L.Z., Lind E.F., Noelle R.J. 2004. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 22, 307-28.

Quattrocchi V., Langellotti, C., Pappalardo J.S., Olivera V., Di Giacomo S., van Rooijen N., Mongini C., Waldner C., Zamorano P.I., 2011. Role of macrophages in early protective immune responses induced by two vaccines against foot and mouth disease. Antiviral research 92, 262-270.

Quattrocchi V., Pappalardo J.S., Langellotti C., Smitsaart E., Fondevila N., Zamorano P. 2014. Early protection against foot-and-mouth disease virus in cattle using an inactivated vaccine formulated with Montanide ESSAI IMS D 12802 VG PR adjuvant. Vaccine 32, 2167-2172.

Radlett P.J., Pay T.W., Garland A.J. 1985, The use of BHK suspension cells for the commercial production of foot and mouth disease vaccines over a twenty year period. Dev Biol Stand 60, 163-170.

Ramshaw I.A., Ramsay A.J., Karupiah G., Rolph M.S., Mahalingam S., Ruby, J.C. 1997. Cytokines and immunity to viral infections. Immunological reviews 159, 119-135.

Reed M.J., Muench H. 1938. A simple method for estimating fifty percent end points. Am. J. Hyg. 27, 493-497

Ren X., Xue F., Zhu Y., Tong G., Wang Y., Feng J., Zu L., Li J., Shi H., Gao Y. 2009. Construction and identification of recombinant BHV-1 expressing foot and mouth disease virus VP1 gene. Wei Sheng Wu Xue Bao. 49, 677-82.

Rodriguez A.E., Zamorano P., Wilkowsky S., Torrá F., Ferreri L., Dominguez M., Florin-Christensen M. 2013. Delivery of recombinant vaccines against bovine herpesvirus type 1 gD and Babesia bovis MSA-2c to mice using liposomes derived from egg yolk lipids. Vet J. 196, 550-551.

Robinson H.L., Hunt L.A., Webster R.G. 1993. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. Vaccine 11, 957–960.

Robinson H.L., Montefiori D.C., Villinger F. 2006. Studies on GM-CSF DNA as an adjuvant for neutralizing Ab elicited by a DNA/MVA immunodeficiency virus vaccine. Virology 352, 285–294.

Romanutti C., D'Antuono A., Palacios C., Quattrocchi V., Zamorano P., La Torre J., Mattion N. 2013. Evaluation of the immune response elicited by vaccination with viral vectors encoding FMDV capsid proteins and boosted with inactivated virus. Vet Microbiol 30, 333-340.

Rowlands D.J., Sangar D.V., Brown F. 1975. A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and mouth disease virus. The Journal of general virology 26, 227-238.

Robertson B. H., Grubman M.J., Weddell G.N., Moore D.M., Welsh J.D., Fischer T., Dowbenko D.J., Yansura D.G., Small B., Kleid D.G. 1985. Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12. J Virol 54:651-660.

Rosenbusch C.T., Decamps A., Gelormini N. 1948, Intradermal foot-and-mouth disease vaccine; results obtained from the first million head of cattle vaccinated. J Am Vet Med Assoc 112, 45-47.

Rueckert R. R.; Wimmer E. 1984. Systematic nomenclature of picornavirus proteins. J. Gen. Virol., 50, 957-959.

Ruiz V., Mignaqui A.C., Nuñez M.C., Reytor E., Escribano J.M., Wigdorovitz A. 2014. Comparison of strategies for the production of FMDV empty capsids using the baculovirus vector system. Mol Biotechnol. 56, 963-970.

Rweyemamu M.M., Terry G., Pay T.W., 1979. Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. Archives of virology 59, 69-79.

Saade F., Petrovsky N. 2012. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. Expert Rev Vaccines. 11, 189-209.

Salguero F.J., Sanchez-Martin, M.A., Diaz-San Segundo F., de Avila A., Sevilla N. 2005. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes an acute disease that can be lethal for adult laboratory mice. Virology 332, 384-396.

Sangar D.V., Rowlands D.J., Cavanagh D., Brown F. 1976, Characterization of the minor polypeptides in the foot-and-mouth disease particle. J Gen Virol 31, 35- 46.

Sanz-Parra A., Jimenez-Clavero M.A., García-Briones M.M., Blanco E., Sobrino F., Ley V. 1999. Recombinant viruses expressing the foot-and-mouth disease virus capsid precursor polypeptide (P1) induce cellular but not humoral antiviral immunity and partial protection in pigs. Virology. 259, 129-34.

Schirmbeck R., Bohm W., Ando K., Chisari F.V., Reimann J., 1995. Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. Journal of virology 69, 5929-5934.

Schudel A.A. 1986, Fiebre aftosa. Adel. de Microbiol. Enf. Infecc 5, 22-36.

Seki C., Robiolo B., Periolo O., Iglesias M., D´Antuono A., Maradei E., Barros V., La Torre J., Mattion, N. 2009. Rapid methodology for antigenic profiling of FMDV field strains and for the control of identity, purity and viral integrity in commercial virus vaccines using monoclonal antibodies. Veterinary Microbiology, 133, 239-251.

Segundo F.D., Weiss M,. Pérez-Martín E., Dias C.C., Grubman M.J., Santos T de L. 2012. Inoculation of swine with foot-and-mouth disease SAP-mutant virus induces early protection against disease. J Virol. 86, 1316-1327.

Sellers R.F., Herniman K.A., Donaldson A.I. 1971. The effects of killing or removal of animals affected with foot-and-mouth disease on the amounts of airborne virus present in looseboxes. The British veterinary journal 127, 358-365.
.
Shahan M.S. 1962. The virus of foot-and-mouth disease. Annals of the New York Academy of Sciences 101, 444-454.

Shakya A.K., Kumar A.., Klaczkowska D., Hultqvist M., Hagenow K., Holmdahl R., Nandakumar K.S. 2011. Collagen type II and a thermo-responsive polymer of N-isopropylacrylamide induce arthritis independent of Toll-like receptors: a strong influence by major histocompatibility complex class II and Ncf1 genes. Am J Pathol. 179, 2490-500.

Shao H.J., Chen L., Su Y.B. 2005. DNA fragment encoding human IL-1β 163–171 peptide enhances the immune responses elicited in mice by DNA vaccine against foot-and mouth disease. *Vet. Res. Comm.* 29, 35–46.

Shariati Mehr K., Mousavi S.L., Rasooli I., Amani J., Rajabi M. 2012. A DNA vaccine against Escherichia coli O157:H7. Iran Biomed J. 16, 133-139.
.
Shi X.J., Wang B., Wang M. 2007. Immune enhancing effects of recombinant bovine IL-18 on foot-and-mouth disease vaccination in mice model. Vaccine. 25, 1257-64.

Shi X.J., Wang B., Zhang C., Wang M. 2006. Expressions of Bovine IFN-gamma and foot-and-mouth disease VP1 antigen in P. pastoris and their effects on mouse immune response to FMD antigens. Vaccine 24, 82-89.

Shieh J.J., Liang C.M., Chen C.Y. 2001. Enhancement of the immunity to foot-andmouth disease virus by DNA priming and protein boosting immunization. Vaccine 19, 4002–4010.

Sobrino F., Sáiz M., Jiménez-Clavero M.A., Núñez J.I., Rosas M.F., Baranowski E., Ley V. 2001. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. Vet Res. 32, 1-30.

Somasundaram C., Takamatsu H., Andreoni, C., Audonnet J.C., Fischer L., Lefevre F., Charley B. 1999. Enhanced protective response and immuno-adjuvant effects of porcine GM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. Veterinary immunology and immunopathology 70, 277-287.

Song H., Wang Z., Zheng D., Fang W., Li Y., Liu Y., Niu Z., Qiu B. 2005. A novel mucosal vaccine against foot-and-mouth disease virus induces protection in mice and swine. Biotechnol Lett. 27, 1669-1674.

Stone G.W., Barzee S., Snarsky V. 2006. Multimeric soluble CD40 ligand and GITR ligand as adjuvants for human immunodeficiency virus DNA vaccines. J. Virol. 80, 1762–1772.

Strohmaier K., Franze R., Adam K.H. 1982. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. The Journal of general virology 59, 295-306.

Su B., Wang J., Wang X. 2008. The effects ofIL-6 and TNF-α as molecular adjuvants on immune responses to FMDV and maturation of dendritic cells by DNA vaccination. Vaccine 26, 5111–5122.

Su B., Wang J., Zhao G., Wang X., Li J., Wang B. 2012. Sequential administration of cytokine genes to enhance cellular immune responses and CD4 (+) T memory cells during DNA vaccination. Hum Vaccin Immunother. 8, 1659-1667.

Subramanian B., Madhanmohan M., Sriraman R., Chandrasekhar Reddy R.V., Yuvaraj S., Manikumar K., Rajalakshmi S., Nagendrakumar S.B., Rana S.K., Srinivasan V.A. 2012. Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency. Antiviral Res. 96, 288-295.

Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD. 2004. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. Nat Rev Immunol. 4, 420-431.

Summerfield A., Guzylack-Piriou L., Harwood L., McCullough K.C., 2009. Innate immune responses against foot-and-mouth disease virus: current understanding and future directions. Veterinary immunology and immunopathology 128, 205-210.

Taechavasonyoo A., Hirono I., Kondo H. 2013. The immune-adjuvant effect of Japanese flounder Paralichthys olivaceus IL-1beta. Developmental and comparative immunology 41, 564-568.

Talbot P., Rowlands D.J., Burroughs J.N., Sangar D.V., Brown F. 1973, Evidence for a group protein in foot-and-mouth disease virus particles. J Gen Virol 19, 369-380

Tang CK, Pietersz GA. 2009. Intracellular detection and immune signaling pathways of DNA vaccines. Expert Rev. Vaccines. 8, 1161–1170.

Tateda K, Moore TA, Newstead MW, Tsai WC, Zeng X, Deng JC, Chen G, Reddy R, Yamaguchi K, Standiford TJ. 2001. Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of Legionella pneumonia: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. Infect Immun. 69, 2017-2024.

Tizzard I. Veterinary Immunology — an Introduction. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1987:129–158.
Toka F.N., Rouse B.T. 2005. Mucosal application of plasmid-encoded IL-15 sustains a highly protective anti-Herpes simplex virus immunity. J. Leukoc. Biol. 78, 178–186.

Tripp R.A., Jones L., Anderson L.J., Brown M.P. 2000. CD40 ligand (CD154) enhances the Th1 and antibody responses to respiratory syncytial virus in the BALB/c mouse. J Immunol. 164, 5913-5921.

Tumpey T.M., García-Sastre A., Taubenberger J.K., Palese P., Swayne D.E., Pantin-Jackwood M.J., Schultz-Cherry S., Solórzano A., Van Rooijen N., Katz JM, Basler C.F. 2005. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. J Virol. 79, 14933-14944.

Turner P.C., Moyer R.W. 2002. Poxvirus immune modulators: functional insights from animal models. Virus Res 88, 35-53.

Ulmer J.G., Donnelly J.J., Parker S.E. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science 259, 1745–1749.

Uddowla S., Hollister J., Pacheco J.M., Rodriguez L.L., Rieder E. 2012. A safe foot-and-mouth disease vaccine platform with two negative markers for differentiating infected from vaccinated animals. J Virol. 86, 11675-11685.

Vaine M., Wang S., Hackett A., Arthos J., Lu S. 2010. Antibody responses elicited through homologous or heterologous prime-boost DNA and protein vaccinations differ in functional activity and avidity. Vaccine. 28, 2999-3007.

Van Bekkum J.G. 1969. Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMDV. Session of research group of standing technical committee of the European Commission for the control of foot and mouth disease, Italy: Brescia.

Van Kooten C., Banchereau J. 1997. Functional role of CD40 and its ligand. International archives of allergy and immunology 113, 393-399.

Van Kooten C., Woltman A.M., Daha M.R. 2000. Immunological function of tubular epithelial cells: the functional implications of CD40 expression. Experimental nephrology 8, 203-207.

Van Maanen C., Terpstra C. 1989, Comparison of a liquid-phase blocking sandwich ELISA and a serum neutralization test to evaluate immunity in potency tests of foot-and-mouth disease vaccines. J Immunol Methods 124, 111-119.

Vidal M., Cairo J., Mateu M.G., Villaverde A., 1991. Molecular cloning and expression of the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus C1 in E. coli: effect on bacterial cell viability. Applied microbiology and biotechnology 35, 788-792.

Vojvodić S., Popović S. 2010. Natural killer cell biology, functions and clinical relevance Med Pregl. 63, 91-97.

Waldmann T.A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. Nat Rev Immunol. 6, 595-601.
Wang B., Boyer J., Srikantan V., Coney L., Carrano R., Phan C., Merva M., Dang K., Agadjanan M., Gilbert L. 1993. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. DNA and cell biology 12, 799-805.

Wang X., Zhang X., Kang Y. 2008. Interleukin-15 enhance DNA vaccine elicited mucosal and systemic immunity against foot and mouth disease virus. Vaccine 26, 5135–5144.

Wang Y., Shen Q., Jiang Y., Song Y., Fang L., Xiao S., Chen H. 2012. Immunogenicity of foot-and-mouth disease virus structural polyprotein P1 expressed in transgenic rice. J Virol Methods. 181, 12-17.

Ward G., Rieder E., Mason P.W. 1997. Plasmid DNA encoding replicating foot and mouth disease virus genomes induces antiviral immune response in swine. J. Virol. 71, 7442–7447.

Webster R.G., Robinson H.L. 1997. DNA vaccines: a review of developments. BioDrugs.8, 273-92.

Webster D.P., Dunachie S., Vuola J.M. 2005. Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. Proc. Natl Acad. Sci. USA.102, 4836–4841.

Wigdorovitz A., Sadir A. 1996, Mechanisms involved in the prolonged humoral immune response: behavior of aphthous fever virus. Rev Argent Microbiol 28, 45-54.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Wild T.F., Brown F. 1967, Nature of the inactivating action of trypsin on foot-andmouth disease virus. J Gen Virol 1, 247-250. J Exp Med. 186, 2075-80.

Wong B.R., Josien R., Lee S.Y., Sauter B., Li H.L., Steinman R.M., Choi Y. 1997. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. J Exp Med. 15, 2075-2080.

Wong H.T., Cheng S.C.S, Chan E.W.C. 2000. Plasmids encoding foot-and-mouthdisease virus VP1 epítopes elicited immune responses in mice and swine and protected swine against viral infection. Virology 278, 27–35.

Wong H.T., Cheng S.C.S., Sin W.Y., Chan E.W.C., Sheng Z.T., Xie Y. 2002. A DNA vaccine against foot-and-mouth disease elicits an immune response in swine which is enhanced by co-administration with interleukin-2. Vaccine 20, 2641–2647.

Woude V. 1972. Chemical and physical properties of foot-and-mouth disease virus: a comparison with Maus Elberfeld virus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1222-1229.

Xia C. 2007 Immune responses generated by *Lactobacillus* as a carried in DNA immunisation against foot-and-mouth disease virus. Vaccine 25, 902–911.

Xiao C., Jin H., Hu Y. 2007. Enhanced protective efficacy and reduced viral load of foot-and-mouth disease DNA vaccine with co-stimulatory molecules as the molecular adjuvants. *Antivir. Res.* 76, 11–20.

Xiang Z.Q., Spitalnik S.L., Cheng J., Erikson J., Wojczyk B., Ertl H.C. 1995. Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. Virology 209: 569–579.

Xu H., Zhao G., Huang X. 2010. CD40-expressing plasmid induces anti-CD40antibody and enhances immune responsesto DNA vaccination. J. Gene Med. 12, 97–106.

Yao Q., Fischer K.P., Li L., Agrawal B., Berhane Y., Tyrrell D.L., Gutfreund K.S., Pasick J. 2010. Immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding a chimeric protein of avian influenza hemagglutinin subtype H5 fused to CD154 (CD40L) in Pekin ducks. Vaccine. 28, 8147-56.

Yang Y., Su Q., Grewal I.S., Schilz R., Flavell R.A., Wilson J.M. 1996. Transient subversion of CD40 ligand function diminishes immune responses to adenovirus vectors in mouse liver and lung tissues. Journal of virology 70, 6370-6377.

Yang N.S., Wang J.H., Lin K.F., Wang C.Y., Kim S.A., Yang Y.L., Jong M.H., Kuo T.Y., Lai S.S., Cheng R.H., Chan M.T., Liang S.M. 2005. Comparative studies of the capsid precursor polypeptide P1 and the capsid protein VP1 cDNA vectors for DNA vaccination against foot-and-mouth disease virus. J Gene Med. 7, 708-717.

Yankauckas M.A., Morrow J.E., Parker S.E. 1993. Long-term anti-nucleoprotein celular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing the *NP* gene. DNA Cell Biol. 12, 771–776.

Zamorano P.I., Wigdorovitz A., Perez Filgueira D.M., Escribano J.M., Sadir A.M., Borca M.V. 1998. Induction of anti foot and mouth disease virus T and B cell responses in cattle immunized with a peptide representing ten amino acids of VP1. Vaccine 16, 558-563.

Zamorano P., Decheneux C., Quattrocchi V., Olivera V., Langellotti C., Di Giacomo S., Kahn N., Trotta M., Guinzburg M., Sadir A., Smitsaart E. 2010. Vaccination against FOOT-

AND-MOUTH DISEASE VIRUS, association between humoral immune response in cattle and mice. Symposium:,Practical Alternatives to Reduce Animal Testing in Quality Control of Veterinary Biologicals in the Americas" February 18 – 19, Buenos Aires – Argentina

Zhang W., Dong S.F., Sun S.H., Wang Y., Li G.D., Qu D. 2006. Coimmunization with IL-15 plasmid enhances the longevity of CD8 T cells induced by DNA encoding hepatitis B virus core antigen. World journal of gastroenterology , WJG 12, 4727-4735.

Zhang H.Y., Sun S.H., Gui Y.J. 2008. Optimising strategy for plasmid DNAs containing multiple-epítopes of foot-andmouth disease virus by *cis*-expression with IL-2. Vaccine 26, 769–777.

Zheng M., Jin N., Zhang H., Jin M., Lu H., Ma M., Li C., Yin G., Wang R., Liu Q. 2006. Construction and immunogenicity of a recombinant fowlpox virus containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus. Journal of virological methods 136, 230-237.

Zou Q., Wu B., He X. 2010. Increasing a robust antigen-specific cytotoxic T lymphocyte response by FMDV DNA vaccination with IL-9 expressing construct. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 1–8.

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/98.html.

http://www.intechopen.com/books/melanoma-from-early-detection-to-treatment/recombinant-dna-technology-in-emerging-modalities-for-melanoma-immunotherapy