Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Evaluación de la respuesta inmune inducida por distintos inmunógenos recombinantes dirigidos contra el Virus de la Fiebre Aftosa

Romanutti, Carina

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Romanutti, Carina. (2012). Evaluación de la respuesta inmune inducida por distintos inmunógenos recombinantes dirigidos contra el Virus de la Fiebre Aftosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Romanutti, Carina. "Evaluación de la respuesta inmune inducida por distintos inmunógenos recombinantes dirigidos contra el Virus de la Fiebre Aftosa". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

"EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR DISTINTOS INMUNÓGENOS RECOMBINANTES DIRIGIDOS CONTRA EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA"

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Carina Romanutti

Director de tesis: Dra. Nora Mattion
Director Asistente: Dra. Alejandra D'Antuono
Consejero de Estudios: Dra. Elsa Damonte
Lugar de trabajo: Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein-CONICET

Buenos Aires, 2012

AGRADECIMIENTOS

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

* Al Dr. José La Torre, por haberme brindado un lugar en el Instituto ICT Milstein y haberme permitido desarrollar ahí mi tesis doctoral.

* A mi directora de tesis, la Dra. Nora Mattion, por haberme concedido la oportunidad de realizar mi tesis de doctorado y por todo el apoyo en estos 6 años de trabajo.

* A mi co-directora, la Dra. Alejandra D'Antuono, por haberme enseñado todo lo que sé sobre el trabajo en el laboratorio, por su ayuda en el diseño de experimentos e interpretación de resultados y por marcarme siempre el camino por donde continuar.

* Al CONICET y al FONCyT, por brindarme los medios para realizar esta tesis de doctorado.

* A Marinita, por los mates dulces con burrito de todas las mañanas!!! Gracias por la amistad que me brindas cada día, por ayudarme en todo, por las charlas, los consejos, las confidencias. Marinator, qué lindo es haberte conocido!!

* A Lore y a Paula, por tantas charlas de trabajo y principalmente "de las otras" que son sin duda las más importantes y por la amistad que nació junto con esta tesis. Pauli…gracias por el aguante, los consejos y la contención sobre todo en esta última semana previa a la entrega de la tesis!!!

* Al resto de los chicos del Lab: Adrián, Negro, Lety, Horacio, Vero, Sabri, Norita, Maxi, Dani, Euge, Mauro, Marcelo y también para los que ya no están, pero compartieron conmigo muchos de estos años: Gaby, Mogas, Juan Cruz, Jesica, Sebas, Olguis. Gracias por la buena onda de todos los días, que hizo que venir a trabajar al Instituto no se vuelva una rutina. Gracias a todos por tantos años de paciencia y compañerismo. Por tantos momentos divertidos, tantos congresos y salidas compartidas!!

* A Marga, Cari, Miriam, Juani, Alvina y todas las chicas del fondo (Moni, Cris, María, Carmen, Irma, Marita), por su buena onda y por estar siempre bien predispuestas a ayudarme en lo que necesitara.

* A Cielo, Juanjo, Mariana, Gustavo y Juan Bautista por el cariño con el que me han recibido en su familia y el interés que demuestran por mis cosas.

* A Lucía, por tantos años de amistad, gracias por tener siempre mil momentos para ayudarme y aconsejarme en todo lo que he necesitado. Por estar… siempre! Sabes cuanto te quiero!!!

* A Gila y a Lau, por nuestros encuentros, cada vez menos frecuentes pero no por eso menos divertidos!

* Me gustaría dar las gracias en especial a mis padres. A ellos les dedico esta Tesis, gracias por todo su apoyo, cariño, ternura y comprensión.

* A mi hermana, por estar siempre y por la hermosura de Sobrina que me dió…Camila con tu sonrisa llenaste de dulzura y amor a nuestra familia, te adoro!

* A Diego, por ser el principal responsable de que este trabajo llegara a buen puerto, estando siempre animándome a continuar, a ponerle pilas. Te doy las gracias por toda la ayuda, el aguante, el compañerismo y, principalmente, por hacerme tan feliz. Por todo eso y mucho más este trabajo también te pertenece.

Gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN……I
ABSTRACT……II
ABREVIATURAS Y SIGLAS……III
INDICE DE FIGURAS……VII
INDICE DE TABLAS……XI

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Fiebre Aftosa…….....1

1.2. Importancia económica.....3

1.3. La FA en la Argentina y en el resto del mundo.....3

1.4. El Virus de la Fiebre Aftosa……5

1.4.1. Diversidad del VFA……..……..5

1.4.2. La partícula viral……..……...6

1.4.3. Estructura del genoma viral y procesamiento proteolítico……....9

1.4.4. Ciclo de replicación viral…….……..……...11

*1.4.4.1. Unión al receptor e internalización celular…….....*12

*1.4.4.2. Traducción y replicación…….....*12

*1.4.4.3. Encapsidación y maduración……...*14

1.4.5. Sitios antigénicos del VFA……..…….....15

1.5. Respuesta inmune contra el virus de la fiebre aftosa……..16

1.5.1. Respuesta inmune humoral…….....16

1.5.2. Respuesta inmune celular…….....18

1.6. Vacunación contra el VFA……19

1.6.1. Vacunas tradicionales……19

1.6.2. Vacunas de uso actual……19

1.6.3. Estrategias para el desarrollo de vacunas alternativas contra el VFA……...21

*1.6.3.1. Vacunas a péptidos sintéticos……...*21

*1.6.3.2. Vacunas a subunidades proteicas……...*22

*1.6.3.3. Vacunas a virus vivo modificado……*22

1.6.3.4. Vacunas con partículas virales vacías (VLPs)……..23

1.6.3.5. Vacunas genéticas contra la fiebre aftosa……..23

1.6.3.6. Inserción de genes de interés en vectores virales……...24

1.7. Prototipos vacunales utilizados en el presente trabajo de tesis.....25

1.7.1. Sistema de expresión derivado del Virus Semliki Forest……...25

1.7.2. Sistema de expresión derivado de Adenovirus……27

1.7.3. Vectores amplicón derivados del Virus Herpes Simplex tipo 1……31

2. OBJETIVOS…… 32

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Virus, células y medios de cultivo ……..33

3.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo……-33

3.3. Técnicas generales de biología molecular……...34

3.4. Amplificación de la región codificante de las proteínas estructurales del VFA y la proteasa 3C……34

3.4.1. Obtención del ARN del Virus de la Fiebre Aftosa cepa O1/Campos……..34

3.4.2. RT-PCR de los segmentos genómicos P1-2A y 3C……..34

3.4.3. Construcción de los plásmidos pG_P12A y pG_3C……..35

3.4.4. Construcción del plásmido pB_P12A3C……..36

3.5. Construcción del plásmido pG_VP1……...37

3.6. Construcción del plásmido pG_GFP……...37

3.7. Secuenciación de los distintos clones obtenidos ……37

3.8. Obtención de vacunas génicas que expresan segmentos genómicos del VFA y GFP……...37

3.8.1. SISTEMA BASADO EN EL VIRUS SEMLIKI FOREST……...37

3.8.1.1. Generación de los vectores pSFV-P12A3C, pSFV-VP1 y pSFV-GFP.....37

3.8.2. SISTEMA BASADO EN EL VECTOR pCI-neo……...39

3.8.2.1. Generación del vector pCI-P12A3C…..……39

3.8.2.2. Virus vaccinia Vtf7-3……..……39

3.8.2.3. Transfecciones de ADN……..……40

3.9. Partículas virales no replicativas que expresan subunidades del VFA Y GFP……..……40

3.9.1. VECTORES BASADOS EN ADENOVIRUS……..……....40

3.9.1.1. Obtención de Ad-P12A3C y Ad-GFP……..40

3.9.1.2. Sub-clonado de los segmentos genómicos del VFA y GFP en el vector de entrada pENTR-4……..…...40

3.9.1.3. Generación de los plásmidos de Ad recombinantes in Vitro……...41

3.9.1.4. Obtención y amplificación de los bancos de adenovirus recombinantes……...42

3.9.1.5. Titulación de los Adenovirus recombinantes……..……...43

3.9.2. VECTORES BASADOS EN EL VIRUS HERPES SIMPLEX-1…….....43

3.9.2.1. Obtención de vectores amplicón HSV-P12A3C……...43

3.9.2.2. Construcción de los plásmidos amplicón de HSV-1 conteniendo las proteínas estructurales, la proteína 2A y la proteasa viral 3C del VFA……..…44

3.9.2.3. Empaquetamiento del plásmido amplicón en un sistema libre de virus colaborador……...45

3.10. Condiciones de transfección celular para los distintos sistemas…….....45

3.11. Generación de reactivos para Inmunofluorescencia y Western Blot……46

3.12. Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)……..……..47

3.13. Detección de proteínas mediante Western blot (WB)……47

3.14. Visualización de proteínas por inmunofluorescencia (IF) y microscopia confocal……..……48

3.15. Purificación de subunidades recombinantes del VFA……....48

3.16. Ensayo de Inmunoprecipitación (IP) ……48

3.17. Microscopia Electrónica……...49

3.18. Inactivación con Bromoetilenimina binaria……49

3.19. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE EN RATONES……50

3.19.1. Animales……50

3.19.2. Obtención de células de bazo……..……...50

3.20. CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL……....51

3.20.1. ELISA para medición de anticuerpos específicos totales anti-VFA O1/Campos……..…..51

3.20.2. Determinación del isotipo (IgG1 o IgG2a) de los anticuerpos anti-VFA…….....52

3.20.3. ELISA de avidez……52

3.20.4. Ensayo de seroneutralización.……..52

3.20.5. Detección de células secretoras de anticuerpos (ASC) específicos del VFA a partir de células de bazo de ratón por ELISPOT……..…..52

3.21. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR……....53

3.21.1. Detección de citoquinas por RT-PCR semicuantitativa……53

3.21.2. Ensayo de linfoproliferación……..53

3.22. ENSAYOS DE DESAFÍO CON VIRUS VIVO……54

3.22.1. Desafío y estudio de viremia……54

3.23. ANÁLISIS ESTADÍSTICO……..54

4. RESULTADOS

CAPITULO I: *"Desarrollo y caracterización de distintos candidatos vacunales que expresan in situ subunidades proteicas del VFA del serotipo O, cepa O1/Campos*……58

Sección A - VACUNAS GÉNICAS QUE EXPRESAN SEGMENTOS GENÓMICOS DEL VFA……..59

4.1. VECTORES DERIVADOS DEL VIRUS SEMLIKI FOREST (SFV)……59

4.1.1. Puesta a punto de las condiciones de transfección y estudio de la expresión de las proteínas heterólogas en el sistema SFV…….....59

4.1.2. Análisis de la replicación de los vectores pSFV-VP1 y pSFV-GFP……..……..62

4.2. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN EL VECTOR pCI……..64

4.2.1. Análisis de la expresión de las proteínas VP1 y VP3 en células eucariotas transfectadas con el pCI-P12A3C……64

Sección B - OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES NO REPLICATIVAS QUE EXPRESAN SUBUNIDADES DEL VFA……..…67

4.3. VECTORES VIRALES DERIVADOS DE ADENOVIRUS (Ad)…….....67

4.3.1. Generación de Adenovirus recombinantes……67

4.3.2. Estudio de la expresión de las proteínas estructurales VP1 y VP3 y de la proteasa 3C del VFA……68

4.4. VECTORES AMPLICON DERIVADOS DE HERPESVIRUS (HSV-1)……69

4.4.1. Generación de los vectores amplicón……69

4.4.2. Estudio de la expresión de las proteínas estructurales VP1 y VP3 y de la proteasa 3C del VFA por WB e IFI.……....69

4.4.3. Análisis de la interacción de las proteínas estructurales *in vivo*……..71

4.4.4. Caracterización de las subunidades del VFA ensambladas en células infectadas con HSV-P12A3C……...72

4.4.5. Perfil antigénico de las subunidades del VFA generadas a partir de células infectadas con el amplicón HSV-P12A3C……...74

CAPITULO II: *"Estudio de la respuesta inmune humoral y celular inducida por las distintas plataformas vacunales en el modelo murino"……*75

Sección C - INMUNIZACIÓN DE RATONES CON VECTORES DERIVADOS DE Ad y AMPLICONES BASADOS EN HSV……..…76

4.5. Determinación de la dosis y vías de inoculación……....76

4.5.1. Determinación de dosis mínima y vía de inoculación para el vector Ad-P12A3C…….....76

4.5.2. Determinación de la vía de inoculación para el vector amplicón HSV-P12A3C…….……..79

4.6. Los anticuerpos anti-VFA generados reconocen a la proteína estructural VP3……....81

4.7. Análisis de la influencia de proteínas asociadas a las partículas virales ……..…82

4.8. Análisis de la expresión de las proteínas estructurales del VFA a través de los vectores amplicón *in vivo*……..…….84

Sección D - ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VFA INDUCIDA POR LOS DISTINTOS VECTORES UTILIZANDO UN REGIMEN DE INMUNIZACIÓN DE TIPO *PRIME-AND-BOOST*……...87

4.9. Análisis de la respuesta inmune humoral……87

4.9.1. Estudio de la inmunidad contra el VFA inducida por la combinación de vectores virales, vacunas a ADN y vacuna convencional……..…...87

4.9.2. Análisis del isotipo de los anticuerpos anti-VFA……..92

4.9.3. Análisis de la avidez de los anticuerpos anti-VFA generados.....93

4.10. Análisis de la respuesta inmune celular……....94

4.10.1. Ensayos de linfoproliferación……..94

4.10.2. Detección del ARNm de citoquinas por RT-PCR semicuantitativa……...95

4.11. Desafío con virus vivo y medición de viremia……97

4.12. Persistencia de los anticuerpos específicos anti-VFA……..100

4.13. Reactivación de la respuesta inmune luego de una nueva exposición al VFAi……101

4.13.1. Medición de anticuerpos totales específicos anti-VFA……102

4.13.2. Detección de células secretoras de anticuerpos específicos anti-VFA……..103

4.12.3. Estudio del isotipo de los anticuerpos anti-VFA……104

4.12.4. Estudio de la avidez de los anticuerpos anti-VFA……106

4.14. Desafío con virus vivo, luego de 4 meses post refuerzo…….....107

5. DISCUSIÓN……..……..108

5.1. Generación de vectores que expresan proteínas estructurales del VFA.....109

5.2. Estrategias de vacunación…….....111

6. CONCLUSIONES……..……..116

7. BIBLIOGRAFÍA……118

RESUMEN

"EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR DISTINTOS INMUNÓGENOS RECOMBINANTES DIRIGIDOS CONTRA EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA"

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de tesis fue, emplear distintos sistemas de expresión para el desarrollo de vacunas recombinantes y de estrategias de vacunación contra el virus de la fiebre aftosa (VFA). Se trabajó con vacunas derivadas de vectores virales no replicativos (Adenovirus y Herpesvirus) y vacunas génicas (pCI). El antígeno utilizado fue la poliproteína P1, cuyos subproductos son las proteínas capsidales virales, junto con la proteína 2A y la proteasa 3C, del serotipo O1/Campos del VFA. Con las vacunas recombinantes disponibles (HSV-P12A3C, Ad-P12A3C y pCI-P12A3C) y una vacuna convencional a virus inactivado (VFAi) en formulación oleosa, se procedió a estudiar la respuesta inmune generada, utilizando estrategias de tipo *prime-and-boost* homólogo y heterólogo en un modelo murino. En general, la vacunación heteróloga con vectores virales fue más efectiva que la homóloga, en inducir una respuesta inmune α-VFA, tanto humoral como celular. Los títulos más altos de anticuerpos (Acs) específicos correspondieron a los animales vacunados con 2 dosis de VFAi, pero los ratones primados con Ad-P12A3C que recibieron una dosis de refuerzo con HSV-P12A3C o VFAi, también indujeron títulos significativamente más altos que los otros grupos analizados. Los regímenes de inmunización con vectores virales generaron respuestas con predominio de Acs de isotipo IgG2a, sugiriendo un sesgo hacia una respuesta de tipo Th1, mientras que en la inoculación con 2 dosis de VFAi se generaron altos niveles de Acs con predominio de isotipo IgG1. Estos resultados fueron confirmados por la evaluación de las citoquinas inducidas (IL-2, IFNγ e IL-4). En los ensayos de desafío no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de protección, entre el esquema de dos dosis de vacuna convencional frente a una dosis de vacuna vectorial con un refuerzo de HSV-P12A3C o VFAi. Por otra parte, la re-exposición de los distintos grupos inmunizados al virus inactivado a los 5 meses, generó un rápido aumento de los anticuerpos específicos α-VFA en todos los grupos, demostrando la presencia de células B de memoria, funcionales *in vivo.* En este mismo tiempo post vacunación, los ratones inmunizados con la combinación Ad-P12A3C/HSV-P12A3C fueron capaces de reducir la viremia post desafío en un 100%. Es decir que esta combinación de inmunógenos resultó efectiva para desencadenar una respuesta inmune protectiva a mediano plazo contra el VFA en ratones adultos.

Palabras clave: Fiebre Aftosa, vacunas recombinantes, vector adenovirus, vector amplicón herpético*, prime-and-boost,* respuesta inmune.

ABSTRACT

"EVALUATION OF THE IMMUNE RESPONSE INDUCED BY DIFFERENT FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS RECOMBINANT IMMUNOGENS"

ABSTRACT

In the present work, different recombinant vaccine candidates and vaccination regimes against foot-and-mouth disease virus (FMDV) were tried. The antigen used was the P1 polyprotein, which includes the viral capsid proteins. Defective vectors derived from heterologous virus (adenovirus and herpesvirus) and a classic genetic DNA vector (pCI) carrying these sequences were constructed. To characterize the immune responses, a well known murine model was used. BALB/c mice were immunized following a prime-and-boost delivery system combining the different vaccine candidates (HSV-P12A3C, Ad-P12A3C, and pCI-P12A3C) and the inactivated adjuvanted virus (FMDVi), mimicking the conventional vaccine. The heterologous prime-and-boost regimes resulted in more effective humoral and cellular immune responses than the homologous viral vector boosting. The highest antibody titers corresponded to the groups vaccinated with 2 doses of inactivated virus, but significant high titers were also obtained when mice primed with Ad-P12A3C were boosted either with HSV-P12A3C or FMDVi.

The predominat presence of antibodies of the IgG2a isotype and increased levels of mRNA of IL-2 e INFγ was detected in the groups immunized with the viral vectors, suggesting a Th1 response, while inoculation with conventional vaccine generated high antibodies titers of the IgG1 isotype. No difference was found in protection from challenge with live O1/Campos virus, between animals vaccinated with inactivated virus or primed Ad-P12A3C and boosted either with HSV-P12A3C or FMDVi. The rapid induction of specific antibodies and antibody secreting cells in animals re-exposed to FMDV 5 months later, suggest that B memory and plasmatic cells were functional in vivo. At the same time point after vaccination, mice vaccinated with the combination Ad-P12A3C/HSV-P12A3C were 100% protected from viral challenge, suggesting that this combination was effective to elicit a protective immune response in the medium term against FMDV in adult mice.

Keywords: FMDV, recombinant vaccines, Adenovirus vectors, herpesvirus amplicons, prime-and-boost regimes, immune response.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

aa: aminoácido

ABTS: 2,2´- azino-bis (3-ethylenbenz-thiazoline-6-sulfonic acid

Ac: Anticuerpo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

Ad: Adenovirus

Amp: Ampicilina

Antisense: primer reverso

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

ASC: células secretoras de anticuerpos

BAC: bácmido

BEA: Bromohidrato de bromoetilamina

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

CAR: receptor Coxsackie/Adenovirus

CEE: Comunidad Económica Europea

cm^2: centímetro cuadrado

Cm: Cloranfenicol

CMV: Citomegalovirus

CO_2: dióxido de carbono

Con-A: Concanavalina A

cpm: cuentas por minuto

CV-1: Células fibroblásticas adherentes obtenidas a partir de riñón de mono verde africano

DAB: ácido diamino benzoico

DICT: Dosis infectivas en Cultivo de Tejidos

DMEM: medio esencial mínimo de Dulbecco

dNTPs :deoxinucleótidos

DO: Densidad óptica

dpi: días post infección

dpr: días post refuerzo

dpv: días post vacunación

dpVFAi: días post re-exposición al VFAi

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

FA: Fiebre aftosa

g: gramo

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFP: proteína verde fluorescente

Gli-36: Línea celular proveniente de glioblastoma humano

G418: Antibiótico Geneticina 418

G-MEM: Medio Esencial Mínimo Glasgow

H_2O_2: Peróxido de hidrógeno

$[H]^3$: timidina tritiada

hs: horas

HEK293A: células embrionarias de riñón humano que expresan constitutivamente el activador transcripcional E1 de Adenovirus

HEPES: ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico

HmLu: células de pulmón de hamster

hpi: horas post infección

hpt: horas post transfección

IA: índice de avidez

HSV-1: Herpes Simplex tipo 1

IBRS2: células de riñón de cerdo

IE: índices de estimulación

IFI: immunofluorescencia indirecta

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

im: intramuscular

ip: intraperitoneal

in: intranasal

IP: Inmunoprecipitación

IPTG: isoppropil-Beta-D-Tiogalactopiranosido

IRES: Sigla en inglés para "sitio interno de unión a los ribosomas"

Kan: kanamicina

Kb: kilo base

kDa: kilo Daltons

l: litro

LB: Luria-Bertani, medio rico nutricional utilizado para el crecimiento de bacterias

Log: Logaritmo en base 10

M: Molar

mAbs: anticuerpos monoclonales

µCi: microcurie

µl: microlitro

µg microgramo

mg: miligramo

ml: mililitro

mM: milimolar

min: minuto

MOI: multiplicidad de infección

MTT: metiltiazoltetrazolio

N: Normal

NIL-2: células de embrión de hámster

ng: nanogramo

nm: nanómetro

nt: nucleótidos

OIE: Organización Internacional de Epizootias

ON: OverNight

p: Plásmido

pA: señal de poliadenilación

PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida

PANAFTOSA: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa

pb: pares de bases

PBS: phosphate buffered saline: solución salina de fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

Pellet: precipitado luego de la centrifugación

pH: Potencial hidrógeno

PM: Peso molecular

pmol: picomoles

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

primers: oligonucleótidos iniciadores

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

SD: Desvío standard

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: Seroneutralización

sc: subcutánea

TA: Temperatura Ambiente

Taq Pol: ADN polimerasa obtenida de Thermophilus aquaticus

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

Vero 2.2: células epiteliales de riñón de mono verde Africano que expresan constitutivamente el activador transcripcional ICP27 de HSV-1

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

WB: Western Blot

%: porcentaje

ÍNDICE DE FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

1. Introducción

Figura 1.1. Representación esquemática de la cápside del VFA……7

Figura 1.2. Esquema general de la cápside de los picornavirus……8

Figura 1.3. Representación esquemática del ensamblado de la partícula viral……9

Figura 1.4. Organización del genoma y procesamiento de la poliproteína……10

Figura 1.5. Representación del ciclo replicativo de los picornavirus……...14

Figura 1.6. Cristalografía de un protómero del VFA y localización de los sitios antigénicos……16

Figura 1.7. Esquema representativo del replicón derivado del virus Semliki Forest…..26

Figura 1.8. Sistema de expresión de adenovirus recombinante……...29

Figura 1.9. Sistema de expresión de amplicones derivados de HSV-1, libre de virus colaborador.....31

3. Materiales y Métodos

Figura 3.1. Amplificación por RT-PCR de los segmentos genómicos P1-2A y 3C del VFA serotipo O1/Campos……35

Figura 3.2. Rastreo de clones positivos de pG_3C y pG_P12A……36

Figura 3.3. Análisis de restricción de posibles clones de pB_P12A3C……36

Figura 3.4. Rastreo de clones positivos de pSFV-P12A3C……38

Figura 3.5. Esquema de los replicones pSFV-P12A3C, pSFV-VP1 y pSFV-GFP…….38

Figura 3.6. Análisis de restricción de posibles clones de pCI-P12A3C……39

Figura 3.7. Esquema del vector pCI-P12A3C……..39

Figura 3.8. Rastreo por PCR de clones positivos de pAd-P12A3C……..41

Figura 3.9. Esquema de los vectores pAd-P12A3C y pAd-GFP……...42

Figura 3.10. Rastreo por PCR de clones positivos de pHSV-P12A3C……44

Figura 3.11. Esquema del plásmido amplicón pHSV-P12A3C……..44

Figura 3.12. Esquema del ELISA en fase sólida……..51

4. Resultados

Capítulo I - Sección A. VACUNAS GÉNICAS QUE EXPRESAN SEGMENTOS GENÓMICOS DEL VFA

Figura 4.1. Expresión de la proteína GFP en células BSR……60

Figura 4.2. Análisis de la expresión de las proteínas del VFA por WB……...61

Figura 4.3. Representación esquemática de la replicación del vector pSFV-1 en células eucariotas……62

Figura 4.4. Detección del ARN anti-genómico de SFV en células transfectadas con pSFV-VP1 o pSFV-GFP……..63

Figura 4.5. Detección de la subunidad nsP1 de la polimerasa viral de SFV por WB…64

Figura 4.6. Expresión de las proteínas VP1 y VP3 en células eucariotas transfectadas con el plásmido pCI-P12A3C……..65

Figura 4.7. Detección de la proteína VP1 en células eucariotas transfectadas con el pCI-P12A3C por IFI……66

Capítulo I - Sección B OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES NO REPLICATIVAS QUE EXPRESAN SUBUNIDADES DEL VFA

Figura 4.8. Efecto citopático en células HEK293A transfectadas con los vectores de adenovirus recombinantes……...67

Figura 4.9. Análisis de la expresión de las proteínas estructurales VP1 y VP3 y de la proteasa 3C del VFA y de GFP por WB……68

Figura 4.10. Expresión de las proteínas VP1, VP3 y 3C del VFA y GFP utilizando vectores amplicón herpéticos……..70

Figura 4.11. Microscopía confocal de células Vero 2.2 infectadas con los vectores amplicón HSV-P12A3C y HSV-GFP……..71

Figura 4.12. Asociación de las proteínas estructurales VP1, VP3 y VP0 del VFA producidas por el vector amplicón pHSV-P12A3C……..72

Figura 4.13. Análisis de las subunidades del VFA obtenidas por gradiente de sacarosa (5-30%) de un lisado de células infectadas con HSV-P12A3C……73

Figura 4.14. Microscopia electrónica de las subunidades del VFA obtenidas a partir de células infectadas con el amplicón HSV-P12A3C……...73

Figura 4.15. Perfil antigénico de las subunidades del VFA obtenidas con el amplicón HSV-P12A3C……74

Capítulo II - Sección C. INMUNIZACIÓN DE RATONES CON VECTORES DERIVADOS DE Ad Y AMPLICONES BASADOS EN HSV

Figura 4.16.A. Determinación de dosis mínima y vías de inoculación para Ad-P12A3C……..77

Figura 4.16.B. Determinación de dosis mínima y vías de inoculación para Ad-P12A3C……..78

Figura 4.16.C. Determinación de dosis mínima y vías de inoculación para Ad-P12A3C……...79

Figura 4.17. Selección de la vía de inoculación para HSV-P12A3C……81

Figura 4.18. Reactividad de los sueros provenientes de los ratones inmunizados con los diferentes candidatos vacunales……..……82

Figura 4.19. Existencia de proteínas pre-formadas asociadas sólo a los amplicones de HSV……...83

Figura 4.20. La respuesta de Acs anti VFA es generada por proteínas sintetizadas de novo……84

Figura 4.21. Inflamación producida por la inoculación con los amplicones HSV-P12A3C……..85

Figura 4.22. Detección de proteínas del VFA en tejido de ratones inoculados con el amplicón HSV-P12A3C……86

Capítulo II - Sección D. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VFA INDUCIDA POR LOS DISTINTOS VECTORES UTILIZANDO UN RÉGIMEN DE INMUNIZACIÓN DE TIPO PRIME-AND-BOOST

Figura 4.23. Acs totales anti-VFA inducidos por los distintos esquemas de prime-and-boost homólogo ……89

Figura 4.24. Acs totales anti-VFA inducidos por los distintos esquemas de prime-and-boost heterólogo...……90

Figura 4.25. Influencia de Acs neutralizantes dirigidos contra el vector Adenovirus…..91

Figura 4.26. Reactividad de los sueros provenientes de los ratones inmunizados…….91

Figura 4.27. Análisis del isotipo de los anticuerpos anti-VFA……92

Figura 4.28.A. Análisis de avidez de los anticuerpos anti-VFA…….93

Figura 4.28.B. Análisis de avidez de los anticuerpos anti-VFA…….94

Figura 4.29. Ensayo de Linfoproliferación…….95

Figura 4.30.A. Detección del ARNm de distintas citoquinas y GAPDH por RT-PCR…96

Figura 4.30.B. Expresión relativa de los ARNm de distintas citoquinas obtenidos por RT-PCR……..……96

Figura 4.31. Porcentaje de protección y medición de viremia post desafío con virus vivo de ratones inmunizados con los Ad recombinantes……98

Figura 4.32. Ensayo de desafío y medición de viremia de ratones inmunizados con vectores amplicón…….99

Figura 4.33. Persistencia de los anticuerpos específicos anti-VFA……101

Figura 4.34. Re-activación de la inmunidad humoral frente a una nueva exposición con virus inactivado……102

Figura 4.35.A. Cuantificación de ASC anti-VFA……103

Figura 4.35.B. Cuantificación de ASC anti-VFA……104

Figura 4.36. Relación IgG1/IgG2a de los Acs generados a los 21 dpr y a los 7 dpVFAi……..105

Figura 4.37. Análisis de la avidez de los anticuerpos anti-VFA a los 118 dpr y luego de la re-exposición con VFAi……..106

Figura 4.38. Medición de viremia post desafío, en ratones inmunizados con Ad-P12A3C/HSV-P12A3C luego de 4 meses post refuerzo……..107

ÍNDICE DE TABLAS

INDICE DE TABLAS

3. Materiales y métodos

Tabla 1. Condiciones de transfección que se utilizaron en los distintos experimentos…. ……45

Tabla 2. Características de los Mabs utilizados en este trabajo.……...49

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.……55

Tabla 4. Descripción de los plásmidos generados en este trabajo……..56

4. Resultados

Tabla 5. Replicones derivados del virus Semliki Forest.……59

Tabla 6. Puesta a punto de las condiciones de transfección de células eucariotas con el vector pSFV-GFP……60

Tabla 7. Determinación de dosis y vías para Ad-P12A3C……76

Tabla 8. Determinación de la vía de inoculación para HSV-P12A3C……..80

Tabla 9. Esquema de inmunización de tipo prime-and-boost homólogo y heterólogo..... ……88

Tabla 10. Anticuerpos neutralizantes inducidos por las distintas plataformas vacunales……....100

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

1.1. La Fiebre Aftosa

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad viral altamente contagiosa e inmunológicamente compleja, con un amplio rango de hospedadores y un estado portador muy perjudicial para su control. Afecta a una amplia gama de animales herbívoros biungulados; tanto domésticos, bovinos, porcinos y caprinos (Pereira, 1981) como salvajes, ya que existen más de setenta especies dentro de las veinte familias de mamíferos que han resultado susceptibles a la infección natural o experimental (Forman et al., 1974).

Esta enfermedad fue descripta por primera vez en Italia en el año 1546 (Frascatorius, 1546) y el agente causal de la misma, llamado Virus de la Fiebre Aftosa (VFA), fue identificado por Loeffler y Frosch en 1897, siendo además el primer virus animal reconocido (Loeffler, 1897).

La principal ruta de infección es el tracto respiratorio. La replicación viral ocurre rápidamente en las células epiteliales de la zona orofaríngea y da lugar a la formación de una vesícula o afta primaria. La viremia se origina al cabo de tres o cuatro días; el virus pasa al torrente sanguíneo y se distribuye por todo el organismo alcanzando epitelios alejados del punto de entrada, provocando la aparición de aftas secundarias. Una de las regiones del cuerpo del animal en que más frecuentemente aparecen aftas secundarias son las extremidades, lo que provoca debilidad y tendencia a la postración (Yilma, 1980).

En los bovinos, los primeros síntomas de la enfermedad aparecen tras un período de incubación de dos a ocho 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, 1986). Las vesículas aumentan de tamaño y se rompen, generando áreas de daño epitelial, que de acuerdo a su ubicación, producen salivación abundante o complicaciones para caminar; en consecuencia, se dificulta la alimentación, el ordeñe y la lactancia (Shahan, 1962). Todo esto redunda en una rápida pérdida de peso del animal y en una acentuada baja en la producción de leche. La enfermedad en los ovinos y caprinos es en general, clínicamente más leve que en los bovinos, con predominancia de lesiones en las patas; pudiendo incluso pasar inadvertida.

Durante la fase aguda de la enfermedad se encuentran altos niveles de virus en todas las secreciones, en los aerosoles respiratorios, en sangre, órganos y tejidos (Burrows, 1968).

El virus se transmite de animales infectados a animales susceptibles por contacto directo a través de la saliva, leche y semen, ó por inhalación, ingestión o penetración de partículas infecciosas en lesiones de la piel (Cottral et al., 1968); (Hyslop, 1965); (Sellers, 1971). La transmisión indirecta puede ocurrir a través de productos animales contaminados (Cottral et al., 1960), restos de animales, equipos agrícolas, personas, ropa, etc.

La afección resulta benigna en la mayoría de los casos. La recuperación lleva, por lo general, entre dos o tres semanas. Sin embargo, en los animales más jóvenes, esta infección viral puede producir miocarditis, y la tasa de mortalidad puede elevarse entonces hasta un 50%. La mortalidad por la FA es inferior al 6% en animales adultos, y los tejidos dañados se regeneran rápidamente. La respuesta inmune humoral que se desarrolla contra el virus permite la disminución de la viremia y la recuperación de la enfermedad.

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. El estado portador puede durar unas semanas o prolongarse durante años. En este tiempo, es posible encontrar virus infectivo o ARN viral en hisopados faríngeos (Sutmoller et al., 1968); (Van Bekkum, 1969). 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).

Los rasgos epidemiológicos más importantes de la FA son: el alto contenido de virus infectivo en tejidos de animales muertos, en exudados de lesiones y secreciones aún antes de la aparición de signos de la enfermedad; la prolongada supervivencia del virus infeccioso fuera del cuerpo del animal y la rápida transmisión de la infección. Estos factores, sumados al corto periodo de incubación de la infección y a la alta variabilidad antigénica del virus que trae como consecuencia la pobre protección de los animales frente a las nuevas variantes virales, favorecen la rápida dispersión de la enfermedad a partir de focos reducidos y el mantenimiento de amplias áreas endémicas.

El control en zonas o países libres de la enfermedad se basa en un relevamiento estricto en la importación de rumiantes o productos, en la vigilancia

epidemiológica en todo el territorio, en especial de las fronteras y en la capacidad de realizar un diagnóstico rápido y certero.

Las medidas de emergencia para controlar un brote incluyen restricciones en el movimiento de hacienda, la vacunación en anillo, y la eventual eliminación de los animales (rifle sanitario).

El control en países con FA endémica se basa en la utilización de vacunas a virus inactivado con adyuvante oleoso. La duración de la inmunidad protectora es de menor duración que la conferida por la infección, por lo que la vacunación de bovinos jóvenes debe realizarse dos veces por año, continuando una vez por año cuando son adultos.

1.2. Importancia económica

Aunque la FA presenta una baja mortalidad y su fase aguda es de escasa duración, es una de las enfermedades del ganado que causa mayores pérdidas económicas. Entre las pérdidas económicas directas, se encuentra la reducción ya mencionada en la productividad de carne, leche y otros derivados. A estos factores se suman los altos costos implicados en la implementación de las medidas de control y programas de erradicación.

Sin embargo, las pérdidas económicas más importantes son ocasionadas por las restricciones impuestas sobre el tráfico de ganado y de productos animales en el ámbito local, como por los países libres de la enfermedad en cuanto al mercado de carnes y subproductos de origen animal provenientes de países que aún no han erradicado la enfermedad (Tami, 1999).

1.3. La FA en la Argentina y en el resto del mundo

La facilidad de diseminación del VFA y su elevada contagiosidad son las principales causas de que la FA se encuentre ampliamente distribuida en el mundo.

La FA es una enfermedad endémica en África y en varias regiones de Asia y Sudamérica. Los países de la Comunidad Económica Europea (CEE), como así también Australia, Nueva Zelanda, Japón, Singapur, Indonesia, Malta; los países escandinavos, América del Norte, América Central y Chile, son reconocidos internacionalmente como países libres de fiebre aftosa sin vacunación, y aplican

estrictas medidas sanitarias ante posibles focos de enfermedad para mantener dicho estado.

En la CEE la erradicación de la FA se logró mediante campañas de vacunación que se suspendieron en el año 1991. En 1993 sin embargo, y a raíz de varios brotes registrados en Italia, se aplicó rifle sanitario a miles de cabezas de ganado. También fueron registrados brotes en Grecia en 1994 y 1996 (Kitching, 1998). Durante los años 2000 y 2001, más de cuatro millones de cabezas de ganado se vieron afectadas por la FA en el Reino Unido. En el año 2002 Japón recuperó su estado de país libre de FA sin vacunación. Mientas que nuevos brotes de FA ocurrieron en la República de Corea y China desde 2002 (Sakamoto and Yoshida, 2002). En 1994, Uruguay fue declarado libre de la enfermedad por la Organización Internacional de Epizootias (OIE).

En Argentina en el año 1990 se estableció la obligatoriedad de la utilización de la vacuna oleosa, el último brote se produjo en 1994 y no se registró la presencia clínica del VFA entre 1994 y 1997, y fue declarada libre de FA con práctica de vacunación por la OIE en Mayo de 1997. A partir de 1999 se suspende la vacunación en nuestro país, a fin de alcanzar la categoría “libre de aftosa sin vacunación”. Sin embargo, se registraron nuevos brotes hacia fines del año 2000 y 2001 y se reinició la vacunación sistemática, utilizando inmunógenos tradicionales, e incorporando a las vacunas las nuevas cepas de campo, entre ellas las cepas A/Argentina/2000 y A/Argentina/2001, con el riesgo de escape viral que implica el uso de vacunas inactivadas.

El territorio ubicado al Sur del Paralelo 42º se mantuvo libre de FA durante la epidemia. Se la delimitó y resguardó con la implementación de una importante barrera sanitaria y una zona de vigilancia, y se solicitó el reconocimiento de la OIE como “Zona libre sin vacunación”, condición que reconoció ese organismo en Mayo del año 2003.

El estatus sanitario se ratifica anualmente, con la actualización de la Vigilancia Epidemiológica que se lleva a cabo a fin de demostrar que se mantiene la condición sanitaria.

Todo esto indica que es preciso seguir trabajando para la erradicación del virus en el ámbito sudamericano. Esto es particularmente importante para la Argentina, que limita con países en los que la enfermedad es endémica. A fin de garantizar la erradicación definitiva del agente infeccioso y eliminar así la posibilidad de focos en la región, es necesario contar con buenos niveles de inmunidad poblacional específica.

Algunos países europeos se oponen a la vacunación sistemática, porque afirman que la introducción de antígenos obtenidos por cultivo celular en los animales, más allá del riesgo de escape de virus sin inactivar, podría ocultar la circulación viral, con lo cual la vacunación masiva traería más gastos que beneficios. Sin embargo, este concepto ha ido cambiando luego de las dramáticas experiencias de aplicación de rifle sanitario a millones de animales, especialmente en Gran Bretaña y Taiwan. Existen actualmente kits diagnostico que permiten diferenciar animales vacunados de infectados con buena especificidad y sensibilidad, aunque aun es necesario avanzar en este tema.

Esto 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 fiebre aftosa, 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.

1.4. El Virus de la Fiebre Aftosa

El VFA pertenece al género Aphtovirus dentro de la familia Picornaviridae (Fenner, 1976). La familia Picornaviridae abarca los ARN-virus más pequeños que se conocen, y comprende familias muy importantes de patógenos humanos y del ganado. Está dividida en cinco géneros: enterovirus, cardiovirus, rhinovirus, hepatovirus y aftovirus (Cooper, 1978).

1.4.1. Diversidad del VFA

El VFA es un virus antigénicamente muy diverso y heterogéneo. Existen 7 serotipos reconocidos a nivel mundial. Los serotipos A, O y C se encuentran distribuidos en Sudamérica, Europa, Asia y África. Los serotipos SAT1, SAT2 y SAT3 se localizan dentro del continente africano, y el serotipo Asia1 se encuentra distribuido en el continente asiático. Debido a las diferencias en las propiedades antigénicas e inmunológicas entre los distintos serotipos, los animales recuperados de la infección causada por un serotipo viral o vacunados contra un serotipo son susceptibles a la infección por un VFA perteneciente a otro serotipo. Más de 65 subtipos virales con diferentes grados de relación serológica (Pereira, 1977) y múltiples variantes antigénicas (Mateu et al., 1988) han sido identificados. A veces, los subtipos virales son capaces de conferir inmunidad contra otros subtipos del mismo serotipo. A su vez,

cada subtipo agrupa a cientos de cepas, cuya designación se realiza indicando el tipo y subtipo al que pertenecen, junto con el lugar, país y año del aislamiento.

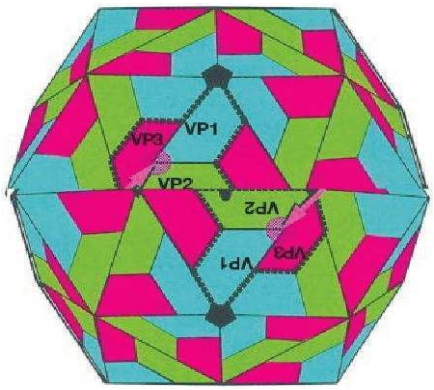
El VFA es también un virus genéticamente variable, de modo que múltiples variantes están presentes en las poblaciones virales normales (Barteling and Woortmeyer, 1987). La variabilidad genética de los virus ARN es el resultado de la generación de genomas mutantes durante la replicación viral. Para la replicación de genomas virales ARN, la tasa de mutación (definida como el número de eventos de incorporación errónea de un nucleótido por ciclo por ronda) está en el rango de 10^{-3} a 10^{-4} (Weissman, 1989). Una tasa de variabilidad genética tan alta se debe en principio, a que las ARN polimerasas carecen de un mecanismo de corrección de la incorporación incorrecta de nucleótidos durante la replicación.

La variación genética en los virus ARN es consecuencia de tres procesos: la generación de mutantes y la competencia que se establece entre las mismas según la eficacia de perdurar en los procesos replicativos, y luego la acción de la selección positiva que hace que una variante neutral se vuelva dominante en respuesta a un cambio ambiental, como ocurre en el caso de las mutantes que escapan a la neutralización por anticuerpos. Estos mecanismos tienen una importante influencia en la diversificación genética de los ARN virus, les confiere alta adaptabilidad y determina que las poblaciones de VFA consistan en una mezcla heterogénea de genomas (cuasiespecies) (Domingo et al., 1980).

1.4.2. La partícula viral

El virión consiste en una partícula ribonucleoproteica cuasi esférica que exhibe simetría icosaédrica 5:3:2 (Figura 1.1). El diámetro seco de la partícula es de 27 a 28 nm (Scraba et al., 1967), y esta compuesta por ácido ribonucleico en un 30% y proteína en un 70% (Burness et al., 1973). La cápside viral carece de envoltura lipídica (Drzeniek and Bilello, 1974) y está constituida por cuatro proteínas estructurales denominadas VP1, VP2, VP3 y VP4, y una molécula de ARN de cadena simple y polaridad positiva. La longitud del ARN viral es de aproximadamente 8450 nucleótidos, con un peso molecular de 2700 kDa y un coeficiente de sedimentación de 35S (Torre, 1980).

Figura 1.1. Representación esquemática de la cápside del VFA

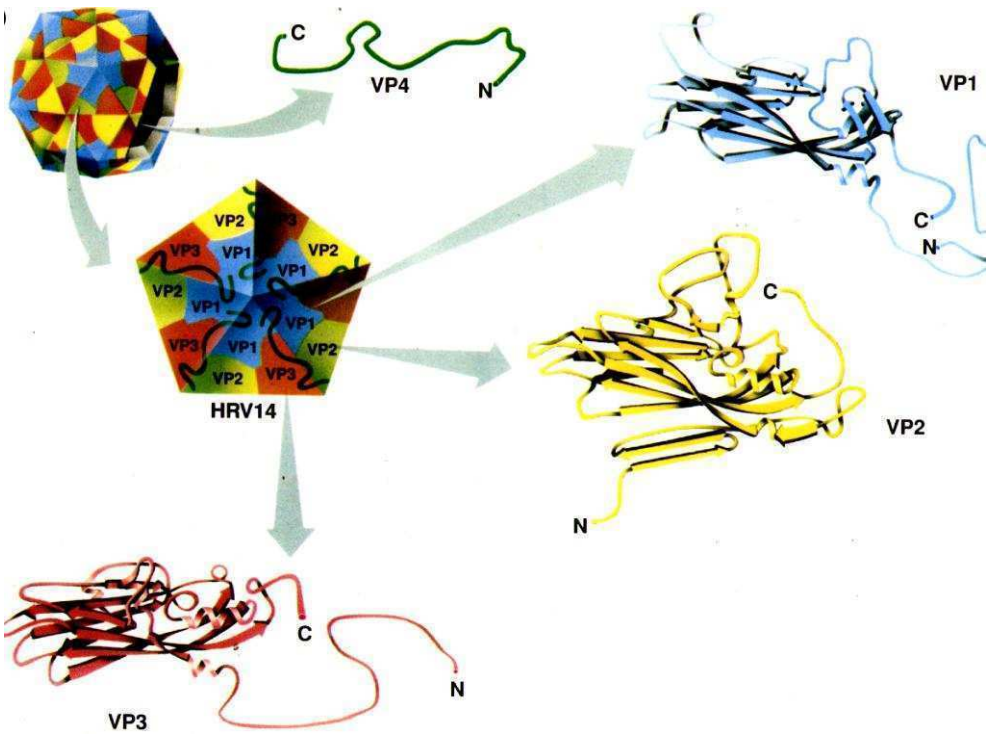


La cápside viral tiene geometría icosaédrica y está formada por las proteínas estructurales: VP1 en color celeste; VP2 en color verde y VP3 en color rosa. VP4 se encuentra hacia el interior de la misma.

La cápside proteica está formada por sesenta copias de los polipéptidos principales denominados VP1, VP2, VP3 y VP4. El peso molecular de VP1, 2 y 3 se encuentra entre 27 y 30 kDa, mientras que el de la proteína VP4 está entre 9 y 10 kDa. Esta última está miristilada y se localiza completamente en el interior de la cápside (Boothroyd et al., 1982); (Curry et al., 1997). Las otras 3 proteínas tienen localización externa. 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 (Figura 1.2) adoptan una configuración espacial muy semejante (Acharya et al., 1989). Cada polipéptido se pliega varias veces sobre sí mismo dando origen a una estructura de barril β, que consiste de ocho cadenas con estructura secundaria de lámina β ubicadas unas sobre otras y conectadas entre sí por loops expuestos al medio externo (Hogle et al., 1985). En las cadenas β, el esqueleto polipeptídico está casi totalmente extendido y se encuentra estabilizado por uniones tipo puentes de hidrógeno que conectan amidas con grupos carboxilo en la secuencia adyacente de las cadenas antiparalelas.

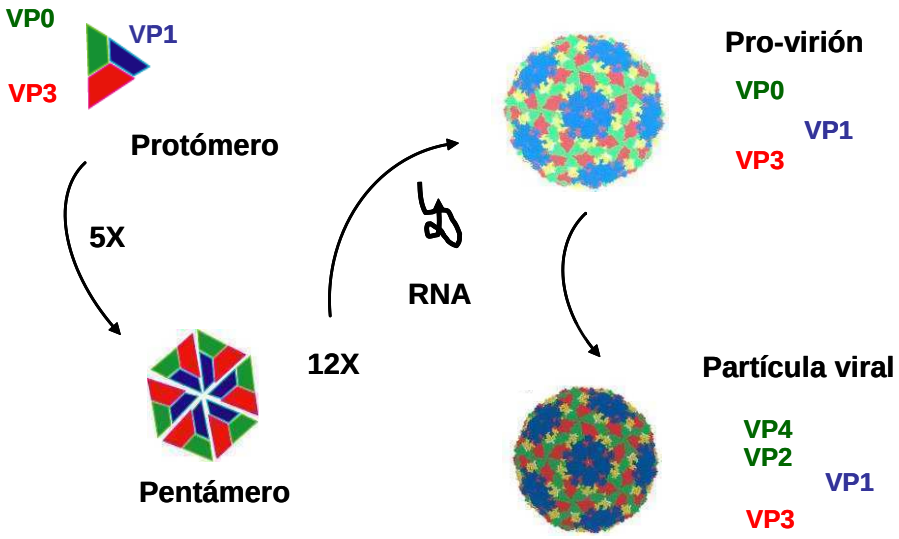
Figura 1.2. Esquema general de la cápside de los picornavirus



Las proteínas capsidales VP1, VP2 y VP3 se encuentran expuestas en la superficie icosaédica de los viriones y son muy similares entre sí. Cada una de estas proteínas presenta una estructura barril β formado por ocho cadenas antiparalelas con un par de α hélices cortas que lo flanquean. La proteína capsidal VP4 se ubica hacia el interior de la cápside y posee una estructura diferente.

Durante el ensamblaje de la partícula viral (Figura 1.3), 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 constituyen 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). Se considera que el clivaje de VP0, originando VP2 y VP4, es autocatalítico y ocurre únicamente luego de la encapsidación del ARN viral, la adquisición de infectividad del pro-virion y los sucesos primarios de la entrada del virus a las células blanco (Moscufo et al., 1993).

Figura 1.3. Representación esquemática del ensamblado de la partícula viral



Una copia de VP1, una de VP0 y una de VP3 se agrupan para formar un protómero. Luego, cinco protómeros se agrupan a su vez, formando un pentámero. Doce pentámeros se asocian con una molécula de ARN para formar la cara externa de la partícula viral. Se considera que el clivaje de VP0, originando a VP2 y VP4, da lugar a la formación de la partícula viral madura.

El virión intacto presenta un peso molecular de 8,4 x 10^6 Da (Strohmaier and Adam, 1976), su coeficiente de sedimentación es de 140S y tiene alta densidad en cloruro de cesio (1,43 – 1,45 g/cm3). Es inestable a pH ácido y a altas temperaturas. El tratamiento de la partícula 140S a pH menor que 7 induce la disociación de la misma en subunidades 12S (Rueckert, 1985) y un precipitado insoluble que contiene a VP4 (Burroughs et al., 1971).

Las partículas 75S se reconocen como cápsides vacías; son productos naturalmente defectivos que contienen moléculas de VP1, VP3 y el precursor VP0, pero no contienen ARN viral.

1.4.3. Estructura del genoma viral y procesamiento proteolítico

El ARN viral (Figura 1.4) posee en su extremo 3´, un tracto poliadenílico (poli A) cuya longitud varia entre 20 y 200 bases, según la cepa (Porter et al., 1978). En el extremo 5´ del ARN viral, se encuentra unida la proteína VPg (virion protein, genome), que juega un rol importante en la iniciación de la síntesis del ARN viral. El VFA posee un tracto policitidílico (poli C) de longitud variable (Rowlands et al., 1978) en el extremo 5´, ubicado entre VPg y el inicio de la región codificante. Se ha visto que el tracto poli C aumenta su longitud a medida que el virus se multiplica en cultivos

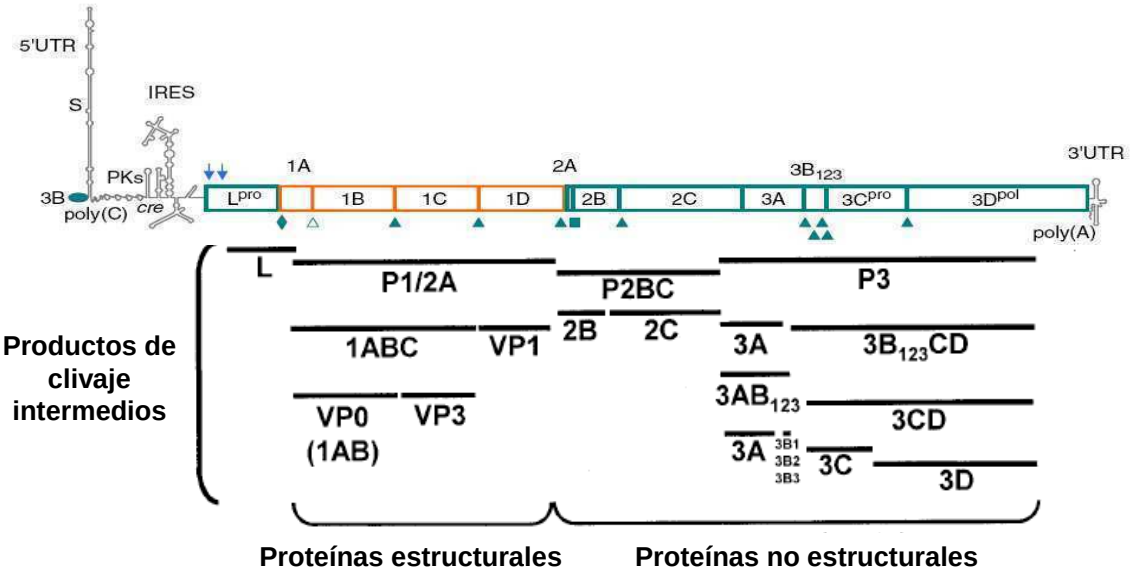
celulares (Escarmis et al., 1998), y el mayor número de bases en ese tracto se corresponde con una mayor capacidad de replicar en cultivo de células. No se ha encontrado ninguna otra ventaja adaptativa relacionada con el largo del poli C.

La región codificante está flanqueada en cada extremo por regiones que no se traducen (UTR), cuyas secuencias se encuentran altamente conservadas y contienen señales para la iniciación de la traducción cerca del extremo 5´ y para la iniciación de la síntesis de ARN en el extremo 3´ de las cadenas (+) y (-), respectivamente (Andino et al., 1990).

La región 5´ UTR del VFA es de aproximadamente 1.200 bases. Esta zona presenta plegamientos en forma de hoja de trébol que unen específicamente proteínas de la célula huésped y juegan un rol clave en el inicio de la síntesis de la poliproteína viral y de nuevas cadenas de ARN. Dado que las células difieren en su espectro de factores de transcripción, estas diferencias pueden jugar un papel importante para determinar el rango de huésped y la virulencia (Svitkin et al., 1988).

La región 3´ UTR es relativamente corta, varía entre 47 y 126 bases entre los diferentes géneros. Se ha visto, que una inserción de 8 bases en esta región genera un fenotipo sensible a la temperatura (Sarnow, 1989).

Figura 1.4. Organización del genoma y procesamiento de la poliproteína



El genoma de VFA se organiza en una región codificante de la poliproteína viral flanqueada por dos regiones no codificantes, 5' UTR y 3' UTR, en el extremo 5' y 3', respectivamente. La región codificante se divide en cuatro regiones denominadas L, P1, P2 y P3. También se muestran los elementos funcionales del genoma y los productos proteicos provenientes de los clivajes intermedios. Los sitios de clivaje primario son indicados.

El ARN contiene un único marco de lectura abierto que codifica para una larga poliproteína que es posteriormente clivada durante la traducción. Estos clivajes son llevados a cabo mayoritariamente por proteasas codificadas por el virus. El genoma del VFA se divide en cuatro regiones codificantes denominadas L, P1, P2 y P3. La región L, ubicada en el extremo 5´, codifica para un polipéptido líder.

La proteína L tiene actividad proteolítica y se autocliva del extremo amino terminal del precursor de las proteínas de la cápside entre una lisina y una glicina. Hacia el extremo 3´ de la región L se halla la región P1, que codifica para las cuatro proteínas estructurales en el orden VP4, VP2, VP3 y VP1. Las regiones P2 y P3 codifican para las proteínas no estructurales del virus que están involucradas en la replicación.

La región P2 contiene a la proteína 2A, que cataliza el clivaje entre 2A y 2B, la proteína 2B, es determinante del rango de huésped, y la proteína 2C, está involucrada en la síntesis de ARN con posible actividad helicasa (Porter, 1993). La secuencia de 2C se encuentra altamente conservada. La región P3 codifica las proteínas 3A, 3B, 3C y 3D. La región 3C codifica para una proteasa responsable de la mayoría de los clivajes de procesamiento primario y secundario de la poliproteína precursora (Porter, 1993). La región 3D codifica para la polimerasa viral, que es una ARN polimerasa ARN dependiente.

La región P1 es inicialmente clivada en tres regiones (1AB, 1C y 1D) que codifican las proteínas VP0, VP3 y VP1, respectivamente (5´- 3´). Finalmente, los polipéptidos VP4 y VP2 son liberados de VP0 por clivaje de maduración durante el proceso de encapsidación del ARN (Curry et al., 1997).

1.4.4. Ciclo de replicación viral

Como otros picornavirus, el VFA tiene un ciclo infectivo corto, de 4 a 6 horas en células en cultivo. Este ciclo es lítico con generación de efecto citopático (ECP), presentando como efecto más destacado la reorganización de membranas subcelulares (Rueckert, 1985); (Knox et al., 2005); (Monaghan et al., 2004).

Por otro lado, se ha descripto el establecimiento de infecciones persistentes en células BHK-21 (de la Torre et al., 1988). El mecanismo por el cual se establece esta infección persistente implica una co-evolución de las células, que se hacen progresivamente más resistentes a la infección por el VFA, y del virus, que incrementa su virulencia sobre las células infectadas (Toja et al., 1999); (Herrera et al., 2008).

1.4.4.1. Unión al receptor e internalización celular

El VFA se une a receptores específicos en la superficie de algunas células, lo que media su internalización (Figura 1.5). Experimentos iniciales mostraron que el tratamiento del virión con tripsina provocaba una única ruptura del residuo R144 de la proteína VP1, lo que suponía la perdida de la capacidad de unirse a células susceptibles (Robertson et al., 1983). El primer receptor celular identificado para el VFA fue la integrina $\alpha v\beta 3$, observándose que el virus era capaz de infectar células no permisivas que expresaban transitoriamente esta molécula (Neff et al., 1998). Desde entonces se han identificado otras integrinas que también actúan como receptores, como son $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 6$ y $\alpha v\beta 8$ (Jackson et al., 2000); (Jackson et al., 2002); (Jackson et al., 2004).

Tras su unión a integrinas, el virión es introducido en la célula mediante un mecanismo dependiente de clatrina (Berryman et al., 2005); (O'Donnell et al., 2005); (Martin-Acebes et al., 2007). Posteriormente, el virus internalizado se localiza en un compartimento endosomal ácido, donde se produce el desensamblado de la cápside y se libera al citoplasma su ARN unido covalentemente a la proteína 3B (Curry et al., 1995); (Ellard et al., 1999); (van Vlijmen et al., 1998).

1.4.4.2. Traducción y replicación

Después de la desencapsidación, el ARN de los picornavirus es liberado al citoplasma por un mecanismo no bien establecido. Se postula que una vez en el citoplasma se produciría la separación de la proteína 3B del extremo 5´ del ARN, como paso previo al inicio de la traducción (Ambros and Baltimore, 1978), si bien algunos autores han descripto que el complejo de iniciación de la traducción puede establecerse con la proteína 3B unida al ARN (Golini et al., 1980). El primer paso de la replicación del VFA consiste en la traducción del ARN liberado. Este paso es imprescindible para la síntesis de las proteínas virales que permitirán la replicación del ARN y de todas las modificaciones celulares asociadas a este proceso. Es tras esta primera ronda de traducción cuando se produce la traducción secundaria masiva de proteínas virales, que tiene lugar empleando como molde las nuevas cadenas de ARNm sintetizadas.

A diferencia de los ARN mensajeros celulares, el ARN de los picornavirus carece de estructura CAP (7-metil-G) en su extremo 5´. Sin embargo, los ribosomas celulares se unen a una estructura llamada IRES (sitio interno de unión al ribosoma)

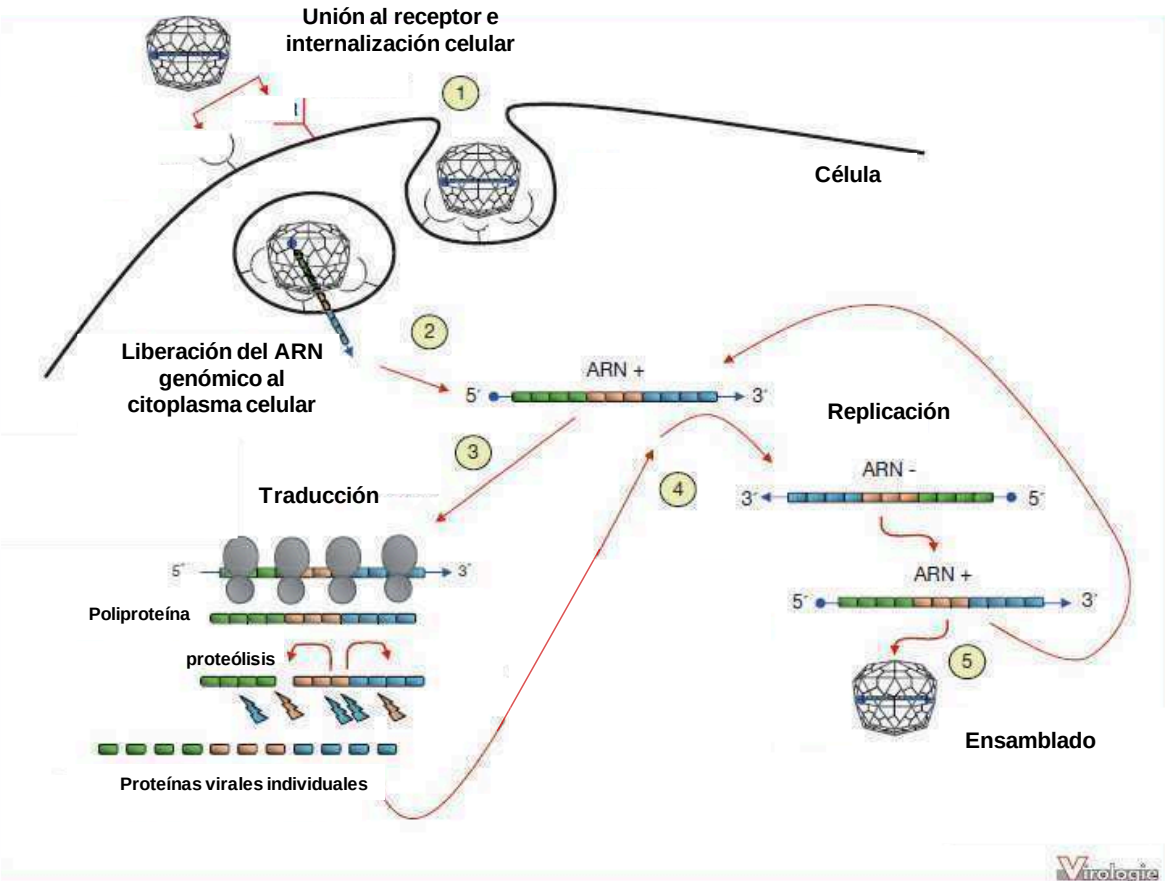
para iniciar la traducción del ARN viral, de manera independiente de CAP (Belsham, 1992); (Martinez-Salas et al., 2002). Este hecho proporciona un mecanismo de traducción alternativo al celular, el cual se inhibe rápidamente por el clivaje de factores de iniciación de la traducción dependiente de CAP por parte de proteasas virales (Devaney et al., 1988).

Las proteasas virales clivan además otras proteínas de la célula infectada que participan en procesos necesarios para la viabilidad celular, como factores de transcripción, histonas (H3), proteínas implicadas en el tráfico de membranas (β-COP y membrina) y reguladores del ciclo celular (ciclina A y ciclina B2), entre otros (Ryan and Drew, 1994). Como se ha comentado anteriormente, el ARN del VFA se traduce a una poliproteína de 2330 aminoácidos que se procesa co-traduccionalmente por la acción en cis y en trans de las proteasas virales para dar lugar a diferentes productos intermedios y a las proteínas virales maduras.

La información relativa al mecanismo de replicación del ARN del VFA es escasa. Se postula que para que comience la síntesis de ARN (-) es necesario que cese previamente la traducción inicial de la molécula de ARN (+) (Gamarnik and Andino, 1998). Se ha descripto que la proteína 3CD, acumulada durante las primeras rondas de traducción del ARN infectante, es capaz de unirse a la región no codificante del extremo 5´ del ARN, incrementando la afinidad del IRES por PCBP, una proteína celular esencial en el comienzo de la replicación (Gamarnik and Andino, 1998).

La mayoría de las proteínas no estructurales y sus precursores, junto con el ARN, se localizan asociados a estructuras membranosas celulares, formando el denominado “complejo de replicación” (Parsley et al., 1997); (Xiang et al., 1995); (Harris et al., 1994); (Banerjee et al., 2001); (Echeverri and Dasgupta, 1995); (Paul et al., 1994); (Giachetti et al., 1992). La función de este complejo de replicación sería la de localizar en la misma estructura celular a todos los componentes necesarios para la replicación del ARN viral, incrementando, de esa manera, la concentración local de proteínas no estructurales virales (Bienz et al., 1992). La proteína 3B de los picornavirus se encuentra unida covalentemente a todas las moléculas de ARN viral (Ambros et al., 1978), siendo esencial para la replicación viral su función como cebador en la síntesis de unas pocas moléculas de ARN (-) a partir del ARN genómico catalizado por 3D (Paul et al., 2003). Estas cadenas de ARN (-) serían, a su vez, molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARN (+), que llevarían también unidas covalentemente en su extremo 3´ a la proteína 3B.

Figura 1.5. Representación del ciclo replicativo de los picornavirus



1) Unión del virus a la célula blanco e internalización. 2) Liberación del ARN genómico al citoplasma de la célula. 3) Traducción de la poliproteína y procesamiento a proteínas virales individuales. 4) Replicación del genoma viral. 5) Encapsidación.

1.4.4.3. Encapsidación y maduración

Los pasos finales del ciclo viral son la encapsidación de moléculas de ARN genómico y la maduración del precursor VP0 a VP4 y VP2. Se ha descripto que únicamente las moléculas de ARN (+) unidas a la proteína 3B, y no las de ARN (-), son encapsidadas (Nomoto et al., 1977); (Novak and Kirkegaard, 1991). Hay varios modelos que explican el ensamblado de los nuevos viriones. Uno de ellos propone que las proteínas estructurales en forma de pentámeros se agruparían formando cápsides vacías dónde luego entraría el ARN; según el otro, los pentámeros se unirían al ARN para formar el pro-virión (Grubman and Baxt, 2004). Ambos modelos proponen la necesidad de la maduración de VP0 mediante una ruptura catalítica entre VP4 y VP2, una vez ensamblada la cápside (Arnold et al., 1987); (Knipe et al., 1997). Este paso es

esencial para la formación de virus infectivo, ya que los virus que no sufren ese proceso de maduración presentan un impedimento para liberar el ARN al citoplasma de las células infectadas (Knipe et al., 1997).

1.4.5. 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 colaboradores en 1967 (Wild and Brown, 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. Por este motivo se asumió que los epitopes inmunodominantes se encontraban en la secuencia de esta proteína capsidal. Posteriormente, y mediante hidrólisis de VP1 (serotipo O) con bromuro de cianógeno o enzimas proteolíticas, Stromahier y col. (Strohmaier et al., 1982) señalaron que las regiones correspondientes a los residuos 146-154 y 200-213 serían las inductoras de anticuerpos neutralizantes. Otro grupo (Bittle et al., 1982) 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 anticuerpos neutralizantes. 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 aftovirus, 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 epitopes más relevantes para la inducción de anticuerpos 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) (Figura 1.6).

Figura 1.6. Cristalografía de un protómero del VFA y localización de los sitios antigénicos

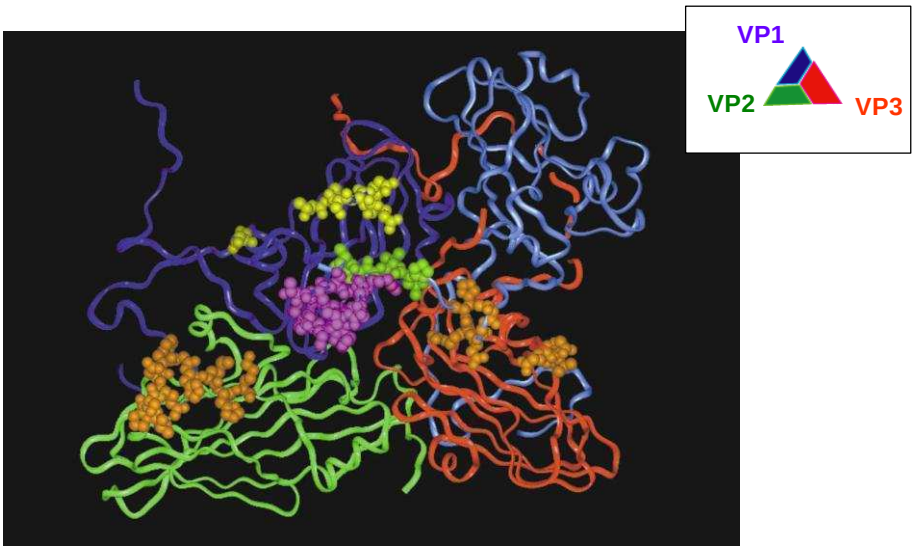


Diagrama de los proteínas de la cápside: VP1 (violeta), VP2 (verde) y VP3 (naranja) cuya localización es mostrada esquemáticamente arriba a la derecha. VP1 de un protómero vecino es también mostrado (en azul). Las esferas representan a los residuos de los sitios antigénicos más relevantes.

1.5. Respuesta inmune contra el virus de la fiebre aftosa

Los animales infectados con el VFA desarrollan un estatus inmunológico, caracterizado por altos niveles séricos de anticuerpos específicos con actividad neutralizante, los cuáles persisten hasta 18 meses post infección (Wigdorovitz and Sadir, 1996). La protección frente a la infección por el VFA ha sido siempre relacionada con la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos en suero (Pay and Hingley, 1992); (Hingley and Pay, 1987); (Van Maanen and Terpstra, 1989). Sin embargo, es posible encontrar animales protegidos con niveles sub-neutralizantes de anticuerpos (Liebermann et al., 1993) lo que sugiere que la protección estaría mediada, además, por otros componentes de la inmunidad.

La duración de la protección, los títulos de anticuerpos neutralizantes, y la afinidad promedio de la respuesta inducida por una vacuna, es siempre más baja a la inducida por la infección natural.

1.5.1. Respuesta inmune humoral

Cuando un bovino es infectado experimentalmente mediante la inoculación intra-dermo lingüal con el VFA, se comienzan a detectar anticuerpos neutralizantes

específicos contra proteínas estructurales del virus a las 60 hs, los que continúan ascendiendo hacia las 96 a 144 horas, con picos entre los 10 y 18 días post inoculación (Dellers and Hyde, 1964); (Burrows, 1968). La presencia de anticuerpos contra proteínas no estructurales como la ARN polimerasa (3D) y la proteasa (3C), llamados genéricamente “antígenos asociados a la infección viral “VIAA”; se ha utilizado como evidencia de infección en muchas especies (Cowan and Graves, 1966); (Schudel et al., 1982). La duración de estos anticuerpos en animales infectados, es menor que los niveles de anticuerpos contra proteínas estructurales. No se ha establecido en detalle si existe un perfil diferencial de anticuerpos contra proteínas no estructurales y el estadío de infección (agudo, convalesciente, estado portador o infectado no portador).

Se ha comprobado que la inducción de una respuesta humoral con altos niveles séricos de anticuerpos específicos contra proteínas capsidales virales, garantiza una inmunidad adecuada y protección contra este virus (Hingley and Pay, 1987); (Collen, 1994); (Periolo et al., 1993); (Robiolo et al., 1995).

Existe correlación entre los niveles de anticuerpos específicos medidos in vitro y la protección in vivo (Van Bekkum, 1969); (Van Maanen and Terpstra, 1989). En nuestro laboratorio se ha desarrollado una técnica de ELISA en fase líquida (ELISA-FL) que ha sido eficientemente utilizada por las autoridades sanitarias de nuestro país, en reemplazo de la prueba de descarga de virus infectivo en bovinos (Periolo et al., 1993).

La medición del nivel de anticuerpos específicos totales por ELISA-FL o seroneutralización, permiten cuantificar la interacción antígeno (virus) y anticuerpo in vitro. Se ha descripto que en la respuesta in vivo, el grado de opsonización de partículas virales, aún con niveles sub-óptimos de neutralización, jugaría un papel clave en la eliminación de los complejos antígeno-anticuerpo por el sistema retículoendotelial y por ende, en la protección del bovino (Mc Cullough, 1986); (Mc Cullough, 1988). El isotipo de los anticuerpos inducidos influenciaría, entonces, el grado de protección alcanzada.

La infección con VFA produce un incremento de IgM específica entre los cuatro y cinco días posteriores a la infección, la cual decrece hasta los niveles basales pasados los 30 días. El cambio de isotipos (“switch de isotipos”) tiene lugar una semana después de la infección y se detecta principalmente un incremento en los niveles séricos de IgG específica. Es posible encontrar altos niveles de IgG1 anti-aftosa en la leche, incluso después de seis meses de recuperados de la infección (Armstrong, 1997).

En bovinos, los mecanismos humorales de protección contra la fiebre aftosa son poco conocidos. Mulcahy y colaboradores, han sugerido que la capacidad protectiva de las vacunas anti-aftosa (formuladas con virus inactivado) en el ganado, estaría relacionada con su habilidad de generar altos niveles de IgG1 anti-VFA (Mulcahy et al., 1990).

La información acerca de la diversidad de subclases de IgG bovina es incompleta (Butler, 1998). Se ha demostrado que la IgG1 es más eficiente que la IgG2 para fijar complemento in vitro, como así también de interactuar con alta afinidad con los receptores Fc de los fagocitos (Mc Guire, 1979); (Goff et al., 1984), por lo que sería capaz de promover la opsonización y la fagocitosis de los complejos antígeno-anticuerpo que, como fue antedicho, median los mecanismos protectivos más allá de la neutralización (Mc Guire, 1979).

1.5.2. Respuesta inmune celular

No se conoce con exactitud el papel que juega la respuesta celular en la protección frente al virus de la FA. La duración de la protección, los títulos de anticuerpos neutralizantes, y la afinidad promedio de la respuesta inducida por una vacuna, es siempre más baja a la inducida por la infección natural. Esto, sumado a que la presencia de anticuerpos neutralizantes no es en muchos casos suficiente para asegurar protección (Brown and Graves, 1959), señala la importancia que la inmunidad celular podría tener en el control de la enfermedad (Becker, 1994).

Los estudios del rol de las células T colaboradoras revelaron que la respuesta inmune frente al virus de la fiebre aftosa es T dependiente (Collen and Doel, 1990) y heterotípica, ya que los linfocitos T extraídos de animales infectados o vacunados con VFA pueden proliferar en respuesta a otras cepas virales (Collen et al., 1998).

Se han mapeado epitopes T funcionales a lo largo de la secuencia de las cuatro proteínas capsidales (Filgueiras, 2000).

La respuesta específica mediada por linfocitos T-citotóxicos es mayor en animales infectados que en vacunados (Garcia-Valcarcel et al., 1996). Childestone y col. (Childerstone et al., 1999) han observado actividad T-CD8+ anti-VFA recién a las 5 semanas post infección. Este grupo ha propuesto que los linfocitos T-CD8+ participan en el estadío tardío de la infección. Dado que VFA es un virus citopático, sería poco probable que una respuesta de tipo T-CD8+ estuviese presente durante el ciclo agudo de la enfermedad. En esta etapa la respuesta protectiva sería mediada por

anticuerpos, con un rol preponderante de la actividad neutralizante. Sin embargo, en la etapa tardía, la presencia de linfocitos T-CD8 podría tener un rol más importante.

1.6. Vacunación contra el VFA

1.6.1. 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, esta fue reemplazada por una vacuna basada en la producción in vitro del antígeno viral a gran escala sobre cultivos primarios de epitelio lingual bovino crecidos en suspensión (Frenkel, 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 a 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 riñon bovino o porcino que fueron reemplazados más tarde por cultivos de células de riñón de hámster, BHK-21 clon 13 (Baby Hamster Kidney Cells), 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 IBRS2 (células de riñón de cerdo), HmLu (células de pulmón de hamster) y NIL-2 (células de embrión de hamster).

1.6.2. Vacuna de uso actual

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) ó 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, 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 vacunales, favorece la degradación de las partículas y la aglomeración. Incluso un aumento en la temperatura por 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 eran 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 anti-aftosa 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, 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 protectiva.
- 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, 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.

1.6.3. Estrategias para el desarrollo de vacunas alternativas contra el VFA

1.6.3.1. Vacunas a péptidos sintéticos

Se han utilizado péptidos sintéticos con secuencias virales aminoacídicas altamente inmunogénicas, que al ser inoculadas fueron capaces de producir anticuerpos que reconocieron la partícula viral entera, desarrollando una respuesta protectiva (Anderer and Schlumberger, 1965); (Francis, 1990); (Zamorano et al., 1994).

La proteína capsidal VP1 de VFA constituye el blanco principal de la respuesta humoral. Varios grupos han ensayado péptidos sintéticos de VP1, solos (Bittle et al., 1982) o asociados a carriers, como la proteína KLH (Shieh et al., 2001). El más utilizado ha sido el llamado sitio antigénico A (ASA), blanco de la respuesta neutralizante (Pfaff et al., 1988). Se demostró que la inoculación de un péptido sintético de la región 140-160 de VP1 no acoplado a carrier, inducía una respuesta humoral específica en cobayos (Francis et al., 1987); (Francis et al., 1988), (Francis, 1990) y en bovinos (Mulcahy et al., 1990). Sin embargo, Meloen y col (Meloen, 1978) demostraron que solamente un 20% de los anticuerpos inducidos al inyectar cobayos con péptidos sintéticos (aa 133-160), reconocían al virus entero. Por otro lado, Van Lierop y col. (van Lierop et al., 1995) verificaron que péptidos correspondientes al loop G-H por sí solos no logran primar a células T contra VFA. Los bajos niveles de protección obtenidos en los bovinos, con la inoculación de péptidos sintéticos del loop G-H (epitopes conformacionales), han llevado a hipotetizar que éstas secuencias por sí mismas, no son capaces de mimetizar la conformación nativa de estos epitopes

estructuralmente flexibles, y a su vez dependiente de la presencia y conformación de las otras VPs (principalmente VP2) (Kim et al., 1990).

En efecto, se ha visto que se mejora el nivel de protección alcanzado por péptidos de VP1 asociándolos a epitopes T-colaboradores (Th) promiscuos (Wang et al., 2002) o bien diseñando péptidos de modo tal que se logre la correcta exposición de sitios antigénicos discontinuos (Villen et al., 2002).

1.6.3.2. Vacunas a subunidades proteicas

Esta estrategia consiste en la inoculación de proteínas inmunogénicas producidas por técnicas de 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, su principal proteína capsidal inmunogénica (Strohmaier et al., 1982), producida en grandes cantidades en un sistema heterólogo de expresión. La capacidad protectora específica de VP1, sintetizada en un sistema bacteriano (Abelson, 1982) resultó, sin embargo, muy inferior a su equivalente en la partícula viral madura y puso en evidencia la falta de conocimientos acerca de la estructura de los epitopes virales neutralizantes. Broekhuijsen y col. (Broekhuijsen et al., 1986) 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 secuencia de la β-galactosidasa de E.coli. En este caso, la presencia de dos o cuatro copias en tándem, indujo una respuesta protectiva en cobayos. La inmunogenicidad mejoró al fusionar un epitope de VP1 a la proteína del core de la hepatitis B (Clarke et al., 1987). Sin embargo, en un estudio realizado por Huang y col. (Huang, 2000), se inocularon bovinos con una proteína recombinante de fusión, conteniendo el gen de la β-galactosidasa y repeticiones en tándem el epitope principal de VFA (ASA o equivalente), obteniéndose solamente protección parcial.

1.6.3.3. Vacunas a virus vivo modificado

Las vacunas a virus modificado o vacunas atenuadas, consisten en la utilización de virus, de baja capacidad infectiva, pero capaces de mantener su inmunogenicidad. En un principio, la atenuación se llevó a cabo seleccionando sub-

poblaciones adaptadas a replicar en huéspedes no susceptibles, como ratones adultos u otros animales de laboratorio (Mowat et al., 1962); (Mowat et al., 1969). Dado el amplio rango de huésped del VFA, estas cepas resultaron en algunos casos, infectivas para distintos huéspedes como los cerdos u otros animales biungulados que nunca antes habían sufrido la enfermedad; o bien revertían su virulencia cuando eran probadas a campo, por lo que paulatinamente se dejaron de utilizar.

1.6.3.4. Vacunas con partículas virales vacías (VLPs)

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 (Rowlands et al., 1975) y han demostrado ser capaces de inducir anticuerpos neutralizantes (Rowlands et al., 1975); (Rweyemamu et al., 1979).

Para la producción de partículas vacías recombinantes se han utilizado diferentes sistemas de expresión tanto virales (baculovirus, y vaccinia); como bacterianos Escherichia coli. La expresión de un ADNc conteniendo las secuencias de los precursores P1-2A y las proteasas L y 3C en baculovirus resultó en una baja eficiencia de ensamblado (Roosien et al., 1990). Utilizando el sistema de expresión del virus vaccinia se logró el autoensamblaje de las proteínas expresadas a partir del precursor P1-3C para formar cápsides vacías que poseían una estructura antigénica similar a la de los viriones de VFA (Abrams et al., 1995) .También se ensamblaron correctamente partículas 75S expresadas en Escherichia coli. Con estas partículas se indujo una respuesta neutralizante inmunizando cobayos (Lewis et al., 1991) y cerdos, obteniéndose solo en estos últimos, protección parcial (Grubman et al., 1993).

1.6.3.5. Vacunas genéticas contra la fiebre aftosa

La inmunización mediada por ADN, conocida coloquialmente como vacunas a ADN o vacunas genéticas, representa un cambio radical en el modo en que los antígenos son dispensados. Involucran la introducción directa de ADN plasmídico codificante para un antígeno proteico, que es luego expresado dentro de las células del organismo (Wang et al., 1993). Esto lleva a una respuesta inmune sorprendentemente efectiva (Fynan et al., 1993); (Davis et al., 1996), que implica tanto la parte humoral como la celular contra diversos agentes patógenos.

Hay numerosos trabajos publicados acerca de la utilización de las vacunas a ADN para prevenir infecciones (Cuisinier et al., 1997); (Kaneko et al., 2000). Estas poseen una serie de ventajas evidentes. Resultan más fáciles de producir que un patógeno inactivado o proteínas recombinantes, son más estables y evitaría además, al igual que en las vacunas a subunidades, el manipuleo de virus infectivo. Diferentes plásmidos que codifican para distintos antígenos serían preparados de la misma forma, o bien dentro del mismo plásmido, viéndose facilitada la posibilidad de desarrollar y formular vacunas multivalentes. La respuesta inmune inducida por la vacunación con ADN puede incrementarse utilizando adyuvantes moleculares que modulan la magnitud y la dirección (humoral o celular) de la respuesta (Lewis and Babiuk, 1999); (Ramsay et al., 1999); (Kim et al., 2000). Varias estrategias se han seguido a fin de mejorar la capacidad protectiva de las vacunas a ADN (Weeratna et al., 2000). Por un lado se ha buscado acrecentar los niveles de expresión, trabajando con promotores fuertes y constitutivos e introduciendo secuencias intrónicas que facilitan, en algunos casos, una expresión más eficiente en determinados tipos celulares (Petitclerc et al., 1995). Se ha propuesto utilizar a este tipo de inmunógenos en combinación con patógenos atenuados, en un esquema combinado de vacunación recibe el nombre en inglés de prime-and-boost (Gherardi et al., 2001); (Pancholi et al., 2001).

1.6.3.6 Inserción de genes de interés en vectores virales

Los avances realizados en el conocimiento de la biología de diferentes virus, otorgó la posibilidad de emplearlos para generar vacunas recombinantes basadas en partículas virales capaces de expresar genes heterólogos. Actualmente los vectores virales replicativos y no replicativos, representan los sistemas de delivery de antígenos más atractivos para la vacunación profiláctica y terapéutica. Esto se debe principalmente a que poseen una buena eficiencia de transducción celular in vivo, y son estables genéticamente. El grupo de Zheng y col. (Zheng et al., 2006) empleó el vector derivado del virus fowlpox expresando los genes de la cápside viral del VFA (P1) y la proteasa 3C y evaluaron su capacidad para inducir una respuesta humoral y celular en ratones y cerdos. Todos los animales vacunados con el virus fowlpox recombinante desarrollaron anticuerpos neutralizantes así como también actividad citotóxica de linfocitos T y fueron parcialmente protegidos. Otros grupos trabajaron con virus vaccinia recombinante que expresaban P1 o VP1 del VFA. Estas vacunas estimularon tanto la respuesta humoral como la celular contra VFA (Sanz-Parra et al., 1999). Por otro lado el grupo de Zhang y col. (Zhang et al., 2010) utilizó el virus de la

pseudorabia recombinante expresando P1, 2A y 3C del VFA y evaluaron la eficacia protectiva en cerdos. A pesar de inducir altos títulos de anticuerpos neutralizantes obtuvieron una protección del 60%. También se emplearon exitosamente un Adenovirus (Ad) humano no replicativo que indujo, en las células infectadas, la producción de cápsides virales vacías del VFA (Mayr et al., 1999). Los autores observaron que bovinos y cerdos inoculados con esta vacuna son protegidos contra el desafío directo con el VFA (7 dpv), y presentaban niveles elevados de anticuerpos neutralizantes contra el patógeno (Pacheco et al., 2005). Más aún, la administración de un Ad recombinante que expresa el interferón alfa porcino fue capaz de proteger a estos animales contra el desafío a las 24 horas de ser administrado, y por un periodo de 5 días (Chinsangaram et al., 2003). Estos resultados indican que la combinación de vacunas derivadas de vectores virales junto con terapia antiviral podría servir para frenar la diseminación del virus en ocasión de brotes, y por lo tanto podría utilizarse como alternativa, o al menos como complemento, al rifle sanitario en los países donde no se practica la vacunación sistemática.

Por otro lado, la estrategia de prime-and-boost emergió como una herramienta poderosa para establecer inmunidad celular por medio de la generación de niveles elevados de células T de memoria (Ramshaw and Ramsay, 2000). Resultados recientes mostraron la eficacia de esta estrategia en modelos animales. La misma involucra presentar al sistema inmune (priming) el antígeno blanco en un vector y luego hacer una reactivación de esta inmunidad (boosting) readministrando el mismo antígeno pero presentado en el contexto de un vector distinto. Esta metodología ha resultado ser excelente para obtener respuestas intensas y de largo plazo (Woodland, 2004).

Por lo tanto, el uso de vectores virales no replicativos junto con estrategias de prime-and-boost, convierten a los inmunógenos recombinantes de nueva generación en una poderosa alternativa en la lucha contra enfermedades virales en el área veterinaria y humana.

1.7. Prototipos vacunales utilizados en el presente trabajo de tesis

1.7.1. Sistema de expresión derivado del Virus Semliki Forest

Los alfavirus han emergido como una herramienta útil en la producción rápida y eficiente de proteínas heterólogas. El género Alfavirus pertenece a la familia Togaviridae, estos virus se replican tanto en células de vertebrados como de

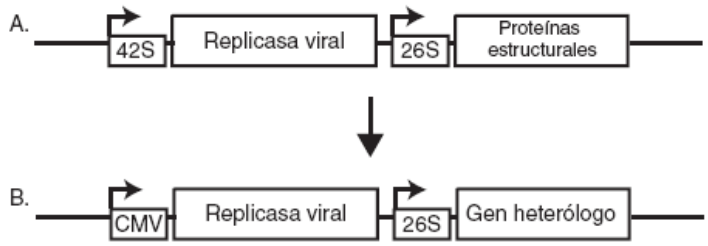
invertebrados. El virus Sindbis y el Semliki Forest Virus (SFV) son ampliamente conocidos como modelos de estudios a nivel de biología molecular y celular. Ambos han sido considerados como excelentes sistemas de expresión debido a que sus genomas se autoamplifican (se replica y transcribe sin la ayuda de proteínas celulares) y sólo requieren de la maquinaria traduccional del hospedero para replicarse (Schlesinger and Dubensky, 1999).

Su genoma consta de ARN de cadena simple con polaridad positiva (ARN+) de aproximadamente 11,5 kb, dividido en dos marcos de lectura, uno de los cuales codifica por 4 proteínas no estructurales (nsP1-4) y el otro por 5 proteínas estructurales del virus (Cápside, p62, [E3,E2], 6K, E1).

Los sistemas basados en SFV soportan distintos tipos de diseños para ser usados como vacunas, tales como producción de partículas defectivas (VLPs) o su utilización para la inmunización genética, ya sea bajo la forma de ARN o ADN (replicones).

Los replicones basados en SFV fueron creados reemplazando los genes de las proteínas estructurales por genes foráneos bajo control del promotor de citomegalovirus (pCMV) (Figura 1.7). De esta forma estos vectores híbridos son capaces de replicar por si mismos pero no de empaquetarse (Souza et al., 2005); (Liljestrom and Garoff, 1991).

Figura 1.7. Esquema representativo del replicón derivado del virus Semliki Forest



(A) Los replicones basados en el SFV derivan de un clon infeccioso de ADNc obtenido a partir del genoma de este virus. 42S: Promotor genómico; y 26S: Promotor sub-genómico.
(B). El reemplazo de los genes estructurales con una secuencia de multiclonado posibilita la inserción de secuencia heterólogas, y su posterior expresión. La transcripción in vivo está mediada por el promotor CMV.

La replicación del genoma híbrido ocurre exclusivamente en el citoplasma de la célula huésped, y aunque la expresión es transiente, se producen cantidades altas de proteínas virales propias y heterólogas. Se ha reportado que esta estrategia conduciría a mejores niveles de expresión del inmunógeno que los logrados por la

estrategia clásica con plásmidos basados en pcDNA3.1 (Liljestrom and Garoff, 1991). De modo adicional, la presencia de ARN doble cadena durante la amplificación del replicón incrementaría la respuesta inmunológica, debido a la inducción de procesos apoptóticos en la célula receptora del plásmido (Li et al., 2006). Este sistema mostró muy buenos resultados cuando se lo utilizó contra diferentes patógenos, induciendo tanto inmunidad humoral como celular (Liljestrom and Garoff, 1991);(Zhou et al., 1994);(Li et al., 2006).

La otra estrategia que admite este vector es la formación de VLPs. Como estos vectores híbridos son capaces de replicar por si mismos pero no de empaquetarse, ya que carecen de las proteínas estructurales del virus, estas pueden ser provistas en trans por un vector denominado helper (Liljestrom and Garoff, 1991); (Zhou et al., 1994). De esta manera se formarían partículas virales recombinantes capaces de realizar una sola ronda de infección.

Algunas de las ventajas que provee este sistema de expresión son:

- Amplio rango de hospederos,
- Eficiente infección de células eucariotas, indispensable para las modificaciones postraduccionales de la proteína de interés,
- Capacidad para producir un alto nivel de proteínas, utilizando la maquinaria celular casi exclusivamente para este propósito,
- Replicación del ARN en el citoplasma,
- Alta capacidad de clonación (4-7 kb) y efecto citopático tardío (72-96 horas), por lo que se utiliza para la expresión de diversas proteínas, nucleares, citoplasmáticas, de membrana y secretadas, en diversos estudios de biología molecular, incluso en la producción comercial de diferentes productos génicos y para el desarrollo de vacunas y para la terapia génica (Liljeström, 1993); (Lundstrom, 1999); (Colmenero et al., 2001).

1.7.2. Sistema de expresión derivado de Adenovirus

El sistema de expresión basado en Adenovirus (ViraPower Adenoviral Expression System, Invitrogen™), permite la creación de partículas de adenovirus deficientes en su replicación, que pueden ser usadas para el delivery y expresión transiente de genes de interés en células de mamíferos en división o quiescentes.

Adenovirus se asocia a las células blanco por unión a su receptor Coxsackie/Adenovirus (CAR) (Bergelson et al., 1997). Luego de la unión al CAR, los adenovirus son internalizados vía endocitosis mediada por integrinas (Russell, 2000) seguido por un activo transporte al núcleo celular. Una vez en el núcleo, los eventos tempranos de replicación son iniciados, entre ellos la transcripción y traducción de la proteína E1. Seguido de la expresión de los genes tardíos y replicación viral. La expresión de los genes tardíos es dependiente de la proteína E1.

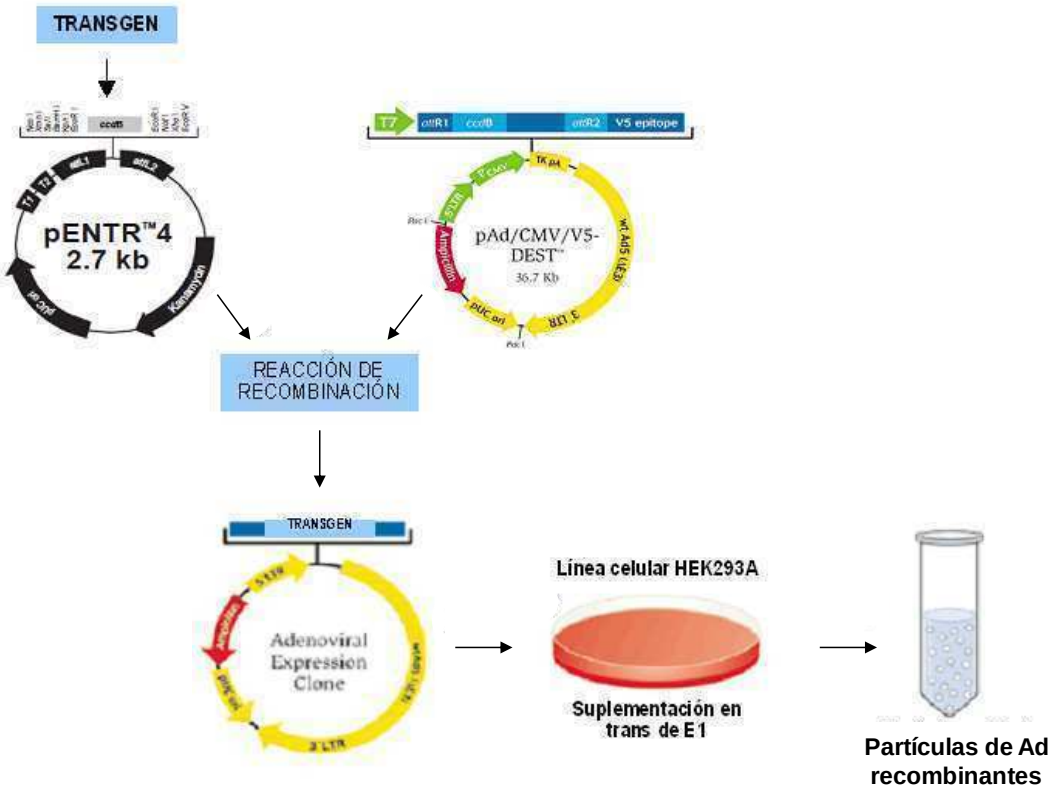
El sistema de expresión derivado de adenovirus esta formado por dos componentes principales. El primero es el vector de expresión pA/CMV/V5/DEST, el cual contiene todo el genoma de Adenovirus, excepto la región codificante de los genes E1 y E3 de adenovirus. La expresión de los genes de interés está controlada por el promotor de citomegalovirus (CMV) humano y además contiene los elementos requeridos para permitir el empaquetamiento de los genes heterólogos dentro de los viriones (5' y 3' ITRs, señal de encapsidación y los genes adenovirales tardíos).

El otro componente fundamental del sistema es la línea celular optimizada HEK 293A. Estas células tienen integrado en su genoma una copia del gen E1 de adenovirus por lo tanto, suplementan en trans la proteína (E1a y E1b) requerida para la generación, amplificación y titulación de los adenovirus recombinantes (Figura 1.8).

El uso de este sistema de expresión adenoviral Virapower, presenta las siguientes ventajas:

- El uso de la tecnología Gateway® permite una alta eficiencia y rápido clonado del gen de interés,
- Permite la generación de stocks de adenovirus recombinantes de alto título,
- Permite el delivery y expresión de los genes de interés en células de mamífero quiescentes o en división,
- Es un sistema seguro para su uso como vehículo de genes tanto in vivo como in vitro, ya que permite la producción de partículas de adenovirus recombinantes con la E1 deleteada, que solamente pueden replicar en células que complementan esta proteína.

Figura 1.8. Sistema de expresión de Adenovirus recombinante



Se inserta el transgen de interés en el vector de entrada (pENTR) y luego se hace una reacción de recombinación entre este y el vector de destino (pAd-CMV/V5-DEST), el cual contiene todo el genoma de adenovirus excepto la región codificante para las proteínas E1 y E3. Posteriormente, con el vector de expresión generado, se transfectan células HEK293A, que suplementan en trans la proteína E1 al vector defectivo, posibilitando la formación de las partículas de Adenovirus recombinantes.

1.7.3. Vectores amplicón derivados del Virus Herpes Simplex tipo 1

Los vectores amplicones son partículas derivadas del virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) idénticas al virus salvaje en cuanto a estructura, características inmunológicas y rango de huésped, pero que en lugar del genoma viral llevan un plásmido de origen procarionte, el cual contiene los genes de interés, denominado plásmido amplicón.

Este plásmido amplicón además de contener un origen de replicación bacteriano (ColE1), y genes que le confieren resistencia a un antibiótico (ampR) lleva el origen de replicación (OriS) y la señal de empaquetamiento (pac) específicos de HSV-1 en adición a los genes de interés. Fraefel (Fraefel, 2002) desarrolló un sistema de empaquetamiento libre de virus colaborador (helper free), donde se lo reemplazó

por un bácmido (BAC), el fHSVΔpacΔICP27, que contiene el genoma entero de herpes pero que carece de la señal de empaquetamiento y del gen esencial para la replicación ICP27. Además su tamaño fue incrementado para reducir la probabilidad de que sea empaquetado en las nuevas partículas ensambladas. Además, la proteína ICP27 es suplementada en trans por otro plásmido (pEBH-ICP27) y por la línea celular utilizada en las trasfecciones (Vero 2.2).

Para obtener los vectores amplicón (Figura 1.9) se debe co-transfectar células Vero 2.2 con el bácmido, con el plásmido amplicón que lleva el transgen de interés y con otro plásmido que expresa la proteína ICP27. Dentro de las células se va a producir la replicación solo del plásmido amplicón, ya que contiene el origen de replicación de HSV.

La forma de replicación es por el mecanismo de círculo rodante obteniéndose finalmente concatémeros, es decir múltiples copias en tándem del plásmido amplicón.

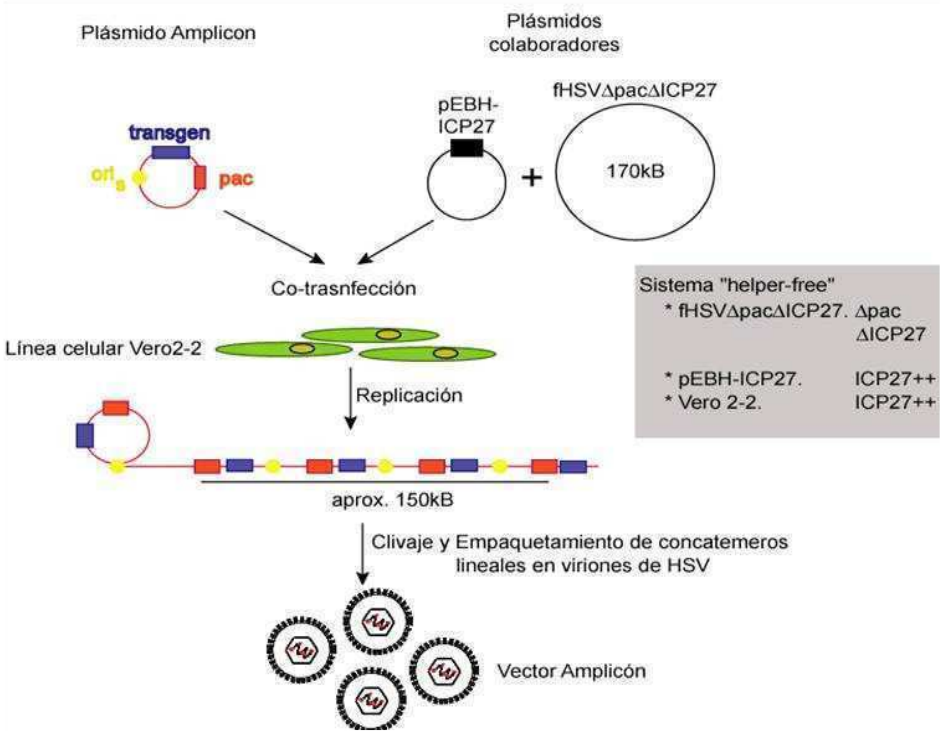
Cuando llega a un tamaño de 150 Kb, que es el tamaño límite que pueden empaquetar las partículas de herpes, se produce el clivaje y posterior empaquetamiento del plásmido amplicón dentro de la partícula viral de HSV.

Las ventajas que presenta este sistema de expresión son:

- Son vectores deficientes en su replicación,
- Son seguros, al no llevar genes virales no son tóxicos para las células infectadas ni patogénicos para los organismos inoculados,
- No hay riesgos de integración en el genoma,
- Tienen una gran capacidad transgénica, permiten la inclusión de hasta 150 Kb de ADN foráneo, pudiéndose clonar múltiples copias del gen de interés,
- Amplio rango de huésped y habilidad para infectar tanto células quiescentes como en división,
- Desarrollo de inmunidad humoral y celular.

La desventaja que presentan es que la cantidad de vector amplicón producida es limitada, ya que estos vectores no pueden ser amplificados.

Figura 1.9. Sistema de expresión de amplicones derivados de HSV-1, libre de virus colaborador



Se co-transfectan células permisivas con el plásmido amplicón, el cual contiene el transgen de interés y el origen de replicación y señal de empaquetamiento de HSV, con otros dos plásmidos colaboradores. Dentro de las células se va a replicar solamente el plásmido amplicón, formando concatémeros lineales y cada 150 Kb se va a producir el clivaje y el empaquetamiento dentro de las partículas de vector amplicón.

OBJETIVOS

2. Objetivo general

El presente trabajo de Tesis tiene como objetivo principal desarrollar nuevas vacunas y estrategias de inmunización para contribuir a la prevención y control de la fiebre aftosa (FA), utilizando como vehículos vectores virales heterólogos y vacunas genéticas capaces de expresar subunidades del Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) en células de mamífero.

Objetivos específicos

- Desarrollar inmunógenos a través de la utilización de vacunas génicas (vector derivado del virus Semliki Forest y pCI-neo) y mediante la generación de vectores virales no replicativos derivados de Herpesvirus y Adenovirus que expresen in situ partículas vacías o subunidades proteicas del VFA del serotipo O, cepa O1/Campos.

- Identificar y caracterizar por técnicas moleculares, inmunofluorescencia e inmunoblotting, la expresión de las proteínas estructurales y de la proteasa 3C del VFA luego de la transfección e infección de células de mamíferos con los vectores desarrollados.

- Evaluar las vacunas recombinantes experimentales en el modelo ratón, a través de estrategias basadas en la inoculación secuencial de vacunas genéticas, vacunas derivadas de adenovirus, de amplicones de herpesvirus, y virus inactivado, en distintas combinaciones, para estudiar el efecto del primado y el refuerzo (prime-and-boost) de las distintas formulaciones, en el desarrollo de la inmunidad contra el VFA.

- Estudiar y comparar la inmunidad humoral y celular y la protección generada, en el modelo ratón, por las distintas combinaciones de vacunas y estrategias de inmunización.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Virus, células y medios de cultivo

El ARN genómico del virus de la Fiebre aftosa (VFA), cepa O1/Campos/Brasil/58 (O1/Campos), perteneciente al serotipo O, fue provisto por el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA), siendo su origen el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA).

Las líneas celulares BHK-21, HEK293A, Vero 2.2 y BSR fueron cultivadas en las condiciones establecidas en el manual “Animal Cell Culture” (Pollard, 1990). En todos los casos se trabajó con cultivos en monocapa, en placas multi-pocillo o botellas de cultivo estático, de acuerdo a los requerimientos de cada ensayo.

Las monocapas de células BHK-21 fueron crecidas en Medio Esencial Mínimo Glasgow, G-MEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 100 mM, Penicilina 100 mM, Estreptomicina 100 mM y aminoácidos no esenciales 100 mM.

Las monocapas de células HEK293A, que expresan constitutivamente el activador transcripcional E1 de Adenovirus, fueron crecidas en Medio Esencial Mínimo Dulbecco (D-MEM, Invitrogen) suplementado con 10% de SFB, glutamina 100 mM, Penicilina 100 mM, Estreptomicina 100 mM y aminoácidos no esenciales 100 mM.

Las células Vero 2.2 (cedidas por el Dr. Cornel Fraefel, Universidad de Zurich), que expresan constitutivamente el activador transcripcional ICP27 del virus Herpes Simplex Humano tipo 1 (HSV-1), fueron mantenidas en D-MEM suplementado con 10% de SFB, glutamina 100 mM, Penicilina 100 mM, Estreptomicina 100 mM, y G418 (500 µg/ml).

Para las células BSR, clon derivado de la línea BHK-21, se utilizó medio G-MEM, suplementado con 10% de SFB inactivado (30 minutos a 56℃), glutamina 100 mM, Penicilina 100 mM, Estreptomicina 100 mM y bicarbonato de sodio al 7,5%.

Los cultivos se incubaron a 37ºC en estufa con 4% de CO_2.

3.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo

Se utilizaron bacterias E. coli, cepas: XL1 Blue MRF´, DH5αF´IQ o DH10β para la producción del ADN plasmídico. Para la preparación de proteínas recombinantes se utilizó la cepa BL21. Las bacterias se crecieron en medio LB (Sambrook, 1989) a 37ºC

en agitador rotatorio (200 rpm), o en placas de Petri durante 12-16 horas (hs). Cuando fue necesario, se incluyeron antibióticos en las siguientes concentraciones: ampicilina (Amp): 100 µg/ml, kanamicina (Kan): 50 µg/ml y Cloranfenicol (Cm): 25 µg/ml.

3.3. Técnicas generales de biología molecular

Las técnicas de biología molecular se realizaron según lo descripto en Molecular Cloning (Sambrook, 1989) y las indicaciones de los fabricantes.

3.4. Amplificación de la región codificante de las proteínas estructurales del VFA y la proteasa 3C

3.4.1. Obtención del ARN del Virus de la Fiebre Aftosa cepa O1/Campos

La extracción del ARN viral se realizó en instalaciones con Bioseguridad NBS 3 Agricultura, también denominado 4OIE, de acuerdo al protocolo desarrollado por SENASA. El ARN viral se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.4.2. RT-PCR de los segmentos genómicos P1-2A y 3C

A partir del ARN genómico del VFA se amplificaron, por RT-PCR, las regiones que codifican para P1-2A y 3C utilizando oligonucleótidos específicos.

Las copias en ADN de los fragmentos genómicos que codifican para las regiones P1 y 2A, se obtuvieron por RT utilizando el oligonucleótido P12Arev (5' aagcttctagtaccagggtttggcc 3') que incluye el sitio de restricción para la enzima Hind III (subrayado). La reacción de amplificación por PCR se realizó con los oligonucleótidos P12Arev y P12Af (5' aggcct**g**cc**a**ccATG**g**gggctggacaatcca 3') que incluye el sitio de corte para la enzima de restricción Stu I (subrayado) y la secuencia consenso Kozak y el codón de iniciación ATG (en negrita y mayúsculas, respectivamente). En la Figura 3.1, panel A se muestra el fragmento resultante de 2,5 Kb.

El segmento codificante para la proteasa viral 3C se obtuvo por RT-PCR a partir del ARN del VFA cepa O1/Campos y el oligonucleótido 3Crev (5' ggtaggcctaatcaacccctcgtggtgtg 3') que incluye el sitio de corte para la enzima de restricción Stu I y el codón stop TAA (subrayado y en cursiva, respectivamente). Para la amplificación por PCR se utilizaron los oligonucleótidos 3Crev y 3Cf (5' aagaagcttgctaagaacctgattgtc 3') que incluye el sitio de corte para la enzima de

restricción Hind III (subrayado). El amplicón obtenido de 0,7 kb se muestra en el panel B de la misma figura.

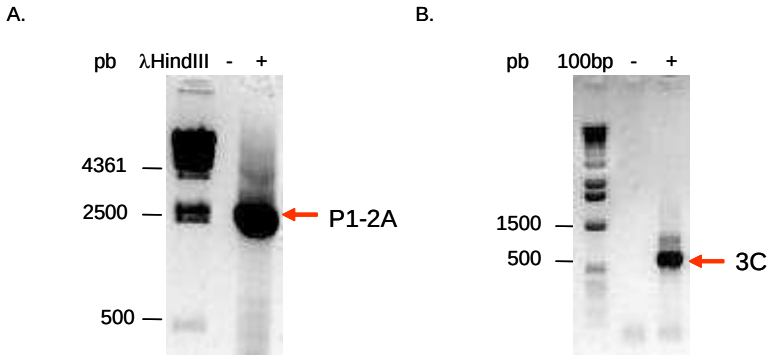


Figura 3.1. Amplificación por RT-PCR de los segmentos genómicos P1-2A y 3C del VFA serotipo O1/Campos. Panel A, fragmento de 2500 pb, correspondiente al amplicón P1-2A. Panel B, fragmento de 700 pb, resultante de la amplificación de 3C. λHind III y 100bp: Marcadores de peso molecular, (-): Control negativo de PCR.

3.4.3. Construcción de los plásmidos pG_P12A y pG_3C

Los fragmentos de ADN amplificados precedentemente, P12A y 3C, fueron aislados del gel y purificados mediante un kit comercial (Quiaex) y posteriormente clonados en el vector pGEMT-easy, generando los plásmidos denominados pG_P12A y pG_3C.

Para corroborar la presencia y correcta orientación de los insertos, el ADN se analizó mediante digestión con diferentes enzimas de restricción. En la Figura 3.2, se muestran los patrones de restricción obtenidos por la digestión de posibles clones de pG_3C con la enzima Sac I (parte A) y de clones de pG_P12A con la enzima Sac II (parte B). Para ambos casos, se recuadra un clon que presentó el patrón de restricción adecuado para la estrategia de clonado elegida.

Se enviaron a secuenciar dos clones diferentes de cada construcción y se hizo el alineamiento y análisis de la secuencias mediante el programa ClustalW. En ninguno de ellos se detectaron mutaciones que pudieran alterar los sitios de clivaje proteolítico de la poliproteína P1 ni en el fragmento 2A ni 3C.

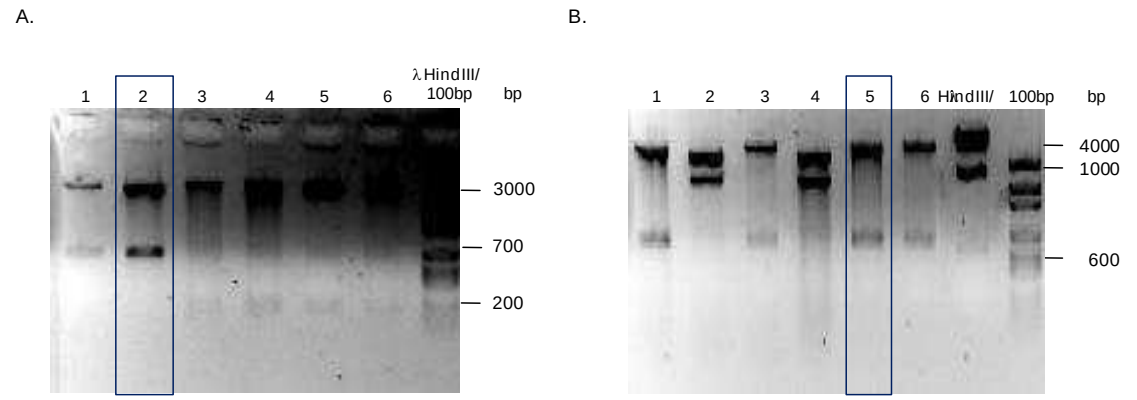


Figura 3.2. Rastreo de clones positivos de pG_3C y pG_P12A. Panel A, digestión de posibles clones de pG_3C con Sac I (Tamaño correcto de los fragmentos: 3000 pb y 714 pb). Panel B, digestión de posibles clones de pG_P12A con Sac II (Tamaño correcto de los fragmentos: 4900 pb y 659 pb). λHindIII y 100 bp: marcadores de peso molecular.

3.4.4. Construcción del plásmido pB_P12A3C

La secuencia codificante para la proteasa 3C fue liberada del plásmido pG_3C por digestión con las enzimas Hind III y Stu I. El fragmento obtenido (0,7 kb) fue luego ligado en el plásmido pG_P12A, previamente tratado con las mismas enzimas de restricción. Así se generó el plásmido pG_P12A3C que fue utilizado como templado para amplificar por PCR el fragmento P12A3C, utilizando los oligonucleótidos P12Af y 3Crev. El amplicón obtenido de 3,2 kb, fue clonado en el plásmido pBBr-2, previamente digerido con la enzima EcoR V. Los distintos clones obtenidos, luego de transformar bacterias competentes y purificar el ADN, se analizaron mediante restricción con la enzima Sac I. Como se muestra en la Figura 3.3, el único clon de los 10 que se analizaron, que presentó el inserto P12A3C fue el clon 6 (marcado con un recuadro color azul).

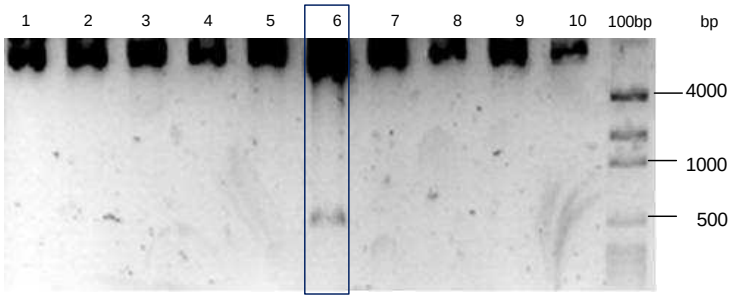


Figura 3.3. Análisis de restricción de posibles clones de pB_P12A3C. Los distintos clones obtenidos se digirieron con la enzima Sac I (Tamaño esperado de los fragmentos según la estrategia de clonado elegida: 5595 pb y 700 pb).

3.5. Construcción del plásmido pG_VP1

La región que codifica para la proteína estructural VP1 del VFA se amplificó por PCR a partir del plásmido pG_P12A3C y los oligonucleótidos VP1f (5' agatctgccATGaccacttctgcgggcg 3') y VP1r (5' agatcttcaaaattcaaagtctgtt 3') que incluyen el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Bgl II (subrayado) y el codón de iniciación ATG (mayúscula) o de terminación (cursiva), respectivamente. El amplicón de 0.7 kb, se clonó en el vector pGEMT-Easy generando el vector pG_VP1.

3.6. Construcción del plásmido pG_GFP

El gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) se amplificó por PCR utilizando como ADN molde el plásmido pRIBOTEX-GFP (gentilmente cedido por el Dr. Javier De Gaudenzi, Universidad de San Martín) y los oligonucleótidos GFPf (5' ggatccatgagtaaaggagaagaa 3') y GFPr (5' cccgggttatttgtatagttcatccat 3'), los cuales introducen los sitios de restricción BamH I y Sma I (subrayado), respectivamente. El producto de PCR, de 0.8 kb fue ligado al vector pGEMT-Easy (Promega) generando el plásmido pG_GFP.

3.7. Secuenciación de los distintos clones obtenidos

Los clones que resultaron positivos por digestión con enzimas de restricción, fueron secuenciados por el método de single extensión, por Macrogen Inc (Corea). El alineamiento y análisis de las secuencias se realizó con el programa ClustalW.

3.8. OBTENCIÓN DE VACUNAS GÉNICAS QUE EXPRESAN SEGMENTOS GENÓMICOS DEL VFA Y GFP

3.8.1. SISTEMA BASADO EN EL VIRUS SEMLIKI FOREST

3.8.1.1. Generación de los vectores pSFV-P12A3C, pSFV-VP1 y pSFV-GFP

El replicón derivado del Virus Semliki Forest, pSFV-1, fue desarrollado y gentilmente cedido por la Lic. Lorena Ogas (Ogas, 2005).

Para generar la construcción pSFV-P12A3C, el fragmento P12A3C fue liberado del plásmido pB_P12A3C por restricción con las enzimas Bgl II y Stu I y ligado en el vector pSFV-1, previamente digerido con las enzimas BamH I y Sma I. La Figura 3.4 muestra el análisis de restricción de distintos clones obtenidos, utilizando la enzima

Kpn I. De los 4 clones estudiados, el único que presentó el inserto P12A3C fue el clon 1 (marcado con un recuadro color azul).

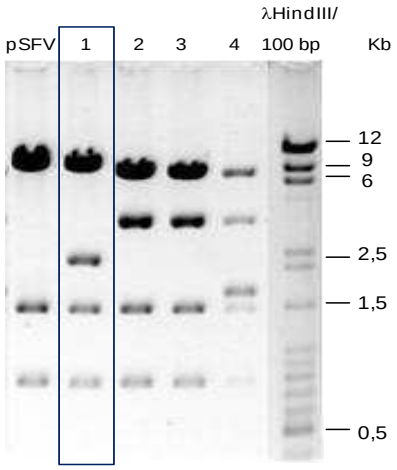


Figura 3.4. **Rastreo de clones positivos de pSFV-P12A3C.** Se digirieron los distintos clones obtenidos con la enzima Kpn I (Tamaño correcto de los fragmentos 806 pb, 1483 pb, 2193 pb y 9,7 kb).
λHindIII y 100 bp: marcadores de peso molecular.

El plásmido pSFV-VP1 fue obtenido sub-clonando el fragmento de 0,7 kb liberado del plásmido pG_VP1 mediante restricción con la enzima BamH I, en el vector pSFV-1, previamente digerido con la misma enzima de restricción.

Para la construcción del plásmido pSFV-GFP, la secuencia codificante para la proteína GFP fue aislada del vector pG_GFP por digestión con las enzimas de restricción BamH I y Sma I y sub-clonada en el vector pSFV-1, digerido con las mismas enzimas de restricción.

La Figura 3.5 muestra el esquema de los vectores derivados del virus Semliki Forest construidos:

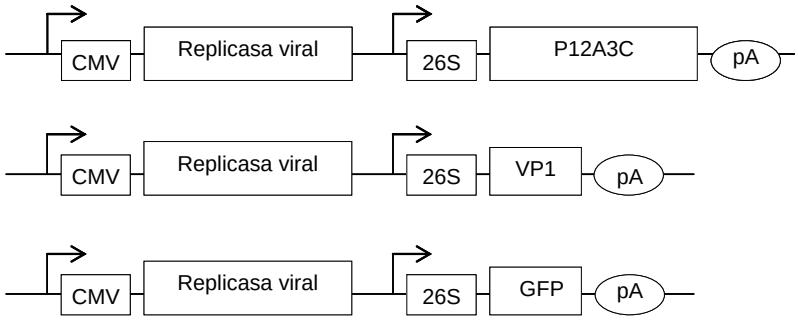


Figura 3.5. Esquema de los replicones pSFV-P12A3C, pSFV-VP1 y pSFV-GFP. En el vector pSFV-1 las secuencias codificantes para las proteínas estructurales virales fueron reemplazadas por un sitio múltiple de clonado donde se insertan las secuencias heterólogas. La transcripción in vivo del replicón pSFV-1 se encuentra bajo el control del promotor de CMV, mientras que la expresión del gen heterólogo está dirigida por el promotor subgenómico 26S. (pA) señal de poliadenilación.

3.8.2. SISTEMA BASADO EN EL VECTOR pCI-neo

3.8.2.1. Generación del vector pCI-P12A3C

El fragmento P12A3C fue liberado del plásmido pB_P12A3C mediante restricción con la enzima Stu I y ligado en el vector pCI-neo, previamente digerido con la enzima Sma I. La Figura 3.6 muestra el análisis de restricción de los diferentes clones obtenidos utilizando la enzima Sac I. A modo de ejemplo, se recuadra un clon que presentó el patrón de restricción adecuado, según la estrategia de clonado elegida.

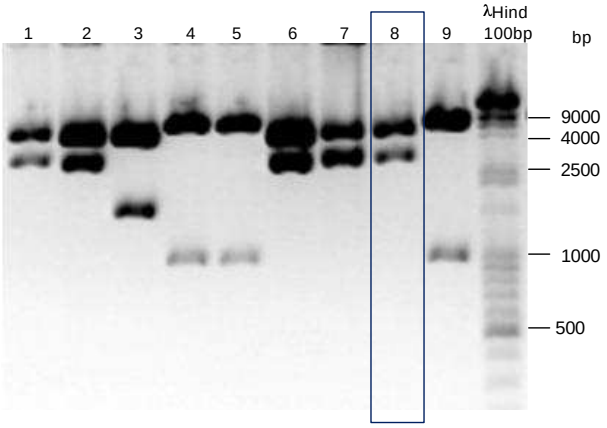


Figura 3.6. Análisis de restricción de posibles clones de pCI-P12A3C. Se digirieron con la enzima Sac I (Tamaño adecuado de los fragmentos: 5712 pb y 2960 pb).
λHindIII y 100 bp: marcadores de peso.

La Figura 3.7 muestra el esquema del vector comercial pCI-neo (Promega), en el que se sub-clonaron las secuencias P12A3C del VFA:

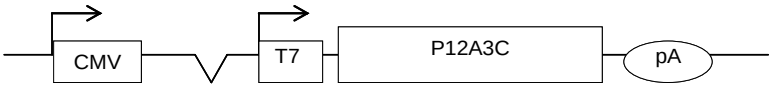


Figura 3.7. Esquema del vector pCI-P12A3C. La transcripción del gen heterólogo se encuentra bajo el control del promotor CMV. Río abajo del mismo se encuentra una región intrónica (⌒⋁⌒) que aumenta los niveles de expresión del transgen. (pA) señal de poliadenilación; (T7) promotor para la síntesis de ARN por la polimerasa viral T7. Para aumentar los niveles de expresión del transgen, previamente a la transfección se realiza una infección con el virus vaccinia recombinante, Vtf7-3, que expresa la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (T7ARNPol).

3.8.2.2. Virus vaccinia Vtf7-3

El virus vaccinia recombinante Vtf7-3 (Fuerst et al., 1986), que expresa la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (T7ARNPol) (cedido por B. Moss, National Institutes of Health, Bethesda, EEUU) fue utilizado previo a las transfecciones realizadas con los vectores pCI-P12A3C.

Para las infecciones con el virus Vtf7-3, monocapas sub-confluentes de células BSR crecidas en placas de cultivo de 6 pocillos (aproximadamente 8.10^5 células por pocillo de 9,6 cm^2) fueron infectadas con 600 µl de inóculo conteniendo 3 a 5 unidades formadoras de placas por célula, de forma tal que más de un 90% de las células fueran infectadas. Después de 1 hora de adsorción a 37℃, las monocapas celulares fueron lavadas y cubiertas con Opti-MEM para continuar con el protocolo de transfección.

3.8.2.3. Transfecciones de ADN

A menos que se indique especialmente, las transfecciones de células BSR fueron realizadas sobre monocapas crecidas en placas de cultivo de 6 pocillos (aproximadamente 8.10^5 células por pocillo de 9,6 cm^2). Las transfecciones de las mismas con los plásmidos derivados de pCI fue precedida por la infección de las mismas con el virus Vtf7-3, en la forma descripta anteriormente.

3.9. PARTÍCULAS VIRALES NO REPLICATIVAS QUE EXPRESAN SUBUNIDADES DEL VFA Y GFP

3.9.1. VECTORES BASADOS EN ADENOVIRUS

3.9.1.1. Obtención de Ad-P12A3C y Ad-GFP

Para la construcción de los vectores no replicativos basados en Adenovirus (Ad) que expresan las regiones codificantes para las proteínas estructurales del VFA o GFP, se utilizó el sistema *ViraPower™ Adenoviral Gateway® Expression Kit* de Invitrogen™, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.9.1.2. Sub-clonado de los segmentos genómicos del VFA y GFP en el vector de entrada pENTR-4

➢pENTR-P12A3C. El fragmento P12A3C, obtenido a partir del plásmido pB_P12A3C digerido con las enzimas Bgl II y EcoR I, fue sub-clonado en el vector pENTR-4 previamente digerido con BamH I y EcoR I. De esta forma se obtuvo la construcción pENTR-P12A3C.

➢pENTR-GFP. El plásmido pG_GFP se digirió con las enzimas de restricción EcoR V y BamH I. El fragmento correspondiente a la secuencia codificante para GFP se ligó al vector pENTR-4 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

3.9.1.3. Generación de los plásmidos de Ad recombinantes in vitro

Para generar los plásmidos de Ad recombinantes se llevó a cabo una reacción de recombinación entre cada uno de los vectores de entrada (150 ng) y el vector de destino pAd/CMV/V5-DEST (300 ng). La reacción se realizó en un volumen final de 10 μl, en presencia de 2 u de LR Clonasa II en buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) durante toda la noche (OverNight, ON) a 16ºC. Al día siguiente se agregó proteinasa K y luego de una incubación de 10 min a 37ºC, se transformaron bacterias DH10β con 5 μl de la reacción de recombinación. Una alícuota del producto de transformación se distribuyó en placas LB agar conteniendo Amp, y se incubaron ON a 37℃. Posteriormente se seleccionaron al azar y se transfirieron algunas colonias de esta placa a otras conteniendo Km y Cm. Aquellos clones que crecieron solamente en la placa conteniendo Cm (positivos para la recombinación) se analizaron por PCR, previa purificación del ADN, amplificando la región codificante para VP1.

Como se muestra en la Figura 3.8, a partir del ADN purificado de todos los clones analizados se pudo obtener el amplicón correspondiente a VP1 de 0,7 Kb.

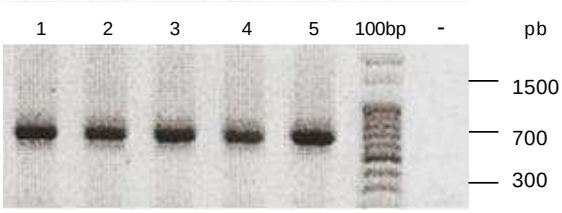


Figura 3.8. Rastreo por PCR de clones positivos de pAd-P12A3C. Se amplificó el segmento genómico codificante para la proteína VP1. (Tamaño adecuado del amplicón: 700 pb).
100 bp: marcador de peso molecular,
(-): control negativo de PCR.

Una vez obtenidos los plásmidos pAd-P12A3C y pAd-GFP (Figura 3.9), los mismos se transfectaron en la línea celular HEK293A con el fin de obtener cada uno de los stocks adenovirales y conformar los bancos respectivos.

La Figura 3.9 muestra el esquema del vector derivado de Adenovirus donde se sub-clonaron las secuencias de P12A3C del VFA y GFP:

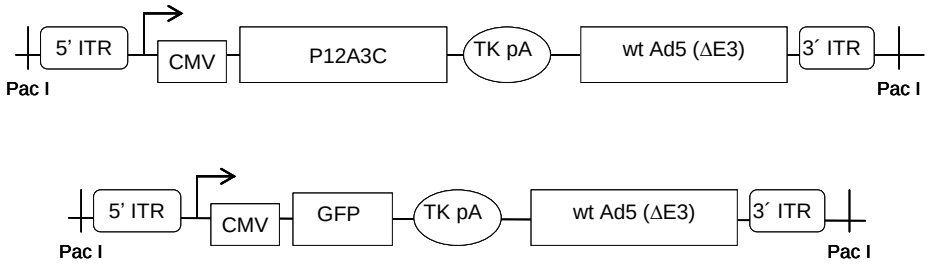


Figura 3.9. Esquema de los vectores pAd-P12A3C y pAd-GFP. La secuencia del gen heterólogo se incorpora al genoma del Adenovirus dentro de la región deletada de la proteína E1 por medio de una reacción de recombinación entre los vectores de entrada (pENTR-P12A3C o pENTR-GFP) y el vector de destino pAd/CMV/V5-DEST. La transcripción in vivo se encuentra bajo la dirección del promotor de CMV. (TK pA) señal de poliadenilación de la timidina kinasa del virus Herpes Simplex. (ITR's) extremos virales izquierdo y derecho que quedan expuestos luego de la digestión con la enzima de restricción Pac I.

3.9.1.4. Obtención y amplificación de los bancos de adenovirus recombinantes

Las transfecciones de células HEK293A con los plásmidos pAd-P12A3C y pAd-GFP, para la obtención de los Ad recombinantes, fueron realizadas sobre monocapas crecidas en placas de cultivo de 6 pocillos (aproximadamente 8.10^5 células por pocillo de 9,6 cm^2). Previamente a la transfección, el ADN adenoviral fue digerido con la enzima Pac I a fin de exponer los ITRs virales derecho e izquierdo. A las 24 horas post transfección (hpt) se cambió el medio de transfección por D-MEM completo y a las 48 hpt las células se despegaron y fueron transferidas a un botella T-25 con D-MEM 2% SFB. La cosecha viral se realizó cuando se observó la aparición de efecto citopático (ECP).

Para obtener el pasaje 1 (P1) de suspensión adenoviral, las células se lisaron realizando 3 ciclos de congelado-descongelado, a -80℃ por 30 min y a 37° C por 15 min respectivamente. Una vez eliminados los restos celulares por centrifugación a 3000 rpm por 15 min a temperatura ambiente (TA), el sobrenadante se conservó a -80℃.

Para amplificar el banco de Ad, se utilizó una alícuota del P1 para infectar nuevamente células HEK293A en botellas de mayor superficie. Siguiendo el mismo procedimiento anterior se obtuvo el P2 (3 botellas T-75) y así sucesivamente hasta el P4 (6 botellas T-175).

Finalmente, la suspensión adenoviral proveniente del P4 (aproximadamente 90 ml) se purificó y concentró por ultracentrifugación a 26000 rpm, durante 3 h a 4ºC a través de un colchón de sacarosa al 25 % en buffer NET (Tris-HCl 10 mM pH 8.0,

EDTA 1 mM, NaCl 0,2 M). El pellet obtenido, una vez seco, se resuspendió en 200 µl de PBS estéril, logrando así un banco de adenovirus para utilizar en los experimentos con animales.

3.9.1.5. Titulación de los Adenovirus recombinantes

Se crecieron células HEK293A en placas de 6 pocillos de manera de que estén en un 90% de confluencia al momento de la infección. Se evaluaron diluciones seriadas al décimo de los stocks de adenovirus recombinantes (por duplicado) partiendo de una dilución10^{-6} hasta 10^{-10}. Se inocularon 600 µl sobre las células y luego de un periodo de adsorción (1 h a 37ºC), se cambió el medio por D-MEM completo. Al día siguiente se reemplazó el medio de cultivo por una capa de agarosa al 4% diluida 1/10 en D-MEM 2% SFB. Las placas se incubaron por 13 días adicionales en estufa a 37ºC con 4 % de CO_2. Luego se agregó una solución de 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue (MTT, Sigma) (5 mg/ml) para teñir las células vivas. Se contó el número de unidades formadoras de placas (UFP) en cada dilución y se calculó el título como UFP/ml: promedio de placas/ (volumen de inóculo x dilución). Para ambos adenovirus recombinantes se obtuvieron títulos de aproximadamente 1.10^{10} UFP/ml.

Para corroborar que los stocks de adenovirus recombinantes no estuviesen contaminados con adenovirus salvaje, se infectaron células no permisivas, Gli-36, CV-1 y BHK-21, con Ad-GFP a una MOI de 50. También se infectaron células HEK293A, como control, a una MOI de 1. Hasta las 72 hpi no se observó aparición de ECP en ninguna línea celular no permisiva a la infección, excepto en la HEK293A. Además, se observaron al microscopio de fluorescencia, confirmando la infección con el Ad-GFP y la expresión de la proteína heteróloga.

3.9.2. VECTORES BASADOS EN EL VIRUS HERPES SIMPLEX-1

3.9.2.1. Obtención de vectores amplicón HSV-P12A3C

Los vectores amplicón son partículas del Virus Herpes Simplex humano tipo 1 (HSV-1) que transportan en su interior un plásmido procariota, denominado plásmido amplicón, en lugar del genoma viral. Este plásmido amplicón, además del transgen de interés, contiene un origen de replicación (oriS) y empaquetamiento (pac) derivados del HSV-1.

3.9.2.2. Construcción de los plásmidos amplicón de HSV-1 conteniendo las proteínas estructurales, la proteína 2A y la proteasa viral 3C del VFA

El cassette P12A3C se amplificó por PCR a partir del plásmido pG_P12A3C y los oligonucleótidos P12As (5' agatctATGggggctggacaatcc '3) y 3Cr_Cla (5' atcgatttagtaccagggtttggcc 3'), que se diseñaron incluyendo sitios de restricción para la enzima Bgl II o Cla I (subrayado), y un codón de iniciación ATG (mayúscula) o terminación (cursiva) respectivamente. El amplicón obtenido se digirió con las enzimas de restricción correspondientes y se insertó en el plásmido amplicón de HSV-1, generando el plásmido pHSV-P12A3C.

Para verificar que el inserto, P12A3C, estuviese presente en los distintos clones obtenidos, se realizó una PCR a partir del ADN purificado de los distintos clones, amplificando el segmento genómico codificante para VP1. En la Figura 3.10 se recuadra, a modo de ejemplo, un clon a partir del cual se pudo amplificar la región codificante para VP1.

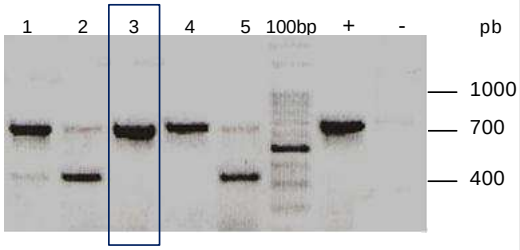


Figura 3.10. Rastreo por PCR de clones positivos de pHSV-P12A3C. Se amplificó el segmento genómico codificante para VP1 (Tamaño adecuado del amplicón: 700 pb).
100 bp: marcador de peso molecular, (+): Control positivo (PCR realizada con un templado conocido), (-): Control negativo de PCR.

La Figura 3.11 muestra el esquema del vector amplicón donde se sub-clonaron las secuencias P12A3C del VFA:

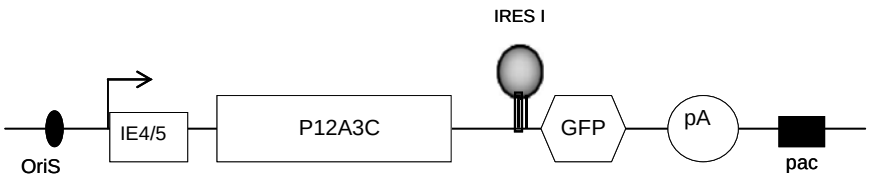


Figura 3.11. Esquema del plásmido amplicón pHSV-P12A3C. El plásmido amplicón contiene un origen de replicación (oriS) y empaquetamiento (pac) derivados del HSV-1. Además posee un sitio interno de unión a ribosomas (IRES) picornaviral que posibilita la expresión simultánea del gen heterólogo y reportero, a partir del promotor IE4/5.
(pA) señal de poliadenilación.

3.9.2.3. Empaquetamiento del plásmido amplicón en un sistema libre de virus colaborador

Los plásmidos amplicón se co-transfectaron con el bácmido colaborador fHSVΔpacΔICP27 y el plásmido pEBH-ICP27 en la línea celular permisiva Vero 2.2. Las transfecciones fueron realizadas sobre monocapas de células crecidas en placas de cultivo de 6 pocillos (aproximadamente 8.10^5 células por pocillo de 9,6 cm^2).

Luego de tres días, las partículas virales se purificaron a partir de lisados celulares totales por medio de una ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa al 25%. Finalmente, el pellet viral fue resuspendido en solución salina durante toda la noche a 4℃.

Para determinar el título viral se infectaron células Vero 2.2 y a las 24 h se evaluó el número de células que expresan GFP para cada dilución ensayada. Se calculó el título como Unidades de Transducción (UT)/ml: promedio de células verdes x dilución x 1000. Se obtuvieron títulos de alrededor de 5.10^5 UT/ml.

3.10. Condiciones de transfección celular para los distintos sistemas

Resumiendo, las monocapas celulares fueron transfectadas con las combinaciones de plásmidos adecuadas a cada experimento (Tabla 1), utilizando el reactivo de transfección Lipofectamina™ 2000 en medio de cultivo Opti-MEM (Invitrogen™) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. En el caso de la producción de los vectores amplicón derivados de HSV, durante las transfecciones se utilizó además Reactivo Plus (Invitrogen).

Tabla 1. Condiciones de transfección que se utilizaron en los distintos experimentos

Experimento	Plásmidos utilizados	Línea celular	Cantidad de ADN/pocillo (μg)	Cantidad de Lipofectamina/ pocillo (μl)
WB e IF	pSFV-VP1 pSFV-GFP pSFV-P12A3C pCI-P12A3C	BSR	10	20
Producción de Ad recombinantes	pAd-P12A3C pAd-GFP	HEK293A	10	20
Producción de vectores amplicón derivados de HSV	pHSV-P12A3C pHSV-GFP fHSVΔpacΔICP27 pEBH-ICP27	Vero 2.2	0,4 2 0,2	16,8

3.11. Generación de reactivos para Inmunofluorescencia y Western Blot

Se obtuvieron sueros policlonales dirigidos contra las proteínas VP1 (anti-VP1), VP3 (anti-VP3), 3C (anti-3C) y GFP (anti-GFP).

➢ Anticuerpos anti-VP1: La región que codifica para la proteína VP1 (29 kDa) del VFA, se liberó del vector pG_VP1 con la enzima EcoR I y se sub-clonó en el vector de expresión procariota pGEX-2T (Invitrogen) digerido con la misma enzima de restricción.

➢ Anticuerpos anti-VP3: La región que codifica para la proteína VP3 (27 kDa) del VFA, se amplificó por PCR utilizando el plásmido pG_P12A3C y los oligonucleótidos VP3f (5' ggatccATGggaatattccccgtggc 3') y VP3r (5' gaattcttaccgcacgggcgtccac 3'). Cada oligonucleótido incluye un sitio de corte para la enzima BamH I o EcoR I (subrayado) y el codón de iniciación ATG (mayúscula) o el codón de terminación TAA (cursiva) respectivamente. El amplicón (700 pb) se digirió con las enzimas BamH I y EcoR I y se ligó al vector de expresión pGEX-2T (Invitrogen) tratado con las mismas enzimas de restricción.

➢ Anticuerpos anti-GFP: La región que codifica para la proteína GFP (27 kDa), fue aislada del vector pG_GFP mediante digestión con la enzima de restricción EcoR I y sub-clonada en el vector de expresión pGEX-2T (Invitrogen) digerido con la misma enzima de restricción.

➢ Anticuerpos anti-3C: La región que codifica para la proteína 3C (20 kDa) del VFA, se amplificó por PCR utilizando el plásmido pG_3C y los oligonucleótidos 3Cs (5' actagtATGagtggtgccccacc 3') y 3Cr_Cla (5' atcgatttactcgtggtgtggttc 3') que incluyen el codón de iniciación ATG (mayúscula) y el codón de terminación (cursiva), respectivamente. El amplicón obtenido (800 pb) se clonó en el vector pGEMT-easy generando la construcción pG_3Catg. La región codificante para la proteína 3C se liberó de este ultimo plásmido con la enzima EcoR I y se sub-clonó al vector de expresión pGEX-2T (Invitrogen) digerido con la misma enzima de restricción.

Cada uno de los plásmidos resultantes se introdujo en la cepa de Escherichia coli BL21 por transformación y la expresión de las proteínas se indujo con 0,1 mM de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) durante toda la noche a 37℃.

La proteína recombinante 3C fue purificada por cromatografía de afinidad a quelatos metálicos utilizando la resina Ni-NTA (Invitrogen). La proteína recombinante GFP se purificó por cromatografía de afinidad a glutatión, utilizando la resina glutation-

sepharosa (GE Healthcare). Las proteínas VP1 y VP3 se purificaron a partir de cuerpos de inclusión.

Las proteínas recombinantes se inocularon en conejos de acuerdo a protocolos establecidos en el manual “Antibodies, a laboratory manual” (Harlow, 1988).

3.12. Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Alícuotas de los lisados celulares o bacterianos, fueron ajustadas a una concentración final 1X de buffer muestra (Tris-HCl 100 mM, pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, Azul de bromofenol 0,2% y DTT 50 mM). En todos los casos, las muestras fueron luego calentadas durante 5 min a 100℃ y centrifugadas por 2 min a 12000 rpm. Las proteínas del sobrenadante fueron separadas en las condiciones descriptas por Laemmli en geles de poliacrilamida al 12,5% (Laemmli, 1970).

3.13. Detección de proteínas mediante Western blot (WB)

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE, fueron transferidas a una membrana de Hybond ECL Nitrocellulose (GE Healthcare), que fue luego teñida con Ponceau.S (1%) para evidenciar la presencia de las proteínas transferidas. Una vez lavada, la membrana se incubó durante 16 hs a 4℃ en una solución de PBS 0,1% Tween 20 (PBS-T), conteniendo 5% de leche descremada. Posteriormente fue incubada con una dilución del anticuerpo primario en PBS-T 3% de leche descremada, durante 2 hs a 37℃. Luego de 3 lavados con PBS-T, la membrana fue incubada con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (Dako cytomation), durante 1 h a TA. Después de 3 lavados con PBS-T, las proteínas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia (Pierce Western Detection Reagent®), exponiendo las membranas con placas AGFA CP-BU. Los anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones fueron:

- Sueros anti-VP1, anti-VP3 y anti-3C, dilución 1/500.
- Anticuerpo anti-GFP, dilución 1/500.
- Anticuerpo anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Dako cytomation), dilución 1/2000.

3.14. Visualización de proteínas por inmunofluorescencia (IF) y microscopia confocal

Células BSR fueron crecidas en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos circulares de vidrio. Luego de la transfección o infección fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas durante 10 min a TA con paraformaldehído al 4% en PBS. A continuación las células se permeabilizaron con Tritón X-100 0,2% en PBS, durante 10 minutos a TA y posteriormente, fueron incubadas con PBS conteniendo 3% de seroalbúmina bovina (BSA), durante 1 h a 37ºC. Una vez finalizado el bloqueo de los sitios de unión inespecífica, las células fueron incubadas con una dilución del anticuerpo primario en BSA al 3% en PBS, durante 1 h a 37℃. Las diluciones utilizadas fueron: 1:200 del anticuerpo primario anti-VP1, 1:200 del anticuerpo anti-VP3 o 1:100 del anticuerpo anti-GFP, según se indica en cada experimento. A continuación, las células fueron lavadas cuatro veces con BSA al 3% en PBS, seguido de cuatro lavados con PBS 0,2% Tween 20, y luego fueron incubadas con la dilución del anticuerpo secundario adecuado en BSA al 3% en PBS. Finalmente, las células fueron lavadas cuatro veces con BSA al 3% en PBS, dos veces con PBS + 0,2% Tween 20, dos veces con PBS y dos veces con agua bidestilada. Los preparados fueron montados sobre portaobjetos utilizando un líquido de montaje comercial (FluorSaveTM Reagent, Calbiochem®). Las imágenes fueron captadas mediante el microscopio de fluorescencia Olympus IX51.

3.15. Purificación de subunidades recombinantes del VFA

Células HEK293 fueron infectadas con el amplicón HSV-P12A3C a una multiplicidad de 0,03 UT/célula. A las 24 hpi se lisaron con buffer NET 0,05% v/v de Tritón X-100 (Sigma) y luego de una incubación de 10 min, los núcleos fueron removidos por centrifugación a 800 rpm por 10 min a 4℃. Los sobrenadantes se sembraron en gradientes de sacarosa de 5 a 30 % en NET y se ultracentrifugaron a 26500 rpm por 6 h a 4℃. Se colectaron fracciones del gradiente y paralelamente se registraron los valores de absorbancia a 405 nm. Cada una de las fracciones fue evaluada por un ELISA en fase sólida con el fin de localizar aquellas conteniendo las subunidades 140S, 75S y 12S del VFA.

3.16. Ensayo de Inmunoprecipitación (IP)

Alícuotas de extractos citoplasmáticos de células infectadas con HSV-P12A3C, fueron incubadas durante 1 h con agitación orbital, en presencia del anticuerpo

primario en un volumen final de 150 µl en buffer TEN 0.2% de NP-40, conteniendo inhibidores de proteasas (TLCK, aprotinina y PMSF). Finalizado el tiempo de incubación con el suero indicado en cada caso, se adicionó 30 µl de una suspensión 1:2 de Proteína A-Sefarosa 4B Fast Flow (GE Healthcare) en buffer TEN 0,2% de NP-40 más inhibidores de proteasas y la incubación prosiguió por 1 h, con agitación orbital. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 3.000 x g durante 3 min para precipitar los complejos antígeno-anticuerpo unidos a la Proteína A-Sefarosa. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet de Proteína A-Sefarosa fue lavado tres veces con 500 µl de buffer TEN 0,2% de NP-40 y dos veces con buffer TEN. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4℃. Finalmente, los pellets fueron resuspendidos en buffer muestra para su posterior análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, como se describe en la Sección 3.12. Los anticuerpos monoclonales utilizados en IP se detallan en Tabla 2.

Tabla 2. Características de los Mabs utilizados en este trabajo

Mab	cepa	Neutralizante	WB
8G	O1/Caseros	+	+ VP1
69	O1/Caseros	+	N.D.
74	O1/Caseros	+	N.D.
G8	O1/Campos	+	+ VP1
4C9	O1Switzerland1965	+	N.D.

N.D. no determinado.

3.17. Microscopia Electrónica

Las fracciones pertenecientes a las distintas subunidades del VFA obtenidas por ultracentrifugación, y resuspendidas en PBS, fueron adsorbidas a grillas de cobre de 300 mesh con revestimiento de formvar-carbon, durante 5 min. Luego, el excedente de líquido fue retirado, y las grillas se cubrieron con una solución de acetato de uranilo al 2%, durante 30 segundos. Para su visualización se utilizó un aumento de entre 50000 X y 80000 X en un microscopio electrónico JEOL (modelo SVC), perteneciente a la Facultad de Ciencias exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires.

3.18. Inactivación con Bromoetilenimina binaria

Alícuotas provenientes de los stocks de Ad-P12A3C, Ad-GFP, HSV-P12A3C y HSV-GFP fueron inactivados utilizando Bromoetilenimina binaria (BEI) en la forma descripta por Bahnemann (Bahnemann, 1975). Brevemente, se preparó una solución

1M de Bromohidrato de bromoetilamina (BEA) (Sigma) en hidróxido de sodio 0,2N y se incubó toda la noche a TA para permitir la ciclización de la BEA y formación de Bromoetilenimina binaria (BEI). Para el procedimiento de inactivación, cada suspensión fue incubada con BEI (1,6 mM final por tubo) durante 8 h a 37ºC en agitación constante. Transcurrido este periodo el reactivo se neutralizó con 0,1 volúmenes de tiosulfato de sodio 1M.

Para confirmar la inactivación completa de las suspensiones conteniendo Ad-GFP y Ad-P12A3C se infectaron monocapas de células HEK293A a una MOI de 5 y se evaluó la pérdida de la capacidad de producir ECP hasta las 48 hpi. En el caso de Ad-GFP también se evaluó la falta de expresión del gen reportero por microscopia de fluorescencia.

Para los vectores amplicón, HSV-P12A3C y HSV-GFP, se infectaron monocapas de células Vero 2.2 y se evaluó por microscopia de fluorescencia la pérdida de la capacidad de transducir el gen GFP.

3.19. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE EN RATONES

3.19.1. Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de entre cuatro y ocho semanas de edad. Los ratones fueron inmunizados (4 animales por grupo) por vía intramuscular (im), intraperitoneal (ip), intranasal (in) y subcutánea (sc). En todos los casos a los 28 días post vacunación (dpv) recibieron una segunda dosis. A diferentes tiempos post vacunación se colectaron muestras de sangre y el suero obtenido se conservó a -20ºC.

3.19.2. Obtención de células de bazo

A los 15 días post refuerzo (dpr) se extrajo el bazo de los animales y se aislaron las células perfundiendo los órganos varias veces con medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 5% de SFB, glutamina 100mM, Penicilina 100 mM, Estreptomicina mM, HEPES 100 mM y Piruvato de Sodio 100 mM. Seguidamente, la solución fue centrifugada a 1,200 rpm durante 5 min y el precipitado de células fue resuspendido en 2 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos (Cl2NH4 8.3 g/l,Tris HCl 10mM pH 7.5) e incubada durante 4 min a TA. Luego se agregaron 3 ml de RPMI centrifugándose inmediatamente en las mismas condiciones. Esta operación fue repetida otras dos veces a fin de eliminar completamente el buffer de lisis. Finalmente las células fueron resuspendidas en 1 ml de RMPI 10% SFB y una alícuota fue

contada al microscopio en presencia de azul de tripán (con el objeto de determinar el número total de células viables). El número de células por ml se calculó como el promedio de células contadas en cada cuadrante de la cámara de Neubauer x dilución x 10^4. Los cultivos se incubaron en estufa con 4% de CO_2 a 37ºC.

3.20. CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

3.20.1. ELISA para medición de anticuerpos específicos totales anti-VFA O1/Campos

Este ensayo utilizado para detectar anticuerpos específicos contra VFA se encuentra estandarizado y validado en nuestra Institución (Figura 3.12).

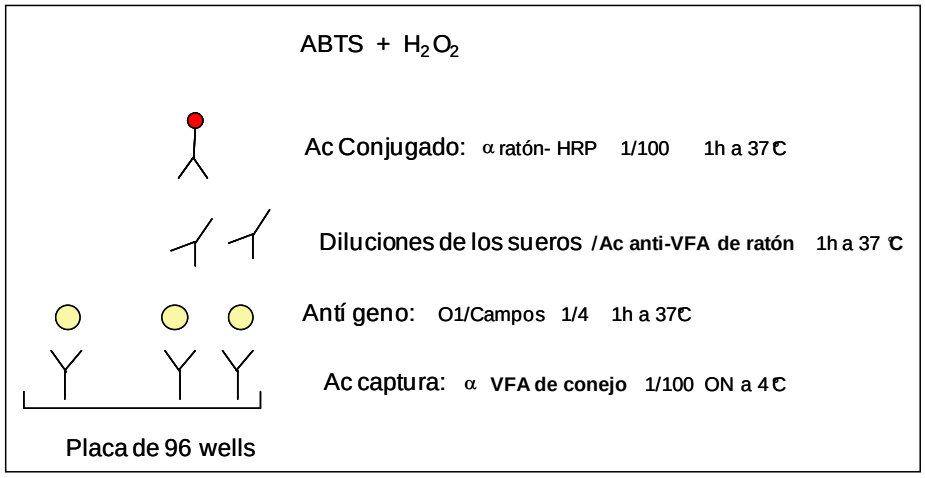


Figura 3.12. Esquema del ELISA en fase sólida. Para determinar el título de Igs totales anti-VFA, se pega un anticuerpo de captura policlonal anti-VFA O1/Campos a una placa de ELISA. Al día siguiente, la placa es incubada con VFA purificado serotipo O1/Campos y luego de varios lavados, se enfrenta a diluciones seriadas de cada muestra. Por último se coloca un suero contra inmunoglobulinas de ratón conjugado con peroxidasa y se revela utilizando como sustrato ABTS / H_2O_2.

Se sensibilizaron placas de 96 pocillos para ELISA (Greiner bio one) con 50 µl de una dilución apropiada (1/100) de anticuerpo de captura policlonal anti-VFA O1/Campos en buffer carbonato/bicarbonato pH 9,6. Luego de una incubación ON a 4ºC, la placa se lavó 5 veces con PBS Tween-20 0,05 % y se agregó a cada pocillo 50 µl de antígeno O1/Campos inactivado en dilución adecuada (1/4). Se incubó 1 h a 37ºC, y luego la microplaca se lavó 5 veces adicionales con PBS-Tween-20 0,05 %. Seguidamente se agregaron diluciones seriadas al medio de los sueros correspondientes en solución dilución (50 µl/pocillo), incubando la placa por 1 h a 37ºC. Al término de esta incubación se realizaron 5 lavados con PBS Tween-20 0,05

% y 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. Luego de los lavados se reveló utilizando como sustrato ABTS / H_2O_2. El punto de corte se calculó como dos veces la absorbancia del suero proveniente de los ratones inmunizados con Ad-GFP o HSV-GFP y el título de cada suero como la inversa de la ultima dilución igual o mayor a la del punto de corte.

3.20.2. Determinación del isotipo (IgG1 o IgG2a) de los anticuerpos anti-VFA

Se siguió el mismo protocolo que en el punto anterior, pero luego de la incubación con los sueros muestra, las placas se incubaron con anticuerpos anti IgG1 o IgG2a de ratón biotinilados (0,5 mg/ml, BD Pharmingen^{TM}), diluidos 1/1000 por 1h a 37ºC. Luego de los lavados, se incubó con un anticuerpo anti Igs de ratón conjugado a avidina- peroxidasa (BD Pharmingen^{TM}), diluido 1/1000 también 1h a 37ºC y se reveló siguiendo el procedimiento anterior (Ver ítem **3.20.1**).

3.20.3. ELISA de avidez

Se procedió igual que en el ítem 3.20.1, excepto que luego de la incubación con los sueros muestra se hicieron 2 lavados con PBS Tween-20 0,05 %, seguido de uno con concentraciones crecientes de urea (1M a 7M) de 15 min a TA y finalmente 2 con PBS Tween-20 0,05 %. Luego se continuó con el protocolo estándar.

3.20.4. Ensayo de seroneutralización

Sueros de ratones obtenidos pre-desafío fueron inactivados por calor durante 30 min a 56ºC, y diluidos en forma seriada. Las diluciones fueron mezcladas con 10^4 $DICT_{50}$ del VFA O1/Campos, en igual volumen. Luego de incubar 1 h a 37ºC, las mezclas fueron transferidas a monocapas de células BHK-21 crecidas en placas de 96 pocillos e incubadas a 37ºC en estufa con 5 % de CO_2 hasta aparición de ECP. Se determinó el título del punto de corte como la recíproca de la más alta dilución de suero necesario para neutralizar 10^4 $DICT_{50}$ del VFA en el 50 % de los pocillos.

3.20.5. Detección de células secretoras de anticuerpos (ASC) específicos del VFA a partir de células de bazo de ratón por ELISPOT

En una placa de 96 pocillos Mµltiscreen HA (Millipore) se pegó antígeno purificado (VFA inactivado), diluido en PBS estéril en una concentración final de 40 µg/ml. Luego de una incubación ON a 4ºC, se lavó 3 veces con PBS y se bloqueó con

leche descremada 4% en PBS durante 2 hs a TA. Seguidamente se lavó la placa 5 veces con PBS y se dispusieron las células de bazo obtenidas de los ratones inmunizados (Ver ítem 19.3) en 3 diluciones (1.10^6, 5.10^5 y $2{,}5.10^5$ células / pocillo) en medio RPMI 10% SFB. Se incubó ON a 37ºC en estufa con 4% de CO_2. Se lavó una vez con agua destilada y 4 veces con PBS. Luego se incubó con un anticuerpo anti Igs de ratón conjugado a peroxidasa diluido 1/1000 en PBS. Se incubó 1 h a RT y luego de lavar 5 veces con PBS se reveló con una solución de 3,3'diaminobencidina (DAB, Sigma) en PBS y H_2O_2. Se incubó a TA en un lugar oscuro por 10 min. Se lavó 2 veces con agua destilada para inhibir la reacción y se dejó la placa en un lugar oscuro hasta el día siguiente. Se contaron los spots (ASC específicos del VFA) una vez que el fondo del pocillo estuviera seco.

3.21. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

3.21.1. Detección de citoquinas por RT-PCR semicuantitativa

A partir de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados, se plaquearon 3,3 $x10^7$ células por pocillo en una microplaca de 6 wells por triplicado. Estas fueron estimuladas con una concentración final de 40 µg/ml de antígeno O1/Campos purificado, con 2,5 µg/ml de Concanavalina A (Con-A), o con medio RPMI 10% SFB e incubadas ON a 37ºC en estufa con 4% de CO_2. El ARN total fue extraído de las células con Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y el ADNc fue sintetizado utilizando los oligonucleótidos específicos de cada citoquina (IFNγ, IL-4 y IL-2) y de GAPDH de orientación reversa (Tabla 4). Para las reacciones de amplificación, se utilizaron los oligonucleótidos, forward y reverse (Tabla 4), y 2.5 unidades de ADN polimerasa de Thermus aquaticus (Taq polimerasa, UNQ) y se realizaron 20 ciclos de desnaturalización / hibridación / extensión. La temperatura de extensión se realizó a 72℃. Luego, se analizaron los productos obtenidos en geles de agarosa 1 % en buffer Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM. La intensidad de las bandas fue analizada con el programa ImageJ.

Teniendo en cuenta los datos de las bandas provenientes de la amplificación de GAPDH, se compararon las intensidades de los demás productos de PCR.

3.21.2. Ensayo de linfoproliferación

Estos ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos fondo plano, utilizando una concentración de 1.10^6 células por pocillo, provenientes de los bazos de los

ratones inmunizados (ítem 3.19.2). Los esplenocitos se estimularon con 40 µg/ml de antígeno O1/Campos purificado y con Con-A (2.5 µg / pocillo). Como control negativo, se emplearon esplenocitos incubados con medio solo (control de estimulaciones). Todas las incubaciones se realizaron a 37℃ en presencia de 5% de CO_2, por triplicado y en un volumen final de 100 µl. Las células se incubaron durante 2 días y se marcaron durante 18 horas con 1 µCi / pocillo de timidina tritiada ($[H]^3$). La incorporación del radioactivo a las células se midió, empleando un contador de centelleo (Microbeta counter Becton Dickinson). Los resultados se expresan como índices de estimulación (IE) (cpm cultivos estimulados / cpm del control sin antígeno). Los datos presentados a lo largo de esta Tesis son, en todos los casos, el resultado de la media geométrica de los triplicados realizados.

3.22. ENSAYOS DE DESAFÍO CON VIRUS VIVO

3.22.1. Desafío y estudio de viremia

Grupos de 4 ratones vacunados con las diferentes formulaciones, fueron desafiados con virus vivo O1/Campos en instalaciones con Bioseguridad NBS 3A, en INTA Castelar. Los ratones vacunados fueron inoculados ip con 10^4 $DICT_{50}$ del VFA serotipo O, cepa O1/Campos. Luego de 24 h, los animales fueron anestesiados y sangrados. La sangre heparinizada fue diluida en medio de cultivo y agregadas a monocapas de células BHK-21 crecidas en placas de 96 pocillos por cuadruplicado. Las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS y se añadió medio fresco D-MEM 2% SFB. Las células fueron mantenidas por otras 48 h a 37ºC en estufa con 5 % de CO_2. Los animales fueron considerados completamente protegidos cuando la monocapa no presentó ECP luego de un segundo pasaje ciego (viremia no detectada). Los sueros con viremia positiva fueron titulados para su cuantificación (evaluación de la reducción de la viremia).

3.23. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS version 17.0 (Chicago, IL, USA). Se comparó la respuesta inmune inducida por los distintos grupos usando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por el test Mann-Whitney. Los valores de p menores a 0,05 fueron considerados significativos.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	**secuencia 5'- 3'**	**Corte para ER** (subrayado)	**Codón ATG** (Mayúscula)	**Secuencia Kosac** (negrita)	**Codón STOP** (cursiva)
P12Af	aggcct**g**cc**a**ccATG**g**gggctggacaatcca	Stu I	si	si	-
P12Arev	aagcttctagtaccagggtttggcc	Hind III	-	-	-
3Cf	ggtaggcctaatcaacccctcgtggtgtg	Hind III	-	-	-
3Crev	aagaagcttgctaagaacctgattgtc	Stu I	-	-	si
GFPf	ggatccATGagtaaaggagaagaa	BamH I	si	-	-
GFPr	cccgggttatttgtatagttcatccat	Sma I	-	-	si
P12As	agatctATGggggctggacaatcc	Bgl II	si	-	-
3Cr_Cla	atcgatttactcgtggtgtggttc	Cla I	-	-	si
VP1f	agatct**g**ccATGaccacttctgcgggcg	Bgl II	si	-	-
VP1r	agatcttcaaaattcaaagtctgtt	Bgl II	-	-	si
VP3f	ggatccATG**g**gaatattccccgtggc	BamH I	si	-	-
VP3r	gaattcttaccgcacgggcgtccac	EcoR I	-	-	si
IFNγ F	cattgaaagcctagaaag	-	-	-	-
IFNγ R	gaaatgcatccttttcg	-	-	-	-
IL-4f	gccatatccacggatgcg	-	-	-	-
IL-4r	tgcagcttatcgatgaatcc	-	-	-	-
IL-2f	tccacttgaagctctacag	-	-	-	-
IL-2r	gagtgaaatccagaacatgcc	-	-	-	-
GAPDHf	ggcacagtcaaggctgagaac	-	-	-	-
GAPDHr	catactcggcaccagcatca	-	-	-	-
SP1f	ggcggtcctagattggtgcg	-	-	-	-

Tabla 4. Descripción de los plásmidos generados en este trabajo

Plásmidos	Descripción
pG_P12A	Vector pGEMT-easy conteniendo el fragmento de 2,5 Kb que codifica para el cassette de expresión P12A del VFA.
pG_3C	Vector pGEMT-easy conteniendo el fragmento de 0,7 Kb que codifica para el cassette de expresión 3C del VFA.
pG_P12A3C	Vector pGEMT-easy conteniendo el fragmento de 3,2 Kb que codifica para el cassette de expresión P12A 3C del VFA.
pB_P12A3C	Vector pBBr- 2 conteniendo el fragmento de 3,2 Kb que codifica para el cassette de expresión P12A3C del VFA.
pG_VP1	Vector pGEMT-easy conteniendo el fragmento de 0,7 Kb que codifica para la proteína VP1 del VFA.
pSFV-VP1	Vector pSFV-1 conteniendo el fragmento de 0,7 Kb que codifica para la proteína VP1 del VFA.
pSFV-P12A3C	Vector pSFV-1 conteniendo el fragmento de 3,2 Kb que codifica para el cassette de expresión P12A3C del VFA.
pRIBOTEC-GFP	Vector pRIBOTEC conteniendo el fragmento de 0,8 Kb que codifica para la proteína GFP.
pG_GFP	Vector pGEMT-easy conteniendo el fragmento de 0,8 Kb que codifica para la proteína GFP.
pSFV-GFP	Vector pSFV-1 conteniendo el fragmento de 0,8 Kb que codifica para la proteína GFP.
pCI-P12A3C	Vector pCI-neo conteniendo el fragmento de 3,2 Kb que codifica para el cassette de expresión P12A3C del VFA.
pENTR-P12A3C	Vector de entrada del sistema de adenovirus conteniendo el fragmento de 3,2 Kb que codifica para el cassette de expresión P12A3C del VFA.
pENTR-GFP	Vector de entrada del sistema de adenovirus conteniendo el fragmento de 0,8 Kb que codifica para la proteína GFP.
pAd-P12A3C	Vector de expresión adenoviral (ΔE1) conteniendo el fragmento de 3,2 Kb que codifica para el cassette de expresión P12A3C del VFA.
pAd-GFP	Vector de expresión adenoviral (ΔE1) conteniendo el fragmento de 0,8 Kb que codifica para la proteína GFP.
pHSV-P12A3C	Plásmido amplicón HSV-1 conteniendo el fragmento de 3,2 Kb que codifica para el cassette de expresión P12A3C del VFA.
pHSV-GFP	Plásmido amplicón HSV-1 conteniendo el fragmento de 0,8 Kb que codifica para la proteína GFP.
fHSVΔpacΔICP27	Bácmido conteniendo el genoma de herpes excepto la señal de empaquetamiento y el gen del regulador transcripcional, ICP27 (Saeki et al, 1998).
pEBH-ICP27	Vector pCEP4 conteniendo la secuencia completa del gen herpético ICP27 con su propio promotor y señal de poliadenilación (Chiocca et al, 2001).
pGEX-VP1	Vector de expresión pGEX2λT conteniendo el fragmento de 0,7 Kb que codifica para la proteína VP1 del VFA.
pG_VP3	Vector pGEMT-easy conteniendo el fragmento de 0,8 Kb que codifica para la proteína VP3 del VFA.
pGEX-VP3	Vector de expresión pGEX2λT conteniendo el fragmento de 0,8 Kb que codifica para la proteína VP3 del VFA.
pGEX-3C	Vector de expresión pGEX2λT conteniendo el fragmento de 0,7 Kb que codifica para la proteína 3C del VFA.
pGEX-GFP	Vector de expresión pGEX2λT conteniendo el fragmento de 0,8 Kb que codifica para la proteína GFP.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Los principales resultados de este trabajo de tesis están divididos en dos capítulos, en beneficio de la claridad de la presentación.

En el primer capítulo se presentan y evalúan diferentes prototipos vacunales, que expresan in situ las proteínas de la cápside del VFA del serotipo O, cepa O1/Campos. Esto incluye vacunas génicas derivadas del virus Semliki Forest y del vector pCI-neo (Sección A) e inmunogénos basados en partículas virales no replicativas, derivadas de Herpesvirus y Adenovirus (Sección B).

En el segundo capítulo se estudia la respuesta inmune humoral y celular inducida por las distintas plataformas vacunales en el modelo murino. En primer lugar se determinan las condiciones de inmunización y se caracteriza cada prototipo vacunal individualmente (Sección C) y luego se estudia la respuesta inmune inducida por los mismos candidatos vacunales en regímenes de inmunización de tipo prime-and-boost homólogo y heterólogo (Sección D).

Capítulo I

"Desarrollo y caracterización de distintos candidatos vacunales que expresan in situ subunidades proteicas del VFA del serotipo O, cepa O1/Campos"

Sección A- VACUNAS GÉNICAS QUE EXPRESAN SEGMENTOS GENÓMICOS DEL VFA

4.1. VECTORES DERIVADOS DEL VIRUS SEMLIKI FOREST (SFV)

4.1.1. Puesta a punto de las condiciones de transfección y estudio de la expresión de las proteínas heterólogas en el sistema SFV

Se construyeron los replicones listados en la Tabla 5 de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos (M y M).

Tabla 5. Replicones derivados del virus Semliki Forest

Nombre del Replicón	Gen heterólogo que expresa
pSFV-P12A3C	Proteínas VP1; VP3; precursor VP0, 2A y la proteasa 3C
pSFV-VP1	Proteína estructural VP1
pSFV-GFP	Proteína verde fluorescente (GFP)

Para evaluar la capacidad de los replicones, pSFV-P12A3C o pSFV-VP1, de dirigir la expresión de las proteínas del VFA en células eucariotas, se determinaron, en primer lugar, las condiciones óptimas de transfección utilizando el vector pSFV-GFP.

Para cumplir tal objetivo, se transfectaron células BSR con distintas concentraciones de ADN del vector y volúmenes de Lipofectamina (Tabla 6). A las 48 horas post transfección (hpt) se determinó por microscopía de fluorescencia el número de células por campo que expresaron in situ la proteína GFP para cada condición estudiada. Como se muestra en la Tabla 6, el número promedio de células verdes aumentó en forma proporcional a la cantidad de ADN utilizado, llegando a un número máximo con 10 μg de ADN. Sucesivos incrementos en la cantidad de vector no provocaron cambios en el número de células que expresaban GFP.

Tabla 6. Puesta a punto de las condiciones de transfección de células eucariotas con el vector pSFV-GFP

Cantidad de ADN (μg)	Volumen de Lipofectamina (μl)	# promedio células verdes / campo (1)
2	5	1 - 2
5	10	4 - 5
10	20	10 - 15
20	20	10 - 15

(1) Corresponde al número promedio de células fluorescentes de un total de 10 campos seleccionados al azar.

En la Figura 4.1, parte A, se muestran imágenes tomadas a las 48 hpt, de células tratadas solo con lipofectamina (CL), de células transfectadas con el vector SFV vacío (pSFV-1) y de células transfectadas con el vector pSFV-GFP. En estas últimas se puede observar la expresión de la proteína GFP.

Además, la expresión de esta proteína se analizó por WB utilizando un suero que detecta específicamente la proteína GFP (α-GFP). Como se observa en la Figura 4.1, parte B, sólo en la calle donde se sembró el lisado proveniente de células transfectadas con pSFV-GFP (calle pSFV-GFP), se detectó una banda de un peso molecular aproximado de 28 KDa, correspondiente a la proteína GFP. Esta banda no se observó ni en el control con lipofectamina (calle CL) ni en las células transfectadas con el vector vacío (calle pSFV-1).

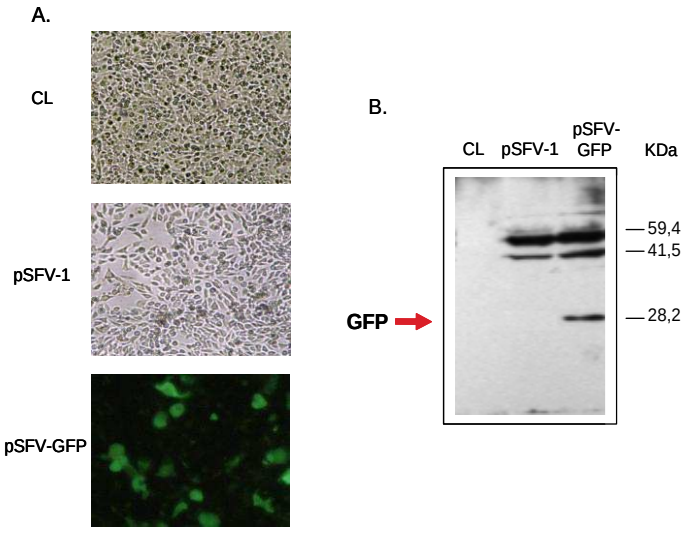


Figura 4.1. Expresión de la proteína GFP en células BSR. (A) Células observadas al microscopio en campo claro y con fluorescencia a las 48 hpt (Aumento 40x). (B) WB de lisados celulares revelado con un suero α-GFP. CL: Células tratadas solo con Lipofectamina; pSFV-1: Células transfectadas con pSFV-1 vacío; pSFV-GFP: células transfectadas con pSFV-GFP.

En base a estos resultados, los siguientes experimentos se realizaron transfectando monocapas de células BSR crecidas en pocillos de 9,62 cm^2 con 10 μg de ADN plasmídico y 20 μl de lipofectamina.

Posteriormente, con el fin de evaluar la expresión de las proteínas estructurales VP1 y VP3, y de la proteasa 3C del VFA, células BSR fueron transfectadas con las construcciones pSFV-P12A3C y pSFV-VP1 empleando las condiciones determinadas anteriormente. Como control, se realizaron transfecciones adicionales con los plásmidos pSFV-GFP y pSFV-1. Luego de una incubación de 48 h, las monocapas celulares fueron lisadas y analizadas mediante WB utilizando un suero que detecta específicamente a la proteína VP1 (α-VP1) y el suero α-GFP.

Como puede observarse en la Figura 4.2, panel A, la proteína VP1 fue detectada en la calle donde se incluyó una alícuota de virus O1/Campos inactivado (línea V), pero no pudo ser detectada en los lisados obtenidos a partir de células transfectadas con pSFV-P12A3C o pSFV-VP1 (líneas 3 y 4). Tampoco en los lisados provenientes de células transfectadas con pSFV-GFP y pSFV-1 (líneas 1 y 2).

Experimentos de WB utilizando diferentes anticuerpos (α-VP3, α-3C, α-VFA completo) arrojaron también resultados negativos (datos no mostrados).

Cuando se analizaron los mismos lisados con el anticuerpo α-GFP, sólo se observó expresión de la proteína GFP en las células transfectadas con pSFV-GFP (Figura 4.2, panel B, línea 2), como era esperable.

Como control de carga del gel se detectó en paralelo una proteína celular (actina) utilizando un anticuerpo específico (Figura 4.2, panel C).

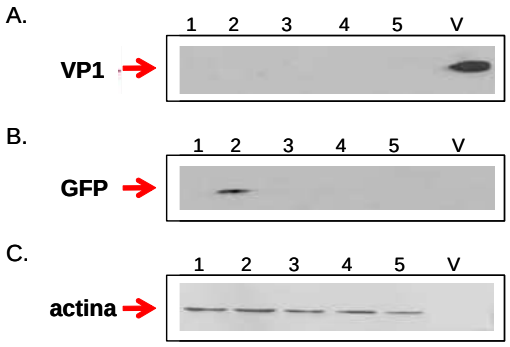


Figura 4.2. Análisis de la expresión de las proteínas del VFA por WB. Células BSR fueron transfectadas con las distintas construcciones y a las 48 hpt se analizó la expresión de las proteínas por WB utilizando (A): anticuerpo α-VP1; (B) α-GFP; (C) α-actina. Calle 1: pSFV-1 vacío; 2: pSFV–GFP; 3: pSFV-VP1; 4: pSFV–P12A3C; 5: Control de lipofectamina, V: Virus O1/Campos inactivado.

4.1.2. Análisis de la replicación de los vectores pSFV-VP1 y pSFV-GFP

En base a los resultados negativos obtenidos, se decidió investigar si la falta de expresión de las proteínas del VFA en células BSR se debía a un defecto en la replicación y/o transcripción de los replicones luego de la transfección.

Como muestra el esquema de la Figura 4.3, en el sistema de células transfectadas con SFV, la primer ronda de transcripción es realizada por la ARN polimerasa II celular que reconoce el promotor CMV y sintetiza el ARN genómico. A partir de éste se traduce la replicasa viral, la cual es responsable de la replicación del ARN viral (síntesis de más copias de ARN genómico y de ARN anti-genómico). Utilizando el ARN anti-genómico como templado, la replicasa sintetiza el ARN sub-genómico, por reconocimiento del promotor 26S. Es a partir de este último, que se produce la traducción de las proteínas heterólogas presentes en el vector.

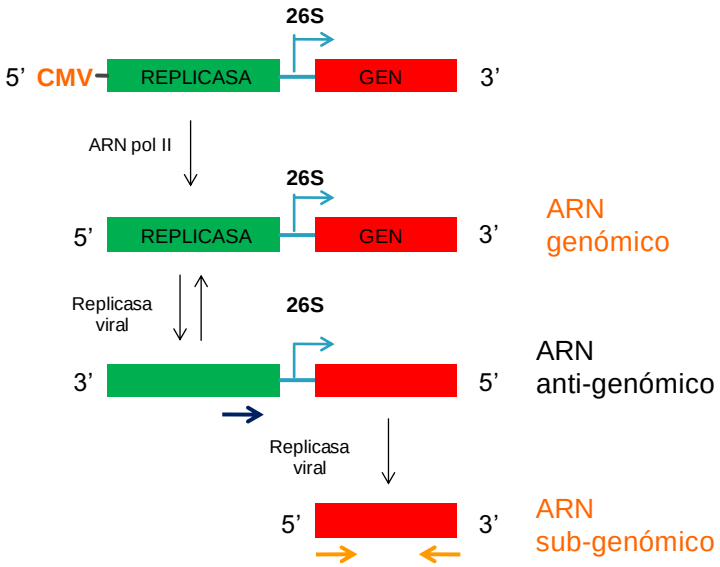


Figura 4.3. **Representación esquemática de la replicación del vector pSFV-1 en células eucariotas.** CMV: Promotor derivado de Citomegalovirus. 26S: Promotor sub-genómico dependiente de la replicasa de SFV. La flecha de color azul simboliza el oligonucleótido utilizado para el análisis de la síntesis del ARN anti-genómico y las flechas de color naranja indican los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada gen heterólogo.

Para analizar la síntesis de ARN anti-genómico, células BSR fueron transfectadas con los plásmidos pSFV-VP1 y pSFV-GFP y a las 24 hpt se extrajo el ARN total para realizar ensayos de retrotranscripción seguidos de PCR (RT-PCR). Para la síntesis del ADNc se utilizó el oligonucleótido SP1f (5’ ggcggtcctagattggtgcg 3’ representado con una flecha azul en la Figura 4.3) que permite amplificar sólo el anti-

genoma. Luego, para la reacción de PCR se utilizaron los primers específicos para cada gen (VP1 o GFP, representado con flechas de color naranja en la Figura 4.3).

Como se observa en la Figura 4.4, los niveles de acumulación del anti-genoma presente en las células transfectadas con pSFV-VP1 se encontraron notoriamente reducidos respecto al nivel encontrado en las células transfectadas con pSFV-GFP.

En los controles de células sin transfectar, como era de esperar, no se detectó amplificación del anti-genoma específico de VP1 (CC-VP1), ni de GFP (CC-GFP).

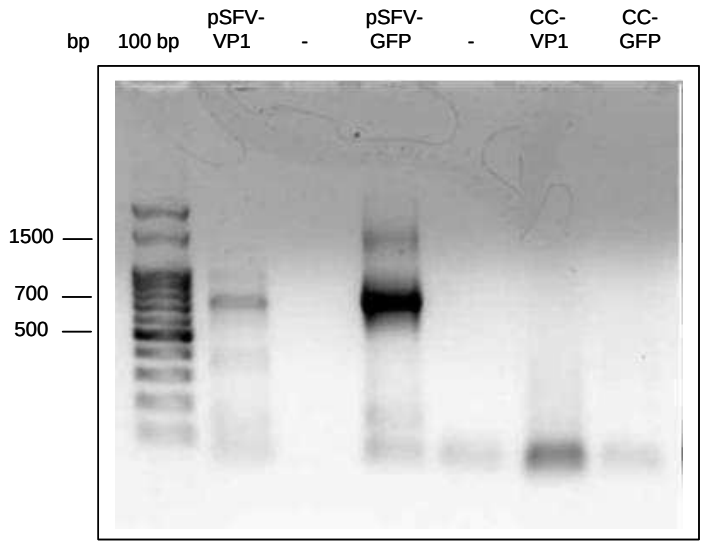


Figura 4.4. Detección del ARN anti-genómico de SFV en células transfectadas con pSFV-VP1 o pSFV-GFP. Células BSR fueron transfectadas con las construcciones pSFV-VP1 y pSFV-GFP y a las 24 hpt se extrajo el ARN total y se analizó por RT-PCR los niveles de ARN anti-genómico sintetizado. Calles: (-): Control de PCR sin templado. (CC-VP1): PCR con el ADNc obtenido de células sin transfectar y con los primers específicos de VP1. (CC-GFP): PCR con el ADNc obtenido de células sin transfectar y con los primers específicos de GFP. 100 bp: Marcador de peso molecular.

Debido a que la síntesis del ARN genómico, anti-genómico y sub-genómico de SFV depende de la expresión y actividad del complejo de la polimerasa viral, se decidió determinar si la disminución en los niveles de ARN anti-genómico se debía a un defecto en esta enzima.

Para comprobar esta hipótesis, se transfectaron células BSR con las distintas construcciones y a las 48 hpt se determinó por WB la expresión de la subunidad nsP1 de la polimerasa de SFV-1 empleando un suero específico α-nsp1, facilitado por el Dr. Andrés Merits, de la Universidad de Estonia.

Los resultados mostraron que la subunidad nsP1 de la polimerasa del virus Semliki Forest sólo se expresa en células transfectadas con el vector vacío o pSFV-

GFP (Figura 4.5, panel A, líneas 1 y 2). En cambio, no fue posible detectar nsP1 en ninguno de los lisados obtenidos a partir de células transfectadas con los plásmidos que contenían secuencias del VFA, pSFV-P12A3C y pSFV-VP1 (Figura 4.5, panel A, líneas 3 y 4, respectivamente).

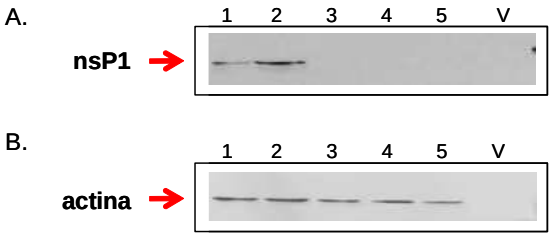


Figura 4.5. Detección de la subunidad nsP1 de la polimerasa viral de SFV por WB. Células BSR fueron transfectadas con las distintas construcciones y a las 48 hpt se analizó la expresión de nsP1 por WB utilizando: (A) α–nsP1; (B) α–actina. Calles: 1: pSFV vacío; 2: pSFV–GFP; 3: pSFV-VP1; 4: pSFV–P12A3C; 5: Control de lipofectamina; V: virus O1/Campos inactivado.

La disminución en la síntesis de ARN anti-genómico junto con la ausencia de expresión de por lo menos una subunidad de la replicasa de SFV, específicamente en todos los vectores que contenían secuencias del VFA, sugiere la existencia de algún tipo de interferencia en la replicación de estos vectores que no se pudo determinar.

Por este motivo, se decidió no continuar el trabajo con las construcciones realizadas en este vector.

4.2. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN EL VECTOR pCI

De acuerdo a lo descripto en M y M, se obtuvo el vector pCI-P12A3C, el cual codifica para el mismo cassette de expresión P12A3C que el vector pSFV-P12A3C. A continuación se evaluó la expresión de las proteínas estructurales por medio de experimentos de WB e Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

4.2.1. Análisis de la expresión de las proteínas VP1 y VP3 en células eucariotas transfectadas con el pCI-P12A3C

Con el fin de determinar si el vector pCI-P12A3C era capaz de dirigir la expresión de las proteínas estructurales VP1 y VP3 del VFA, monocapas de células BSR se infectaron con el Virus Vaccinia (Vtf7-3) y posteriormente se transfectaron con el vector pCI-P12A3C. A las 48 hpt los extractos celulares totales se analizaron por WB, incubando la membrana con un suero α-VP1 o α-VP3. Como muestra la

Figura 4.6, en el lisado obtenido a partir de células transfectadas con pCI-P12A3C se detectó la presencia de las proteínas estructurales VP1 y VP3 del VFA (paneles A y B, respectivamente, línea pCI-P12A3C), ausentes en los controles de células sin transfectar (línea CL). Ambas proteínas fueron reconocidas por antisueros específicos y presentaron un peso molecular adecuado.

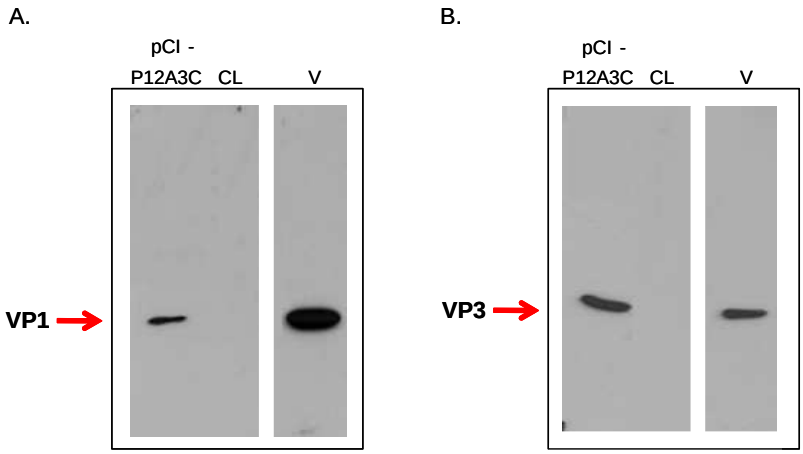


Figura 4.6. **Expresión de las proteínas VP1 y VP3 en células eucariotas transfectadas con el plásmido pCI-P12A3C.** Se infectaron células BSR con Vtf7-3 y luego de 1 hora de adsorción se transfectaron con pCI-P12A3C. A las 48 hpt se lisaron las células y se analizaron por WB revelando: (A) con un suero α-VP1; (B) con un suero α-VP3. Calles: pCI-P12A3C: Células infectadas y transfectadas con pCI-P12A3C; CL: células infectadas y tratadas solo con lipofectamina; V: virus O1/Campos inactivado.

La expresión de VP1 fue corroborada también mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para tal fin, células BSR fueron infectadas con Vtf7-3 y transfectadas con el plásmido pCI-P12A3C y luego de 48 h fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un suero α-VP1. La observación de los preparados reveló una distribución homogénea de VP1 en el citoplasma celular (Figura 4.7, panel A), mientras que en el control de células sin transfectar no se observó fluorescencia específica (panel B).

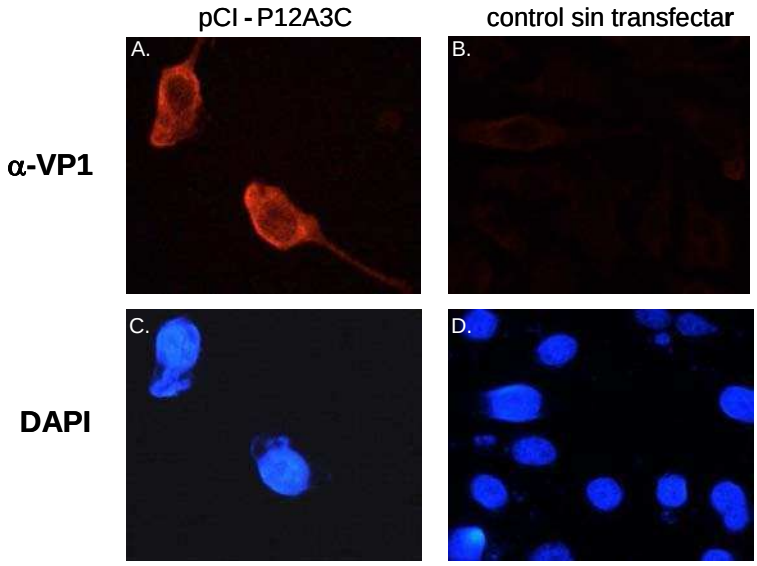


Figura 4.7. Detección de la proteína VP1 en células eucariotas transfectadas con el pCI-P12A3C por IFI. Células BSR fueron infectadas con Vtf7-3 y transfectadas con pCI-P12A3C. A las 48 hpt, las células se fijaron y se hizo una IFI con un suero α-VP1 (paneles A y B).Además se tiñeron los núcleos con DAPI (paneles C y D).

A partir de estos experimentos se puede concluir que a partir del vector pCI se logró expresar la poliproteína P1 la cual fue procesada correctamente por la proteasa 3C, ya que se pudieron detectar al menos las proteínas estructurales VP1 y VP3 del VFA. Además, la no detección del precursor P12A en los WB, sugiere que el procesamiento de la misma por parte de 3C ocurre de manera eficiente.

Sección B - OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES NO REPLICATIVAS QUE EXPRESAN SUBUNIDADES DEL VFA

4.3. VECTORES VIRALES DERIVADOS DE ADENOVIRUS

4.3.1. Generación de Adenovirus recombinantes

Se generaron partículas de Adenovirus (Ad) recombinantes como vector de expresión de las proteínas estructurales VP1, VP0 y VP3, de la proteína 2A y de la proteasa 3C del VFA (Ad-P12A3C), así como también del gen reportero GFP (Ad-GFP) utilizando el sistema ViraPower^{TM} Adenoviral Gateway® Expression Kit de Invitrogen (M y M).

En la Figura 4.8, paneles A y B, se muestran dos imágenes del efecto citopático (ECP) producido, a los 8 días post transfección (dpt), por las partículas de Ad generadas, como consecuencia de la replicación del vector dentro de una línea celular permisiva, y la sub-siguiente infección de células vecinas. En el caso de Ad-GFP, también se muestra la expresión de GFP al microscopio con fluorescencia (panel B). En cambio, en el control de células sin transfectar no se observó ECP dentro del lapso de tiempo estudiado.

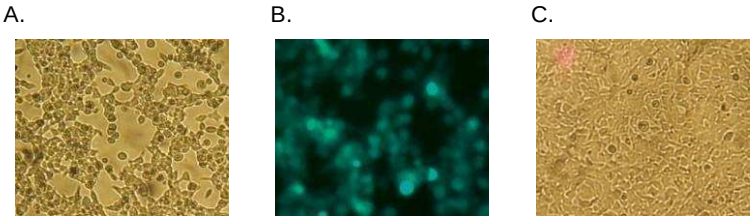


Figura 4.8. Efecto citopático en células HEK293A transfectadas con los vectores de adenovirus recombinantes. Células HEK293A fueron transfectadas con pAd-P12A3C (panel A), con pAd-GFP (panel B) o sin transfectar (panel C). A los 8 dpt se observaron al microscopio y se tomaron fotografías en campo claro o fluorescencia (Ad-GFP). Aumento 10x.

Luego de varios pasajes de amplificación, y de purificación por colchón de sacarosa, se obtuvieron los bancos de Ad-P12A3C y Ad-GFP, los que fueron titulados por medio de un ensayo de formación de playas de lisis. En ambos casos se alcanzaron títulos de alrededor de 1.10^{10} UFP/ml.

4.3.2. Estudio de la expresión de las proteínas estructurales VP1 y VP3 y de la proteasa 3C del VFA

Para evaluar si las partículas de adenovirus recombinante, Ad-P12A3C, eran capaces de expresar las proteínas estructurales del VFA, se infectaron células HEK293A, a una MOI de 5. Como control también se infectaron células con el Ad-GFP. La expresión de las proteínas heterólogas, luego de 48 horas de incubación, fue analizada por WB utilizando sueros específicos α-GFP, α-VP1, α-VP3 y α-3C.

Como puede observarse en la Figura 4.9, panel A, la proteína GFP fue detectada específicamente en el lisado proveniente de células infectadas con Ad-GFP (línea Ad-GFP).

El análisis de los lisados provenientes de células infectadas con Ad-P12A3C, permitió evidenciar niveles de expresión comparables de VP3, VP1 y 3C (Figura 4.9, paneles B, C y D, línea Ad-P12A3C). La especificidad de todos los ensayos fue confirmada por el hecho de que ninguna de las proteínas fue detectada en los controles de células sin infectar (Línea CC).

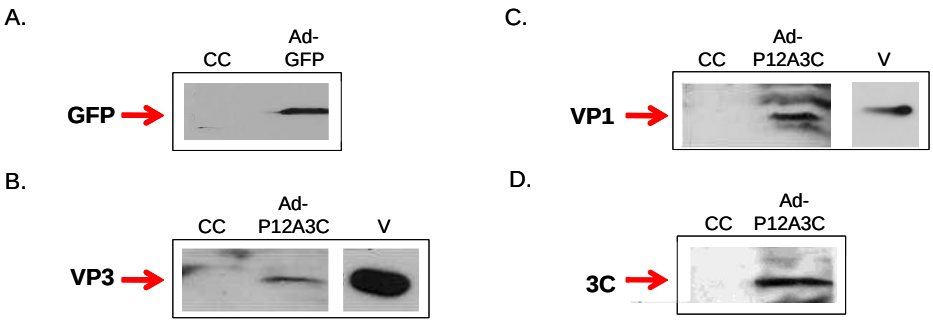


Figura 4.9. Análisis de la expresión de las proteínas estructurales VP1 y VP3 y de la proteasa 3C del VFA y de GFP por WB. Lisados de células HEK293A infectadas con Ad-GFP o Ad-P12A3C a una MOI de 5, fueron cosechadas a las 48 h y analizadas por WB utilizando: (A) un suero α–GFP; (B) α–VP3; (C), α–VP1 y (D) α–3C. CC: Células sin infectar. V: virus O1/Campos inactivado.

Se concluye entonces, que con este sistema de expresión, la poliproteína P1 es expresada y procesada correctamente por la proteasa 3C generando las proteínas individuales de la cápside del VFA.

4.4. VECTORES AMPLICON DERIVADOS DE HERPESVIRUS (HSV-1)

Los vectores amplicón son partículas derivadas del Virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1), que en lugar del genoma viral llevan un plásmido denominado plásmido amplicón donde se inserta el transgen de interés.

Es un método novedoso que se utiliza por primera vez como delivery de proteínas del VFA, por lo que se realizará una descripción más detallada de este sistema de expresión.

4.4.1. Generación de los vectores amplicón

En el plásmido amplicón se clonó, al igual que en las construcciones anteriores, el fragmento P12A3C del VFA. Este plásmido amplicón lleva además del transgen de interés, el origen de replicación para HSV-1 y la señal de empaquetamiento de HSV-1. Posteriormente, para obtener los vectores amplicón, se co-transfectaron células permisivas Vero 2.2 (expresan constitutivamente el factor transcripcional ICP27) con un bácmido, el fHSVΔpacΔICP27, que contiene el genoma entero de herpes, con deleción del gen ICP27 y de la señal de empaquetamiento, junto con el plásmido amplicón y otro plásmido, el pEBH-ICP27, que al igual que las células Vero 2.2, contiene el gen esencial para la replicación ICP27.

Dentro de las células se va a producir la replicación y encapsidación solo del plásmido amplicón, ya que contiene el origen de replicación y la señal de empaquetamiento, generando finalmente el vector amplicón, HSV-P12A3C.

Se realizó en paralelo, el mismo procedimiento utilizando un plásmido amplicón vacío, que expresa solo GFP (HSV-GFP).

Para determinar el título viral resultante de los vectores amplicón generados, se infectaron células Vero 2.2 con HSV-P12A3C y HSV-GFP y se evaluó el número de células que expresan GFP para cada dilución ensayada, por microscopia de fluorescencia. Se obtuvieron títulos de alrededor de 5.10^5 UT/ml.

4.4.2. Estudio de la expresión de las proteínas estructurales VP1 y VP3 y de la proteasa 3C del VFA por WB e IFI

Para determinar la habilidad de los vectores amplicón de expresar y procesar la poliproteína P1, se infectaron células Vero 2.2 con el HSV-P12A3C a una MOI de 1

y se analizó la expresión de VP1, VP3 y 3C a las 6, 12 y 24 hpi, por WB. Como se observa en la Figura 4.10, paneles A y B, las proteínas VP1 y VP3 fueron detectadas desde las 6 hpi, y los niveles de expresión de las mismas fueron aumentando hasta las 24 hpi. Lo mismo ocurrió con la expresión de GFP (panel D). A pesar que la expresión de la proteasa 3C solo se pudo detectar claramente a las 24 hpi (panel C), es evidente que su actividad enzimática estuvo presente tempranamente, produciendo el correcto procesamiento de la poliproteína.

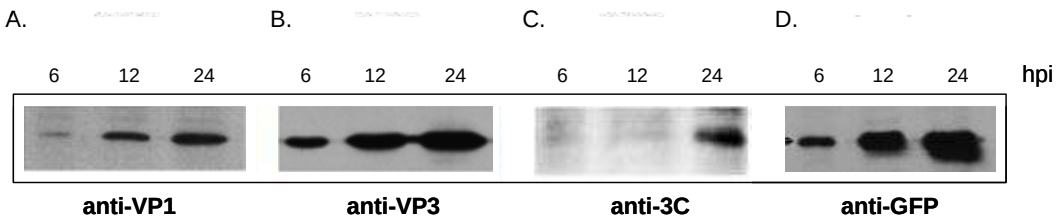


Figura 4.10. Expresión de las proteínas VP1, VP3 y 3C del VFA y GFP utilizando vectores amplicón herpéticos. Lisados de células Vero 2.2 infectadas con HSV-P12A3C fueron analizados por WB a las 6, 12 y 24 hpi, utilizando anticuerpos policlonales específicos, como se indica en cada panel.

Por otra parte, se analizó la expresión y localización de las proteínas estructurales, VP1 y VP3, por IFI y microscopía confocal. Células Vero 2.2 fueron infectadas con HSV-P12A3C o HSV-GFP a una MOI de 0,03 por 24 h.

Como se puede observar en la Figura 4.11, en todos los casos se observó la expresión de GFP, siendo menor la intensidad de la fluorescencia en las células infectadas con HSV-P12A3C comparada al de las células infectadas con HSV-GFP (Figura 4.11, paneles A y B, G y H). Esto se debe, posiblemente, a que la distancia entre el promotor 1E 4/5 del vector amplicón y el cistrón codificante de GFP es mayor en la construcción HSV-P12A3C, debido a la presencia del transgen.

Por otro lado, sólo en las células infectadas con HSV-P12A3C se observó expresión de las proteínas VP1 (paneles C y D) y VP3 (paneles I y J), las cuales presentaron una distribución homogénea en el citoplasma celular formando pequeños cúmulos o agregados de proteína.

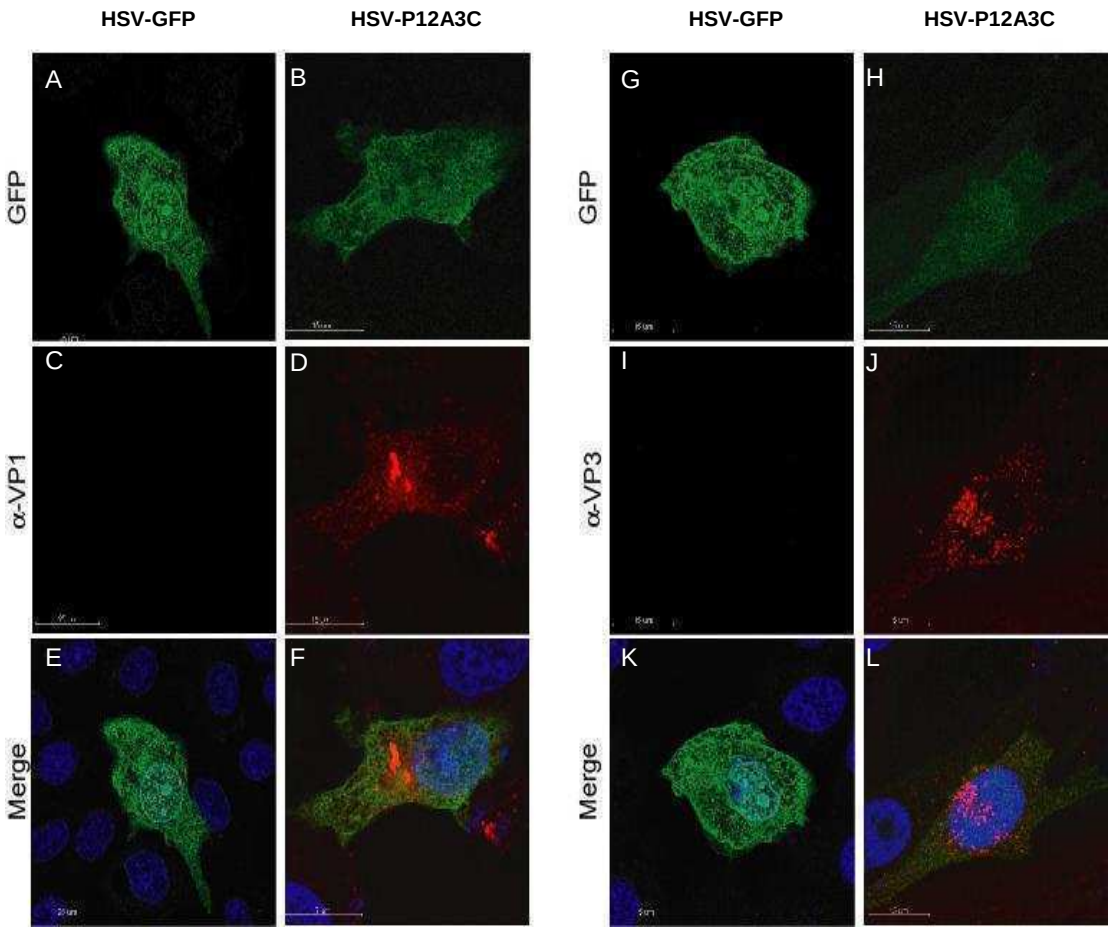


Figura 4.11. Microscopía confocal de células Vero 2.2 infectadas con los vectores amplicón HSV-P12A3C y HSV-GFP. Células Vero 2.2 fueron infectadas con HSV-P12A3C o HSV-GFP y a las 24 hpi la monocapa fue fijada, permeabilizada, y revelada con antisueros α-VP1 o α–VP3. El ADN celular fue visualizado por tinción con DAPI. Las células fueron observadas por microscopía confocal y las imágenes fueron analizadas y procesadas utilizando un software específico.

En conclusión, con este sistema de vectores amplicón, libres de virus colaborador (helper free), también se pudo observar, por WB e inmunofluorescencia la presencia de VP1, VP3 y 3C en extractos celulares totales. Es decir, que con este sistema también, la poliproteína P1 fue procesada correctamente por la proteasa 3C generando las proteínas individuales de la cápside del VFA.

4.4.3. Análisis de la interacción de las proteínas estructurales in vivo

Para estudiar si las proteínas estructurales producidas por los vectores amplicón son capaces de asociarse entre sí, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación (IP) seguido de WB. Lisados provenientes de células infectadas con HSV-P12A3C, fueron primero inmunoprecipitados, por separado, con dos anticuerpos monoclonales (mAbs): G8 y 8G, dirigidos específicamente contra la

proteína VP1 del VFA de las cepas O1/Caseros y O1/Campos respectivamente (Tabla 3 de M y M, (Seki et al., 2009) y luego analizados mediante WB con anticuerpos α-VP3; α–VP1 y α–VFA completo.

Como se observa en la Figura 4.12, e independientemente del mAbs utilizado, hubo co-inmunoprecipitación de VP1 con las proteínas VP3 y VP0 del VFA sugiriendo que estas tres proteínas se encuentran asociadas.

Como era de esperar, en los controles de células infectadas con HSV-GFP, no hubo inmunoprecipitación con ningún de los dos mAbs, y en consecuencia, no se detectó ninguna banda en el WB.

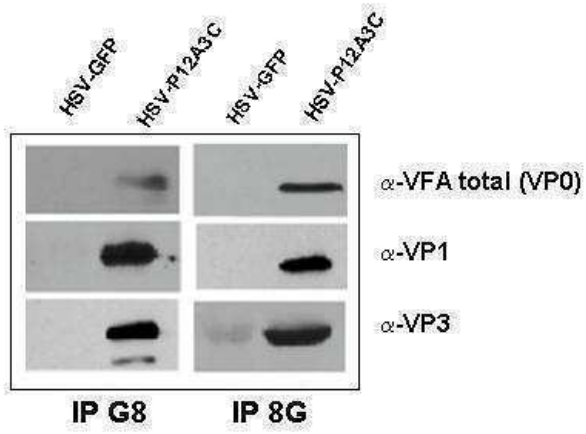


Figura 4.12. Asociación de las proteínas estructurales VP1, VP3 y VP0 del VFA producidas por el vector amplicón HSV-P12A3C. Lisados totales de células Vero 2.2 infectadas con HSV-P12A3C o HSV-GFP fueron inmunoprecipitados con mAbs específicos anti VP1 (G8 y 8G indicados al pie de cada calle) y separados por SDS-PAGE y analizados por WB utilizando sueros α–VFA, α–VP1 y α–VP3 (indicados a la derecha). IP: inmunoprecipitación.

4.4.4. Caracterización de las subunidades del VFA ensambladas en células infectadas con HSV-P12A3C

Para evaluar si las proteínas expresadas por los vectores amplicón son capaces de ensamblarse en estructuras macromoleculares, lisados de células infectadas con HSV-P12A3C fueron sometidos a un gradiente de sacarosa. Cada una de las alícuotas colectadas a lo largo del gradiente fue evaluada con un ELISA en fase sólida con el fin de identificar las subunidades del VFA presentes en cada caso. En paralelo, como control, se analizó una muestra de virus inactivado cepa A24/Cruzeiro. Esta cepa fue elegida como control, porque produce una cantidad detectable de cápsides vacías durante la infección, hecho que no ocurre en la infección natural con O1/Campos, y permite ubicar la zona 75S.

Como muestra la Figura 4.13, para la muestra de A24/Cruzeiro (línea de puntos) se obtuvo una fracción mayoritaria correspondiente a subunidades 140S (virus entero), seguido de una fracción de 75S (VLPs o cápsides vacías) y por último la fracción de 12S (capsómeros).

En el lisado proveniente de células infectadas con HSV-P12A3C (Figura 4.13; línea continua), se lograron identificar 3 componentes. Una fracción minoritaria

presentó un coeficiente de sedimentación de 75S, correspondiente a las cápsides vacías y al final del gradiente también se detectó la fracción de 12S. Por otro lado, se detectó un componente mayoritario e inusual, que mostró una velocidad de sedimentación intermedia a las subunidades mencionadas precedentemente (20S).

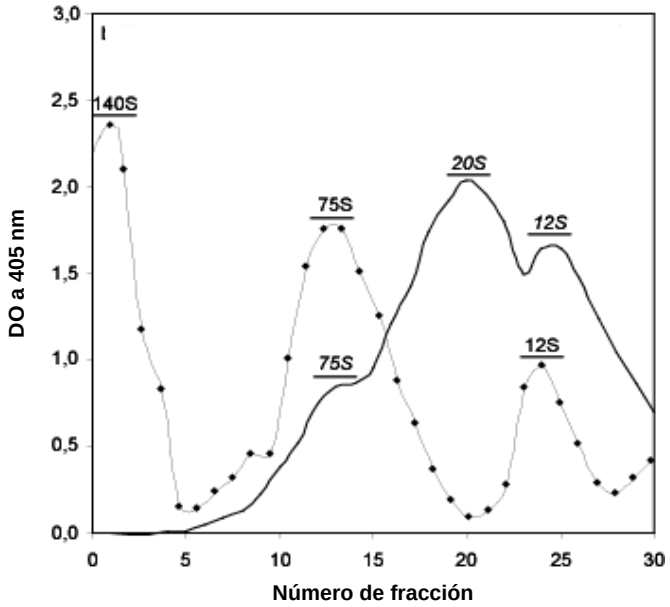


Figura 4.13. Análisis de las subunidades del VFA obtenidas por gradiente de sacarosa (5-30%) de un lisado de células infectadas con HSV-P12A3C. Las distintas fracciones fueron analizadas por un ELISA en fase sólida usando mAbs específicos y los valores de absorbancia fueron medidos a 405 nm. La línea punteada indica los picos obtenidos con el VFA cepa A24/Cruzeiro, y la línea continua las fracciones obtenidas con el HSV-P12A3C.

Para confirmar los resultados precedentes, una mezcla de las fracciones conteniendo las distintas subunidades del VFA se analizó por microscopia electrónica. La Figura 4.14, panel A, muestra la presencia de cápsides vacías de aproximadamente 30 nm que corresponden a la fracción 75S. También se detectaron capsómeros (subunidades 12S) y grandes cantidades de agregados de los mismos que podrían corresponder a la fracción 20S (Figura 4.14, panel B).

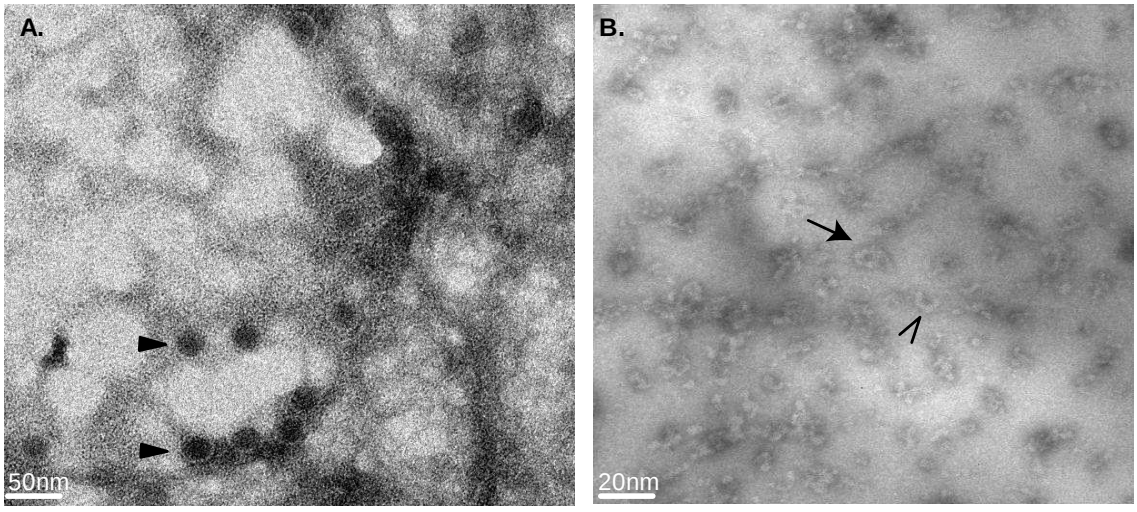


Figura 4.14. Microscopía electrónica de las subunidades del VFA obtenidas a partir de células infectadas con el amplicón HSV-P12A3C. Panel A: Se indican las cápsides vacías (►). Panel B: Se indican los capsómeros (>) y agregados de capsómeros (→).

4.4.5. Perfil antigénico de las subunidades del VFA generadas a partir de células infectadas con el amplicón HSV-P12A3C

Las distintas subunidades del VFA obtenidas del gradiente de sacarosa (75S, 20S y 12S) fueron enfrentadas a un panel de mAbs utilizando un ELISA de captura desarrollado y validado en la Institución (Seki et al., 2009). El panel esta formado por ocho mAbs dirigidos contra epitopes específicos de la cepa del VFA O1/Caseros (8G, 3A2, 74, 3, 2C8, 69, 2-6F, 3G10) y ocho mAbs dirigidos contra la cepa O1/Campos (17, G8, 1B9, 3C12, 3D6, 3E10, 4C11, 4E7) y un suero policlonal del serotipo O (SP). La Figura 4.15 muestra los porcentajes de reactividad resultantes de cada fracción obtenida, donde se estableció como el 100 % a la reactividad provocada por el virus entero o fracción 140S.

Las cápsides vacías obtenidas a partir de células infectadas con el amplicón HSV-P12A3C, mostraron epitopes que fueron reconocidos por la mayoría de los mAbs utilizados, es decir, que estos epitopes presentes en la fracción 75S se encuentran en una conformación antigénica similar a la del virus entero.

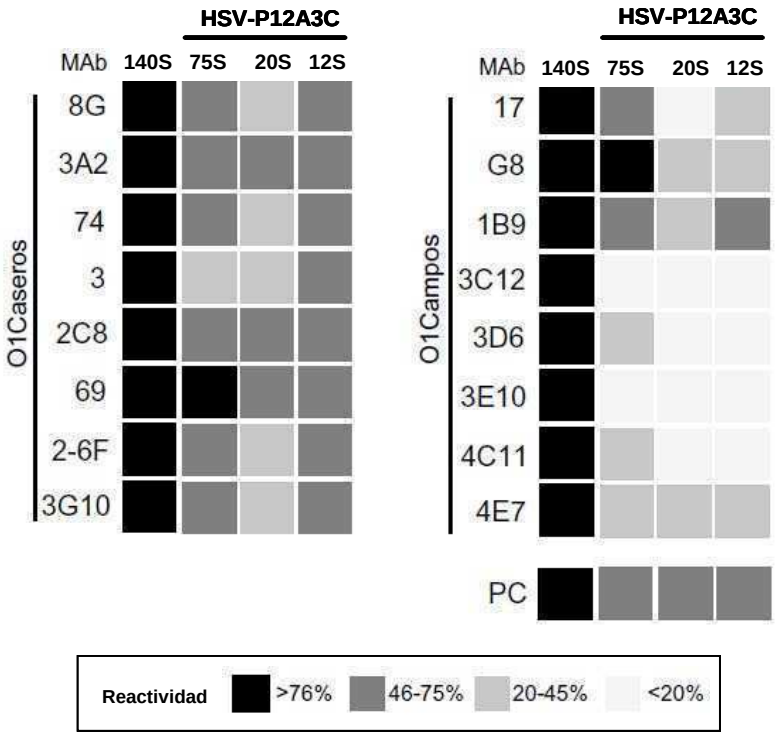


Figura 4.15. Perfil antigénico de las subunidades del VFA obtenidas con el amplicón HSV-P12A3C. Las fracciones 75S, 20S y 12S fueron enfrentadas a un panel de mAbs en un ELISA de captura. Se tomó como el 100% a la reactividad inducida por el virus entero (140S).

Capítulo II

"Estudio de la respuesta inmune humoral y celular inducida por las distintas plataformas vacunales en el modelo murino"

Sección C - INMUNIZACIÓN DE RATONES CON VECTORES DERIVADOS DE Ad Y AMPLICONES BASADOS EN HSV

4.5. Determinación de la dosis y vías de inoculación

Para establecer las condiciones óptimas de inmunización necesarias para desencadenar una respuesta inmune específica anti-VFA, se probaron diferentes dosis del inmunógeno derivado de Adenovirus, así como también, diferentes vías de inoculación para ambos candidatos vacunales (Ad y HSV).

4.5.1. Determinación de dosis mínima y vía de inoculación para el vector Ad-P12A3C

Grupos de ratones de la cepa BALB/c (4 animales por grupo) se inmunizaron con Ad-P12A3C siguiendo el esquema descripto en la Tabla 7. Se incluyeron en el experimento, grupos de animales inmunizados con el vector Ad-GFP y con el virus O1/Campos inactivado (VFAi) adyuvado con Marcol / Montanide, como control negativo y positivo respectivamente.

Tabla 7. Determinación de dosis y vías para Ad-P12A3C

Grupos	Inmunógeno (dosis)	Volumen (µl)	Vía de inoculación
A	Ad-P12A3C (5.10^7 UFP)	300	i.p.
B	Ad-P12A3C (5.10^8 UFP)	300	i.p.
C	Ad-GFP (5.10^7 UFP)	300	i.p.
D	VFAi (1µg) *	300	i.p.
E	Ad-P12A3C (1.10^5 UFP)	50	i.m.
F	Ad-P12A3C (1.10^6 UFP)	50	i.m.
G	Ad-P12A3C (5.10^7 UFP)	50	i.m.
H	Ad-P12A3C (1.10^8 UFP)	50	i.m.
I	Ad-P12A3C (5.10^8 UFP)	50	i.m.
J	Ad-GFP (1.10^8 UFP)	50	i.m.
K	Ad-P12A3C (1.10^5 UFP)	20	i.n.
L	Ad-P12A3C (1.10^6 UFP)	20	i.n.
M	Ad-P12A3C (5.10^7 UFP)	20	i.n.
N	Ad-P12A3C (5.10^8 UFP)	20	i.n.
O	Ad-GFP (1.10^8 UFP)	20	i.n.

***** El VFAi se inoculó formulado con Adyuvante Marcol /Montanide en una relación 1:1.

Referencias: i.p.: intraperitoneal; i.m.: intramuscular; i.n.: intranasal; UFP: unidades formadoras de placas.

Los ratones fueron inmunizados 2 veces con un intervalo de 28 días entre las dosis y se sangraron a los 21 días post vacunación (dpv) y a los 7 y 21 días post refuerzo (dpr).

Los niveles de anticuerpos (Acs) específicos anti-VFA se midieron mediante un ELISA de captura y el punto de corte se calculó como 2 veces ± 2 desvíos estándar (DS), la Densidad Óptica (DO) a 405 nm obtenida para los sueros provenientes de los ratones inmunizados con Ad-GFP. Los títulos de Acs se expresaron como la inversa de la última dilución cuya DO fuera igual o mayor a la del punto de corte. Se calculó el logaritmo del título para cada ratón y se graficó el promedio con su DS, para cada grupo.

A.

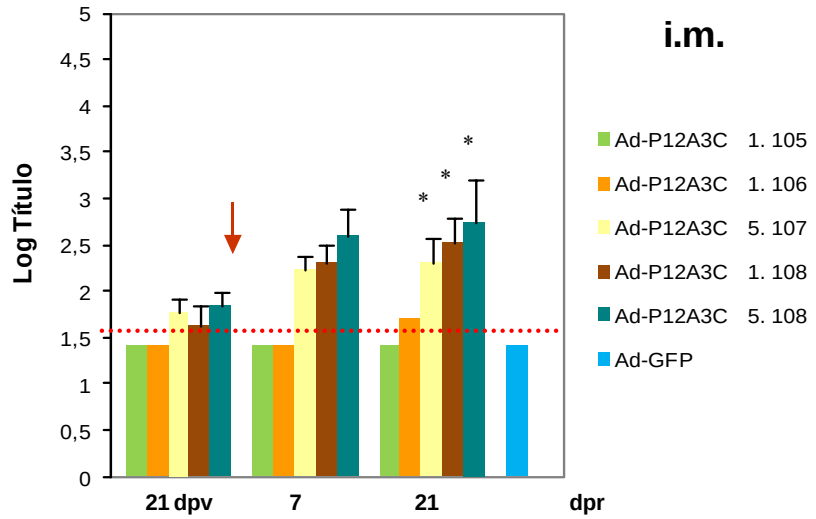


Figura 4.16.A. Determinación de dosis mínima y vías de inoculación para Ad-P12A3C. Se inocularon ratones BALB/c con diferentes dosis de Ad-P12A3C por vía i.m.
La flecha señala el momento de la aplicación de la dosis de refuerzo y la línea punteada el punto de corte.
Los asteriscos indican la existencia de una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos entre los grupos marcados respecto al grupo control ($p<0,05$).

Como se observa en la Figura 4.16.A, para los animales vacunados por vía i.m. con una sola dosis, ninguna de las cantidades ensayadas (desde 1.10^5 a 5.10^8) logró inducir una respuesta significativa de Acs anti-VFA, a los 21 dpv.

Sin embargo, luego de la aplicación de la dosis de refuerzo (indicado con un flecha roja), se evidenció un aumento en los niveles de Acs solo en los grupos de ratones inoculados con las 3 dosis mayores de Ad-P12A3C utilizadas. Los niveles de Acs de los animales inoculados con las dosis de 1.10^5 y 1.10^6 UFP permanecieron en un nivel basal, hasta el final del experimento.

A los 21 dpr, para las 2 dosis mayores de Ad-P12A3C, los títulos de Acs aumentaron ligeramente respecto al nivel obtenido a los 7 dpr.

El análisis estadístico demostró que no existieron diferencias significativas, a los 21 dpr, entre los títulos de Acs inducidos por las 3 dosis mayores de Ad-P12A3C utilizadas. No obstante, estos títulos sí fueron significativamente mayores al obtenido con la inoculación de los ratones con Ad-GFP ($p<0,05$).

A partir de estos resultados se pudo concluir, que la respuesta de Acs generada por la inoculación de Ad-P12A3C por vía i.m., fue dosis - dependiente, es decir que a mayor dosis del inmunógeno se indujo un mayor título de Acs específicos.

En todos los casos se necesitó la aplicación de una segunda dosis para desencadenar una respuesta de Acs detectable.

Posteriormente, se probaron solo las 2 dosis mayores de Ad-P12A3C por vía i.p. La Figura 4.16.B. muestra los títulos de Acs anti-VFA inducidos por la inoculación de 5.10^7 y 5.10^8 UFP de Ad-P12A3C a los 21 dpv, y 7 y 21 dpr.

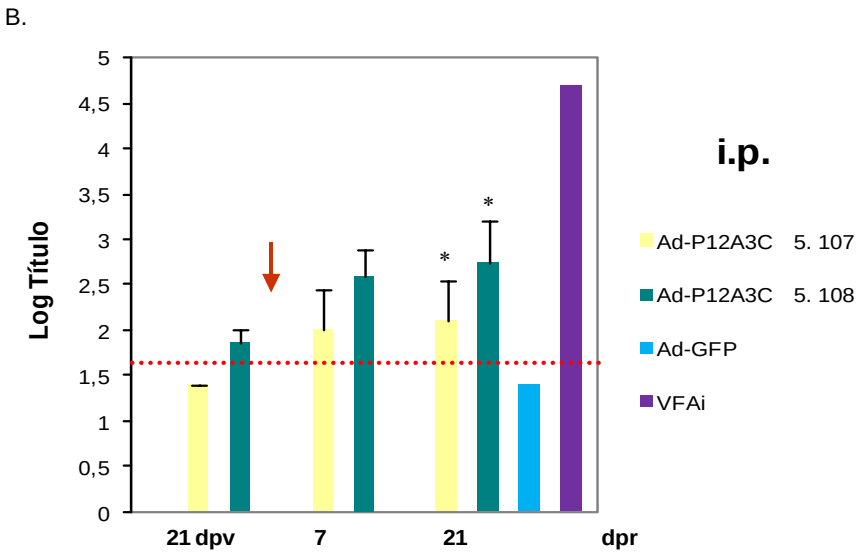


Figura 4.16.B. Determinación de dosis mínima y vías de inoculación para Ad-P12A3C. Se inocularon ratones BALB/c con diferentes dosis de Ad-P12A3C por vía i.p.
La flecha señala el momento de la aplicación de la dosis de refuerzo y la línea punteada el punto de corte.
Los asteriscos indican la existencia de una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos entre los grupos inoculados con Ad-P12A3C comparados al grupo inoculado con Ad-GFP ($p<0,05$).

Al igual que lo obtenido por vía i.m., la inducción de Acs anti-VFA fue dosis – dependiente y se hizo evidente luego de aplicada la dosis de refuerzo.

No se encontraron diferencias significativas, a los 21 dpr, entre los títulos de Acs inducidos por las dos dosis de Ad-P12A3C utilizadas. De todos modos, a pesar de que los títulos de Acs fueron significativamente mayores al obtenido con la inoculación de Ad-GFP ($p<0,05$), no lograron alcanzar los niveles de Acs inducidos por la aplicación de dos dosis de VFAi ($p<0,05$).

Por último, se analizaron los niveles de Acs inducidos por la inoculación de Ad-P12A3C por vía i.n.

Como se puede observar en la Figura 4.16.C, ninguna de las dosis ensayadas logró desencadenar una respuesta detectable de anticuerpos, aún después de la aplicación de la dosis de refuerzo.

C.

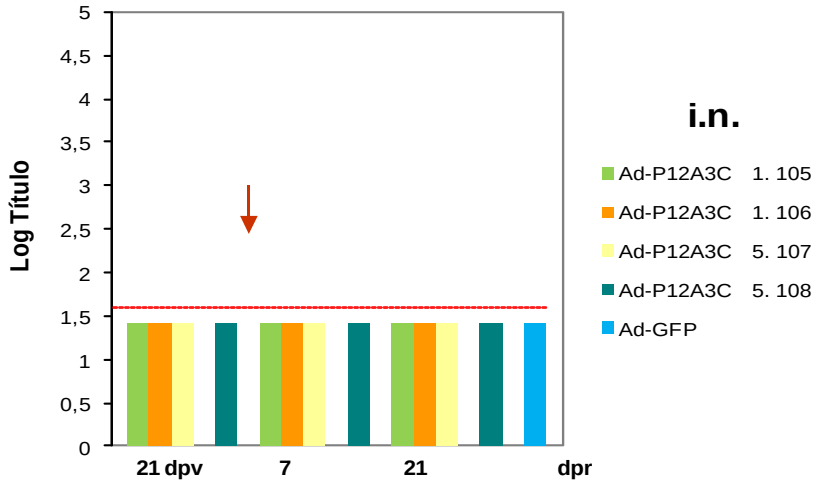


Figura 4.16.C. Determinación de dosis mínima y vía de inoculación para Ad-P12A3C. Se inocularon ratones BALB/c con diferentes dosis de Ad-P12A3C por vía i.n.
La flecha señala el momento de la aplicación de la dosis de refuerzo y la línea punteada indica el punto de corte.

En base a estos resultados, para los próximos experimentos de inmunización se seleccionó la vía i.m. y la dosis 5.10^7 UFP, ya que es la mínima dosis necesaria para desencadenar una respuesta de Acs anti-VFA y por otra parte permitirá apreciar mejor pequeñas diferencias que existan en los niveles de Acs generados.

Por otro lado, cabe destacar la necesidad de la aplicación de una dosis de refuerzo para desencadenar una respuesta de Acs anti-VFA detectable.

4.5.2. Determinación de la vía de inoculación para el vector amplicón HSV-P12A3C

Se inmunizaron ratones de la cepa BALB/c con dos dosis de 5.10^5 UT de HSV-P12A3C empleando distintas vías de inoculación: i.p., i.m. y subcutánea (s.c.). Se incluyeron animales inoculados con el vector amplicón HSV-GFP y con el VFAi formulado con adyuvante de Freund's, que se utilizaron como control negativo y positivo respectivamente (Tabla 8). La dosis de 5.10^5 UT se seleccionó en base a experimentos realizados en otro trabajo.

Se colectaron muestras de suero a los 21 dpv y a los 7 y 21 dpr y se midieron los niveles de Acs anti-VFA generados mediante un ELISA de captura.

Tabla 8. Determinación de la vía de inoculación para HSV-P12A3C

Grupos	Inmunógeno (dosis)	Volumen (μl)	Vía de inoculación
A	HSV-P12A3C (5.10^5 UT)	300	i.p.
B	HSV-P12A3C (5.10^5 UT)	250	s.c.
C	HSV-P12A3C (5.10^5 UT)	50	i.m.
D	HSV-GFP (5.10^5 UT)	300	i.p.
E	VFAi (1μg) *	300	i.p.

* El VFAi se inoculó formulado con Adyuvante de Freund's completo (1° dosis) e incompleto (2° dosis).
Referencias: i.p.: intraperitoneal; s.c.: subcutánea; i.m.: intramuscular; UT: unidades de transducción.

Como se puede observar en la Figura 4.17, a los 21 dpv, la aplicación de una dosis de HSV-P12A3C por las vías i.m. y s.c, no indujo la formación de Acs anti-VFA. Sin embargo, realizando las inoculaciones por vía i.p., se observaron títulos de Acs mayores (aproximadamente el doble) que los inducidos por las dos vías anteriormente mencionadas, y fueron semejantes a los títulos obtenidos por la inoculación con el VFAi.

A los 7 días de aplicada la dosis de refuerzo (indicada con la flecha roja), se produjo una importante inducción de los títulos de Acs en todos los animales inoculados, independientemente de la vía utilizada.

Los títulos de Acs inducidos por la inoculación con 2 dosis del amplicón HSV-P12A2C y del VFAi por vía i.p. continuaron aumentando hasta los 21 dpr. A pesar de ello, no fueron significativamente diferentes al título inducido por la vía i.m. En cambio, los títulos de Acs inducidos por la inoculación del HSV-P12A3C por vía s.c. fueron significativamente menores a los obtenidos por vía i.p. ($p<0,05$).

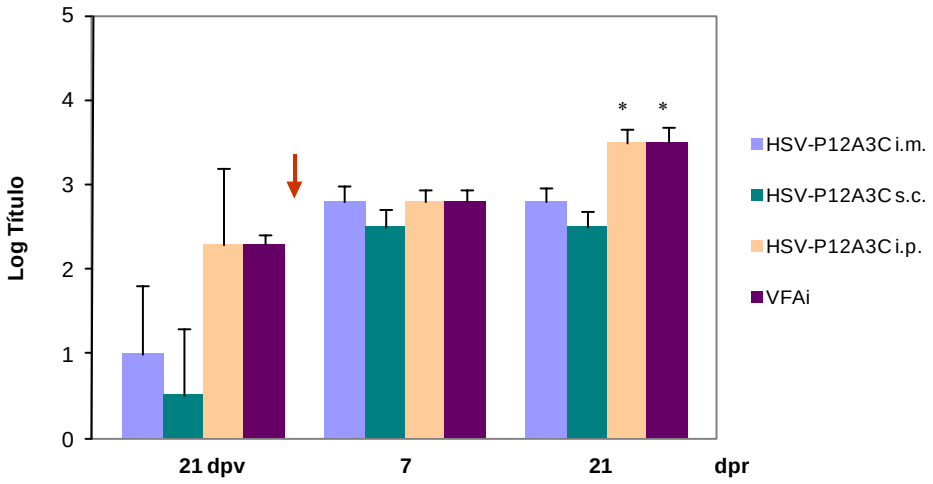


Figura 4.17. Selección de la vía de inoculación para HSV-P12A3C. Se inocularon ratones BALB/c con 5.10^5 UT de HSV-P12A3C utilizando distintas vías de inoculación (i.p., i.m. y s.c.).
La flecha indica el momento de la aplicación de la dosis de refuerzo y los asteriscos señalan la existencia de una diferencia significativa entre los títulos de anticuerpos inducidos por los grupos marcados respecto al título correspondiente al grupo inoculado por vía s.c. ($p<0,05$).

A partir de estos resultados se pudo concluir, que la aplicación de dos dosis de HSV-P12A3C, por vía i.p., indujo niveles semejantes de Acs anti-VFA que la aplicación de 2 dosis del VFAi.

Por otro lado, y al igual que lo obtenido para Ad-P12A3C, los animales inoculados con los vectores amplicón, desencadenaron una respuesta detectable de Acs, solamente luego de la aplicación de la dosis de refuerzo.

4.6. Los anticuerpos anti-VFA generados reconocen a la proteína VP3

Se evaluó la reactividad de los sueros provenientes de los ratones inmunizados con los vectores virales derivados de Ad y de HSV, obtenidos a los 21 dpr. Para ello, se realizó un WB sembrando en cada calle de un gel de poliacrilamida, virus O1/Campos inactivado. Posteriormente, se reveló cada calle con pooles de sueros diluidos 1/100. Se incluyeron en el revelado, los sueros anti-VP1 y anti-VP3 hechos en conejo.

Como se puede ver en la Figura 4.18, los anticuerpos generados por la inmunización con 2 dosis de HSV-P12A3C o del VFAi reconocieron una proteína viral, aparentemente la proteína estructural VP3. Cuando la membrana fue incubada con los sueros provenientes de animales inoculados con Ad-P12A3C o Ad-GFP no fue posible detectar ninguna de las proteínas estructurales del VFA.

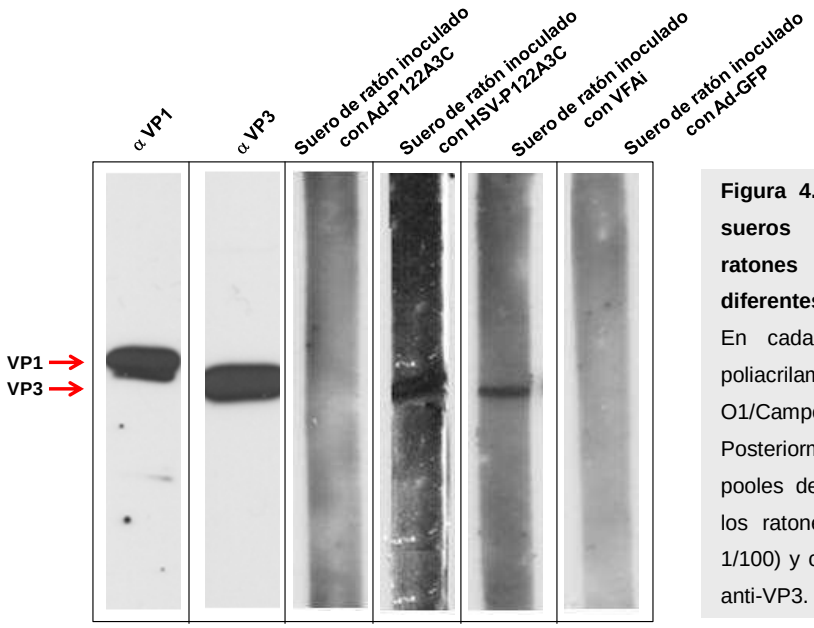


Figura 4.18. Reactividad de los sueros provenientes de los ratones inmunizados con los diferentes candidatos vacunales. En cada calle de un gel de poliacrilamida se corrió virus O1/Campos inactivado. Posteriormente, se reveló con pooles de los distintos sueros de los ratones inmunizados (dilución 1/100) y con los sueros anti-VP1 y anti-VP3.

4.7. Análisis de la influencia de proteínas asociadas a las partículas virales

Dado que las partículas virales derivadas de Ad o de HSV se obtienen a partir de cultivos de células infectadas, y se utilizan en los ensayos de inmunización en un estado semi-purificado, nos preguntamos que proporción de la respuesta inmune es producida por las partículas del VFA generadas in situ y que contribución pudieran tener posibles proteínas que se generaron durante la preparación y acompañen eventualmente a los vectores, a la respuesta inmune generada por los mismos.

Para responder esta pregunta, se sembró en un gel de poliacrilamida, el volumen equivalente a una dosis de ambos vectores (5.10^7 UFP para Ad-P12A3C y 5.10^5 UT para HSV-P12A3C). Además, se incluyeron el Ad-GFP y el HSV-GFP como controles. El WB se reveló con un suero anti-VP3 y anti-GFP.

Como puede observarse en la Figura 4.19.A, en el preparado del amplicón HSV-P12A3C se detectaron las proteínas VP3 y GFP. En el caso de HSV-GFP, se detectó la proteína GFP.

Para las preparaciones de Ad-P12A3C y de Ad-GFP (Figura 4.19.B), no se detectaron proteínas acompañantes junto a las partículas.

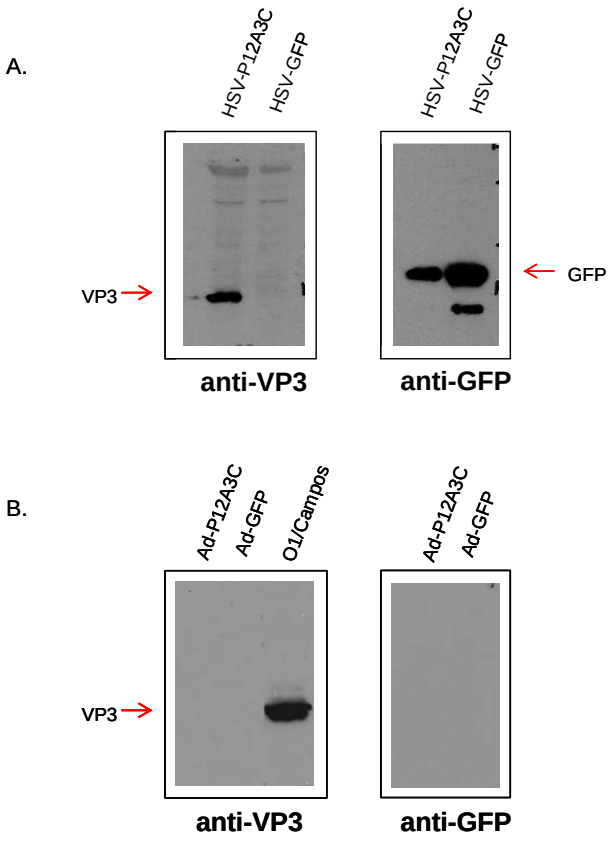


Figura 4.19. Existencia de proteínas pre-formadas asociadas sólo a los amplicones de HSV. Se corrió en un gel de poliacrilamida la cantidad equivalente a 5.10^5 de los amplicones HSV-P12A3C y HSV-GFP (Parte A, paneles derecho e izquierdo) y 5.10^7 de los adenovirus recombinantes Ad-P12A3C y Ad-GFP (Parte B, paneles derecho e izquierdo). Luego se reveló con un suero anti-VP3 o anti-GFP.
O1/Campos: VFA O1/Campos inactivado.

A partir de estos resultados pudimos concluir que como mínimo, las proteínas VP3 y GFP se encuentran asociadas a las partículas del vector amplicón derivado de HSV. En el caso de las partículas derivadas de Adenovirus, éstas aparentemente, no cuentan con proteínas asociadas.

Como siguiente paso se determinó si estas pequeñas cantidades de antígeno pre-formado asociado a las partículas del vector amplicón contribuían a la respuesta inmune generada por los mismos.

Para ello, con el fin de inhibir la replicación viral dentro de las células infectadas, y por lo tanto la síntesis de novo de proteínas, alícuotas de Ad-P12A3C y HSV-P12A3C se inactivaron con BEI y se inocularon en ratones BALB/c.

Los valores de Acs específicos anti-VFA obtenidos a los 21 dpr se compararon con los títulos inducidos por los vectores sin inactivar. En el caso de HSV, se comparó además con los títulos de Acs inducidos por la inmunización de HSV-P12A3C

inactivado formulado con adyuvante de Freund's incompleto, para potenciar la respuesta.

Como se observa en la Figura 4.20, ni los amplicones herpéticos ni el Ad-P12A3C, inactivados con BEI, fueron capaces de inducir una respuesta de Acs anti-VFA detectable ($p<0,05$) aún los formulados en adyuvante oleoso ($p<0,05$).

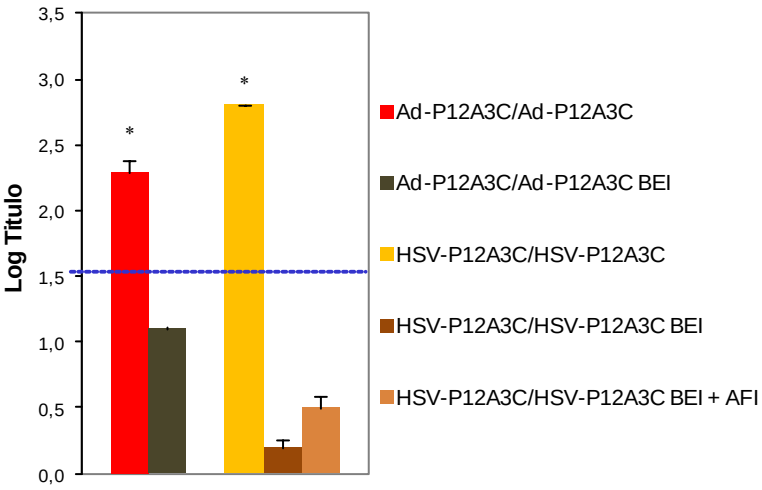


Figura 4.20. La respuesta de Acs anti-VFA es generada por proteínas sintetizadas de novo. Se inocularon animales con alícuotas de ambos vectores virales inactivados con BEI y a los 21 dpr se analizó el título de anticuerpos anti-VFA por ELISA. Los asteriscos indican una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos entre los grupos marcados y los inactivados con BEI ($p<0,05$).

Estos resultados indican que la respuesta de Acs anti-VFA observada en los ratones inmunizados con las partículas derivadas de Ad o HSV está generada principalmente por proteínas sintetizadas de novo dentro de las células del ratón infectadas.

Particularmente en el caso de las partículas amplicón derivadas de HSV, las proteínas estructurales pre-formadas que llevan asociadas, no contribuyen significativamente a esta respuesta.

4.8. Análisis de la expresión de las proteínas estructurales del VFA a través de los vectores amplicón in vivo

Para estudiar si los vectores amplicón son capaces de expresar las proteínas estructurales del VFA in vivo, ratones BALB/c fueron inoculados con 5.10^5 UT de HSV-P12A3C. A las 5 y 48 horas post inoculación (hpi) se determinó, en primer lugar, la presencia de una reacción inflamatoria en el sitio de inoculación de los ratones inmunizados por histopatología y en segundo lugar, se analizó la expresión de antígenos del VFA en los ganglios poplíteos de cada animal inmunizado, por inmunohistoquímica. Como control negativo se utilizaron ratones inoculados con el amplicón HSV-GFP o con PBS.

A las 5 hpi, una leve infiltración de neutrófilos y macrófagos fue visible en el sitio de inoculación de todos los ratones inmunizados (datos no mostrados).

En cambio, a las 48 hpi (Figura 4.21), una severa infiltración de macrófagos y neutrófilos se observó en los preparados provenientes de los ratones inoculados con el amplicón HSV-P12A3C. Los cortes provenientes de los ratones inoculados con HSV-GFP o PBS también mostraron un proceso inflamatorio moderado, por lo que no se pudo concluir si el proceso inflamatorio fue consecuencia de la aplicación de la inyección o de una reacción específica de los amplicones.

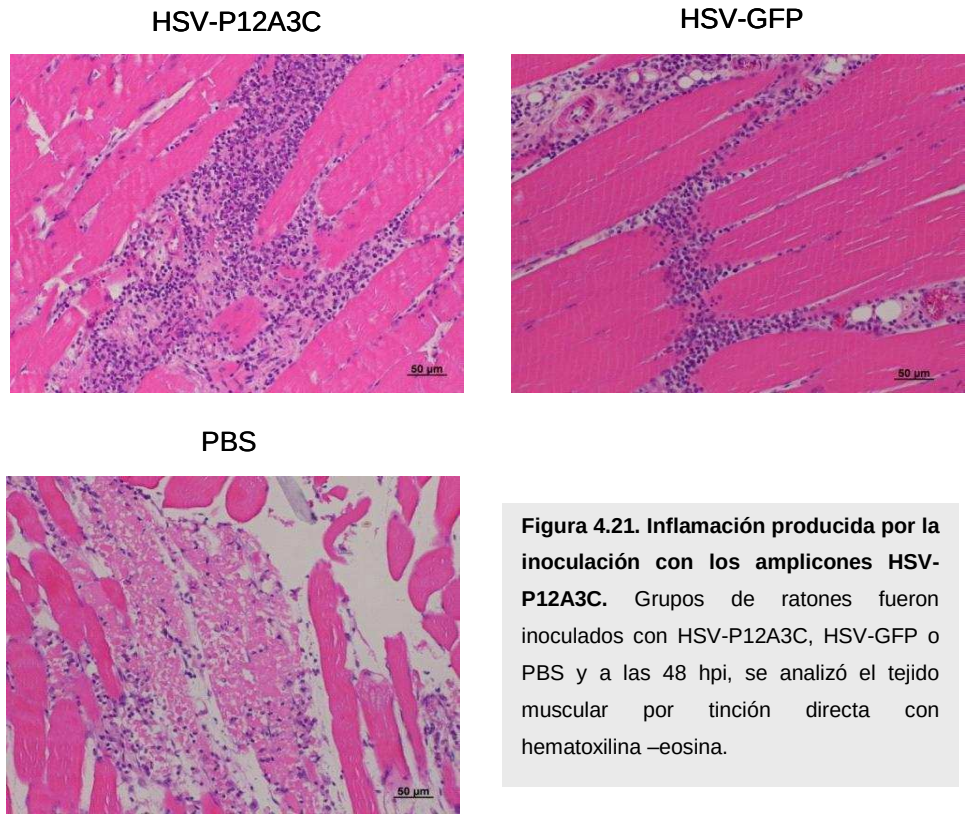


Figura 4.21. Inflamación producida por la inoculación con los amplicones HSV-P12A3C. Grupos de ratones fueron inoculados con HSV-P12A3C, HSV-GFP o PBS y a las 48 hpi, se analizó el tejido muscular por tinción directa con hematoxilina –eosina.

Por otro lado, para observar la expresión de las proteínas estructurales del VFA in situ se analizaron cortes del ganglio poplíteo de los animales inoculados, a las 5 y a las 48 hpi. Los distintos cortes se tiñeron con un Ac anti-VP1 o anti-VP3.

Como muestra la Figura 4.22, paneles A y C, a las 5 hpi, en ningún corte proveniente de los ganglios poplíteos de los ratones inmunizados con HSV-P12A3C, se observaron células teñidas con los Acs utilizados.

En cambio, a las 48 hpi fueron visibles células positivamente teñidas con los Ac anti-VP1 y anti-VP3 sólo en los ganglios poplíteos de los ratones inoculados con HSV-P12A3C (Figura 4.22, paneles B y D respectivamente).

No se observaron células teñidas con el Ac anti-VP3, en los cortes provenientes de los ganglios poplíteos de los ratones inmunizados con HSV-GFP y PBS (Figura 4.22, paneles E y F).

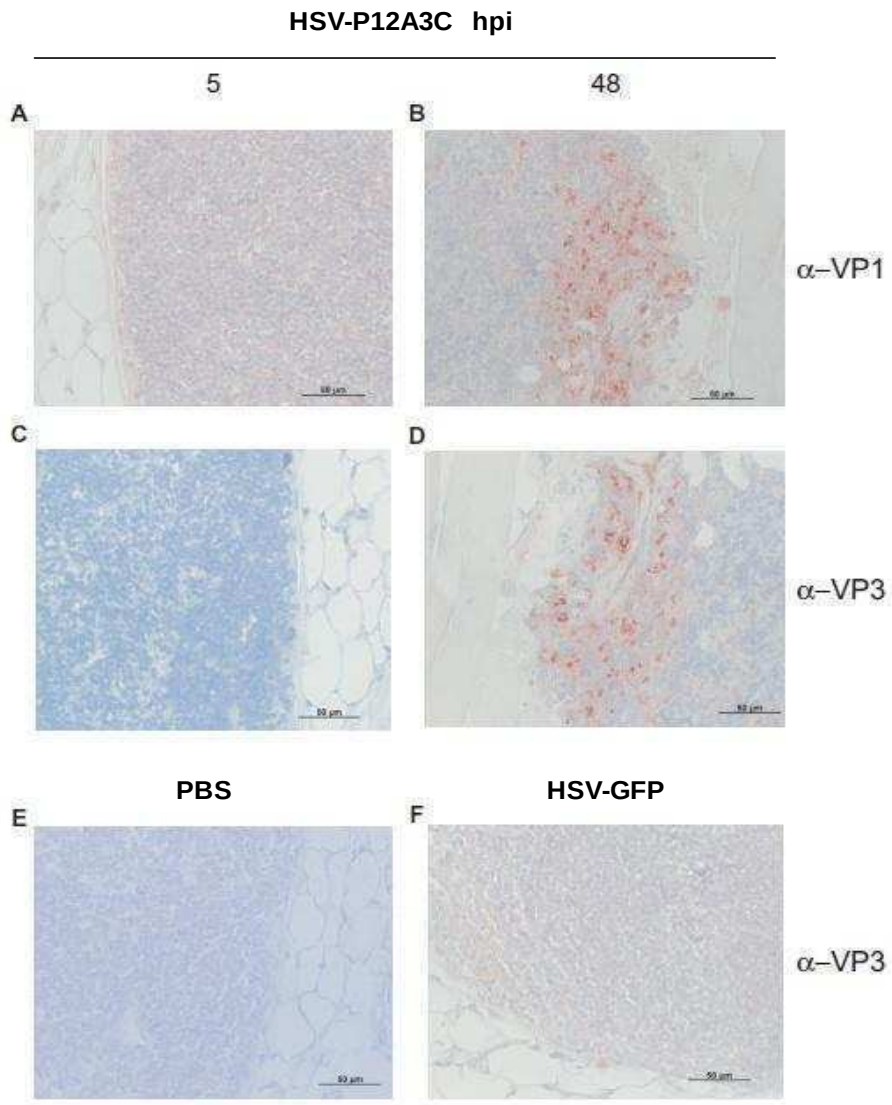


Figura 4.22. Detección de proteínas del VFA en tejido de ratones inoculados con el amplicón HSV-P12A3C. Se inocularon ratones con una dosis de 5.10^5 UT de HSV-P12A3C, y a las 5 (Paneles A y C) o a las 48 hpi (Paneles B y D) se les extrajo el ganglio poplíteo. Distintos cortes se inmunotiñeron con un anti-VP1 (Paneles A y B) o con un anti-VP3 (Paneles C y D). En paralelo, se analizaron secciones de los ganglios poplíteos de ratones inmunizados con HSV-GFP o PBS teñidos a las 48 hpi con un anti-VP3 (Paneles E y F).

Sección D - ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VFA INDUCIDA POR LOS DISTINTOS VECTORES UTILIZANDO UN RÉGIMEN DE INMUNIZACIÓN DE TIPO PRIME-AND-BOOST

4.9. Análisis de la respuesta inmune humoral

4.9.1. Estudio de la inmunidad contra el VFA inducida por la combinación de vectores virales, vacunas a ADN y vacuna convencional

Se inocularon grupos de ratones BALB/c (4 animales por grupo) por vía i.m. con los diferentes inmunógenos generados (Ad-P12A3C, HSV-P12A3C, pCI-P12A3C) combinados entre sí o con el VFAi.

Para las inoculaciones con el vector pCI-P12A3C se utilizó una dosis de 200 µg de ADN por ratón, según datos de la bibliografía (Zhang et al., 2003); (Zhang et al., 2008).

Por otra parte y según lo establecido en la Sección C, para las inoculaciones con el amplicón HSV-P12A3C, se utilizó una dosis de 5.10^5 UT y para Ad-P12A3C, 5.10^7 UFP por ratón.

Como se observa en la Tabla 9, se siguieron esquemas de inmunización de tipo prime-and-boost homólogo (encuadrado en color rojo) u heterólogo (encuadrado en color azul) combinando los tres sistemas de expresión generados, incluyendo el VFAi.

Los niveles de Acs anti-VFA presentes en los sueros de los animales vacunados se determinaron mediante un ELISA de captura, a los 21 dpv (antes del refuerzo) y a los 7 y 21 dpr. Los títulos se calcularon como la inversa de la última dilución cuya DO fuera igual o mayor a la del punto de corte (siendo el punto de corte 2 veces, ± 2 DS, la DO a 405 nm de los sueros provenientes de los ratones inmunizados con Ad-GFP o HSV-GFP).

Se calculó el logaritmo del título de anticuerpos para cada ratón y se graficó el promedio con su DS para cada grupo.

Tabla 9. Esquema de inmunización de tipo prime-and-boost homólogo y heterólogo

Grupos	Prime	Boost	Dosis	Vía de inoculación
1	Ad-P12A3C	Ad-P12A3C	5.10^7 UFP / 5.10^7 UFP	i.m.
2	HSV-P12A3C	HSV-P12A3C	5.10^5 UT / 5.10^5 UT	i.m.
3	pCI-P12A3C	pCI-P12A3C	200 μg / 200 μg	i.m.
4	Ad-P12A3C	HSV-P12A3C	5.10^7 UFP / 5.10^5 UT	i.m.
5	HSV-P12A3C	Ad-P12A3C	5.10^5 UT / 5.10^7 UFP	i.m.
6	pCI-P12A3C	Ad-P12A3C	200 μg / 5.10^7 UFP	i.m.
7	pCI-P12A3C	HSV-P12A3C	200 μg / 5.10^5 UT	i.m.
8	Ad-P12A3C	VFAi*	5.10^7 UFP / 1 μg	i.m. / i.p.
9	VFAi*	VFAi*	1 μg / 1 μg	i.p.
10	Ad-GFP	Ad-GFP	5.10^7 UFP / 5.10^7 UFP	i.m.
11	HSV-GFP	HSV-GFP	5.10^5 UT / 5.10^5 UT	i.m.
12	pCI-vacío	pCI-vacío	200 μg / 200 μg	i.m.
13	pCI-P12A3C	PBS	200 μg / -	i.m.
14	PBS	Ad-P12A3C	- / 5.10^7 UFP	i.m.
15	PBS	HSV-P12A3C	- / 5.10^5 UT	i.m.
16	PBS	Ad-GFP	- / 5.10^7 UFP	i.m.
17	PBS	HSV-GFP	- / 5.10^5 UT	i.m.
18	PBS	PBS	- / -	i.m.

* El VFAi se inoculó formulado con Adyuvante Marcol /Montanide.

Referencias: i.m.: intramuscular; i.p.: intraperitoneal; UFP: unidades formadoras de placas; UT: Unidades de transducción.

Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos, primero se analizarán los grupos que recibieron la inmunización siguiendo un esquema de tipo prime-and-boost homólogo.

Como se muestra en la Figura 4.23, todos los animales inoculados con dos dosis de Ad-P12A3C o HSV-P12A3C fueron capaces de inducir una respuesta específica de Acs contra el VFA luego de la aplicación de una dosis de refuerzo, confirmando el resultado mostrado en el ítem 4.5.1 y 4.5.2 de la Sección C.

Los títulos alcanzados a los 21 dpr, por ambos grupos, fueron significativamente mayores a los respectivos grupos control, Ad-GFP y HSV-GFP y al control con PBS ($p<0,05$). Sin embargo, no alcanzaron a superar al título de Acs inducido por la inoculación con dos dosis del VFAi ($p<0,05$).

Por otro lado, dos dosis de la vacuna genética, pCI-P12A3C, no fueron suficientes para desencadenar una respuesta apreciable de Acs. Se obtuvieron títulos similares a los inducidos por el vector pCI-vacío.

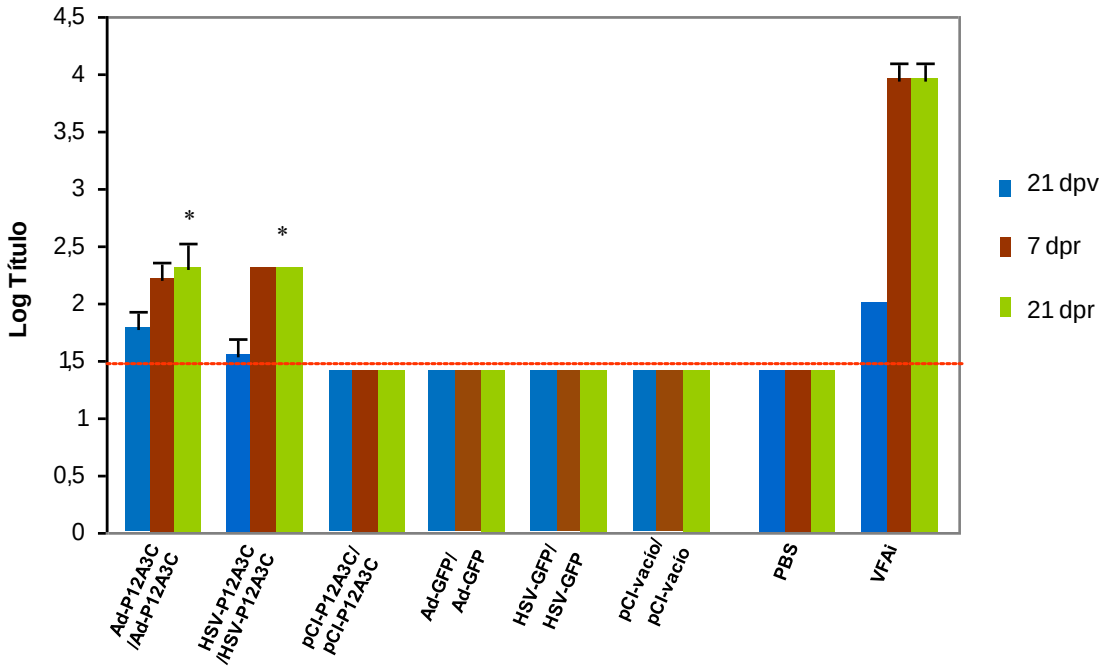


Figura 4.23. Acs totales anti-VFA inducidos por los distintos esquemas de prime-and-boost homólogo. Ratones BALB/c fueron inmunizados de acuerdo a la Tabla 9. A los 21 dpv, 7 y 21 dpr se determinó por ELISA, la presencia de anticuerpos específicos anti-VFA en muestras de suero. Los asteriscos indican una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos entre los grupos marcados respecto al grupo control correspondiente y al grupo inoculado con PBS ($p<0,05$).

En la Figura 4.24, se muestran los resultados obtenidos siguiendo un esquema de inmunización de tipo prime-and-boost heterólogo.

En los animales que recibieron una dosis de pCI-P12A3C, a los 21 dpv, no se detectaron títulos de Acs anti-VFA. Sin embargo, luego de la aplicación de una dosis de refuerzo con Ad-P12A3C, los títulos aumentaron rápidamente. Este efecto no se observó cuando se utilizó HSV-P12A3C como refuerzo.

A pesar de que, con dos dosis de pCI-P12A3C no se logró desencadenar una respuesta detectable de Acs (Figura 4.23), cabe mencionar que el título alcanzado combinando la vacuna génica con Ad-P12A3C, fue similar al conseguido con el esquema homólogo de vectores virales, (Ad-P12A3C/Ad-P12A3C o HSV-P12A3C/HSV-P12A3C) y fue significativamente mayor que el título obtenido con 2 dosis de pCI-P12A3C ($p<0,05$).

Por otro lado, y como se observó en la Sección C, los animales que recibieron una sola dosis de Ad-P12A3C o HSV-P12A3C, no desencadenaron una respuesta

detectable de Acs, pero luego de la aplicación de la dosis de refuerzo utilizando un vector viral diferente (HSV-P12A3C/Ad-P12A3C, Ad-P12A3C/HSV-P12A3C) o el VFAi, (Ad-P12A3C/VFAi), se observó un incremento significativo en el título de Acs en los tres grupos estudiados. Además los títulos obtenidos con la inoculación de Ad-P12A3C/HSV-P12A3C o Ad-P12A3C/VFAi fueron semejantes a los inducidos por dos dosis de 1 μg de VFAi.

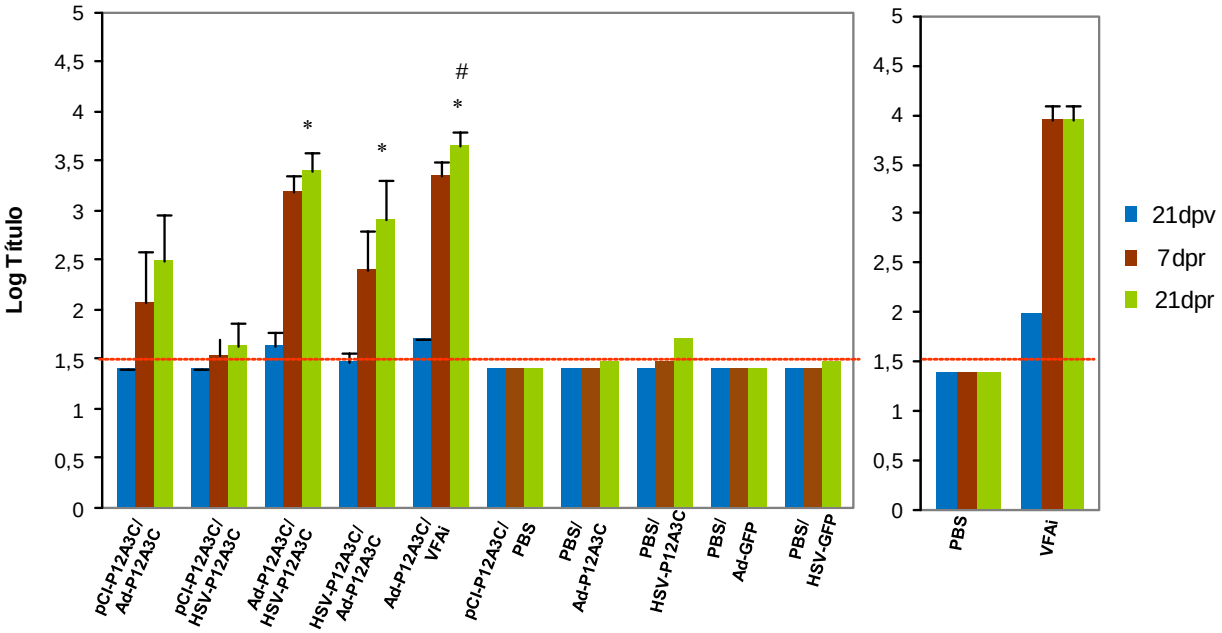


Figura 4.24. Acs totales anti-VFA inducidos por los distintos esquemas de prime-and-boost heterólogo. Ratones BALB/c fueron inmunizados de acuerdo a la Tabla 9. A los 21 dpv, 7 y 21 dpr se determinó por ELISA, la presencia de anticuerpos específicos anti-VFA en muestras de suero. Los asteriscos indican una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos inducidos entre los grupos marcados comparado a los inducidos por el grupo pCI-P12A3C/HSV-P12A3C ($p<0,05$). (#) Indica la existencia de una diferencia significativa en los títulos de Acs entre los grupos Ad-P12A3C/VFAi y pCI-P12A3C/Ad-P12A3C ($p<0,05$).

Estos resultados permiten concluir que utilizando un esquema de inmunización de tipo prime-and-boost heterólogo (Ad-P12A3C/HSV-P12A3C, HSV-P12A3C/Ad-P12A3C o Ad-P12A3C/VFAi) se puede obtener una respuesta significativamente mayor de anticuerpos específicos contra el VFA que con un régimen de tipo homólogo (Ad-P12A3C/Ad-P12A3C, HSV-P12A3C/HSV-P12A3C).

Esto podría deberse a la presencia de anticuerpos dirigidos contra el vector, usado en la primera inmunización.

Un ensayo preliminar de neutralización de alícuotas del vector Ad-GFP (MOI: 1), pre-incubadas con los sueros obtenidos de los animales inoculados con Ad-P12A3C, sobre células HEK293A, muestra una disminución del número de células que expresaron GFP (Figura 4.25).

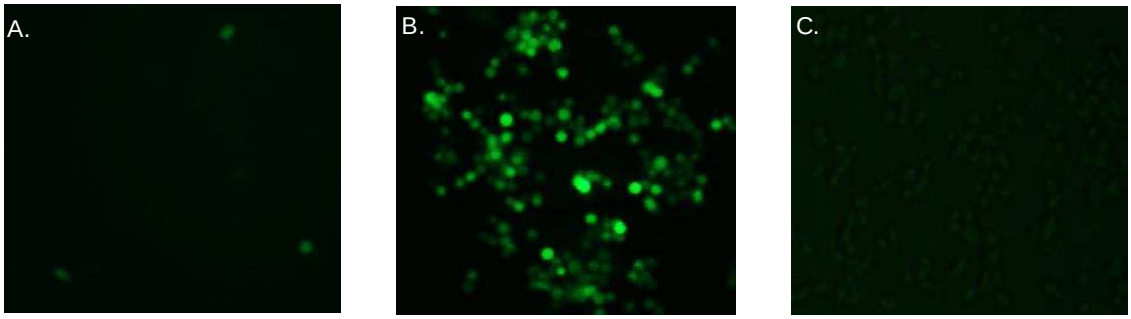


Figura 4.25. **Influencia de Acs neutralizantes dirigidos contra el vector Adenovirus.** Células HEK293A fueron infectadas con Ad-GFP (MOI 1), previamente incubado con un pool de sueros proveniente de ratones inmunizados con Ad-P12A3C (A), infectadas con Ad-GFP sin pre-tratamiento (B) y células sin infectar (C). A las 24 h se observaron al microscopio con fluorescencia.

De este resultado se podría inferir que existe una influencia negativa de anticuerpos dirigidos contra el vector, al menos en el caso de Adenovirus, pero se necesitaría realizar una investigación más profunda para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado se evaluó la reactividad de los Acs generados por la inmunización con los distintos candidatos vacunales, aplicados esta vez, en forma heteróloga. Se realizó un WB, en donde se sembró en cada calle de un gel de poliacrilamida, virus O1/Campos inactivado y se reveló con pooles de los distintos sueros provenientes de los ratones inmunizados, así como con los antisueros anti-VP1 y anti-VP3.

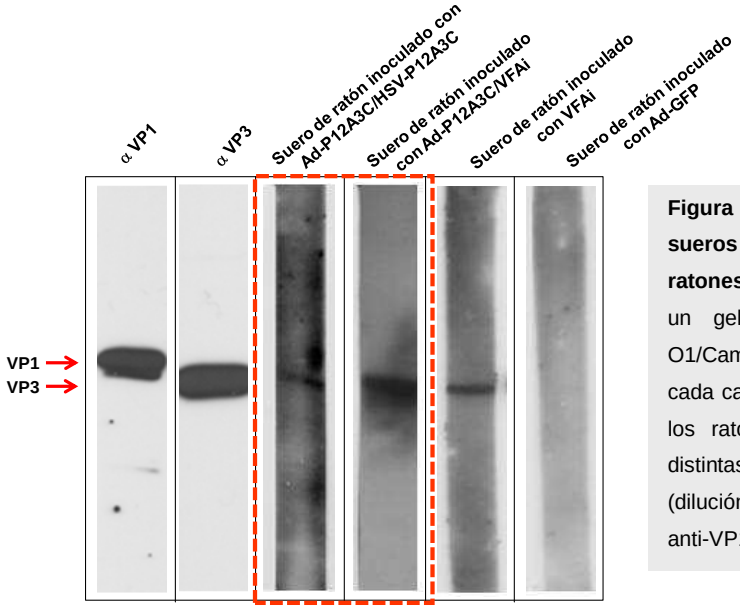


Figura 4.26. Reactividad de los sueros provenientes de los ratones inmunizados. Se corrió en un gel de poliacrilamida, virus O1/Campos purificado y se reveló cada calle con pooles de sueros de los ratones inmunizados con las distintas plataformas vacunales (dilución 1/100) y con los sueros anti-VP1 y anti-VP3.

Como se puede ver en la Figura 4.26, los anticuerpos generados por la inmunización heteróloga, ya sea combinando el Ad-P12A3C con HSV-P12A3C o con el VFAi (recuadrados en rojo), reconocieron aparentemente la proteína VP3.

4.9.2. Análisis del isotipo de los anticuerpos anti-VFA

Se midieron los títulos de las inmunoglobulinas específicas anti-VFA de los isotipos IgG1 (barras de color rojo) e IgG2a (barras de color verde) presentes en los sueros de los ratones, a los 21 dpr.

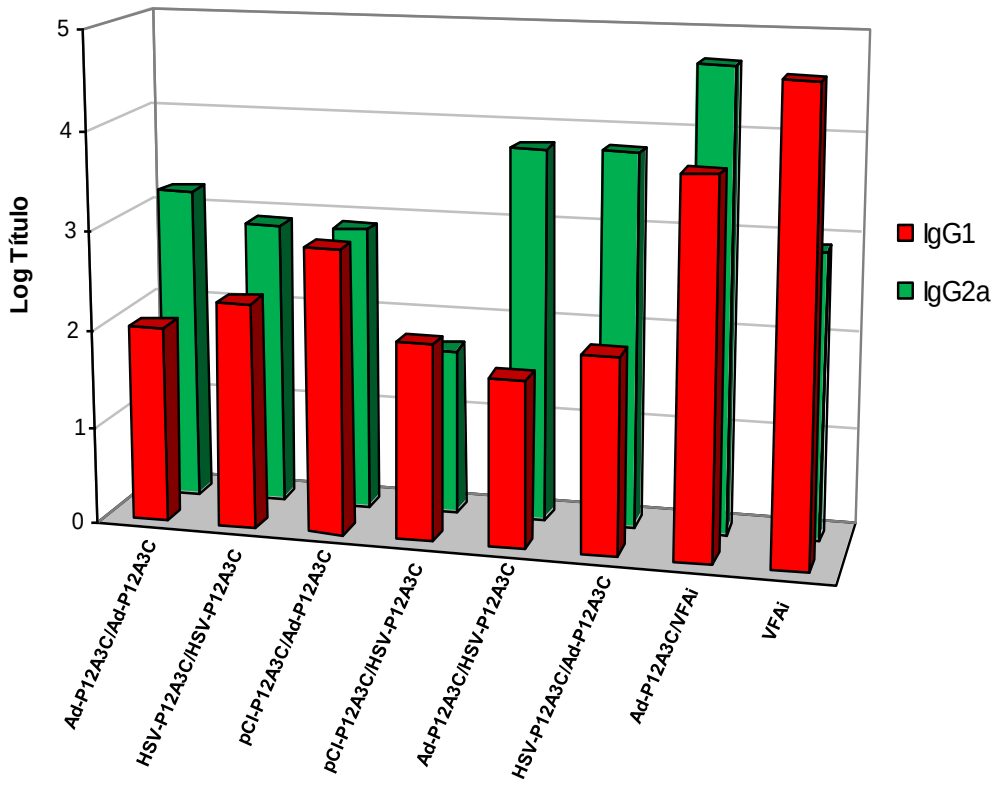


Figura 4.27. Análisis del isotipo de los anticuerpos anti-VFA. Se midieron los títulos de las inmunoglobulinas específicas anti-VFA de los isotipos IgG1 e IgG2a presentes en los sueros de los ratones inoculados con las diferentes plataformas vacunales por medio de un ELISA.

Como se puede observar en la Figura 4.27, en los esquemas de inmunización homólogos de vectores virales se observó una mayor proporción de Acs de isotipo IgG2a sobre los de isotipo IgG1 (Relación IgG1/IgG2a: 0,6 para Ad-P12A3C/Ad-P12A3C y 0,8 para HSV-P12A3C/HSV-P12A3C) Este predominio de Acs de isotipo IgG2a aumentó en los grupos inmunizados con la combinación heteróloga de vectores virales (Relación IgG1/IgG2a: 0,4 para Ad-P12A3C/HSV-P12A3C y 0,5 para HSV-P12A3C/Ad-P12A3C. La combinación ADN/vector viral, ya sea Adenovirus o Herpervirus, indujo una respuesta IgG1/IgG2a balanceada (Relación IgG1/IgG2a: 1). Por otra parte, la combinación Ad-P12A3C/VFAi produjo mayoritariamente anticuerpos de isotipo IgG2a (Relación IgG1/IgG2a: 0,8) y en contraposición, la respuesta con dos

dosis de VFAi indujo fundamentalmente Acs de isotipo IgG1 (Relación IgG1/IgG2a: 1,6).

Estos resultados indican que los regímenes de inmunización con vectores virales, ya sea inoculados en forma homóloga o heteróloga o combinados con el VFAi, generaron mayores niveles de Acs de isotipo IgG2a, sugiriendo una respuesta de tipo Th1 o celular. Mientras que, la inoculación con dos dosis de VFAi generaron altos niveles de Acs de isotipo IgG1, indicando una respuesta de tipo Th2 o humoral.

4.9.3. Análisis de la avidez de los anticuerpos anti-VFA generados

Posteriormente, para analizar la calidad de los anticuerpos generados, en cuanto a la fuerza de unión con su antígeno específico, se hizo un estudio de avidez

En base a los resultados obtenidos y descriptos anteriormente, para los siguientes ensayos se omitieron los inmunógenos basados en la combinación ADN/ vector viral.

Los sueros provenientes de los ratones inmunizados y sangrados a los 21 dpr se evaluaron en un ELISA de avidez, en donde los complejos Antígeno-Anticuerpo formados durante el ensayo fueron lavados durante 15 min con concentraciones crecientes de urea (1M a 7M). La Absorbancia obtenida, luego de la incubación con el anticuerpo conjugado y el revelado con ABTS, se graficó en función de las concentraciones de urea ensayadas (Figura 4.28, parte A). Se puede observar que, a medida que se incrementa la concentración de urea, va disminuyendo la DO de los sueros en todos los grupos analizados.

A.

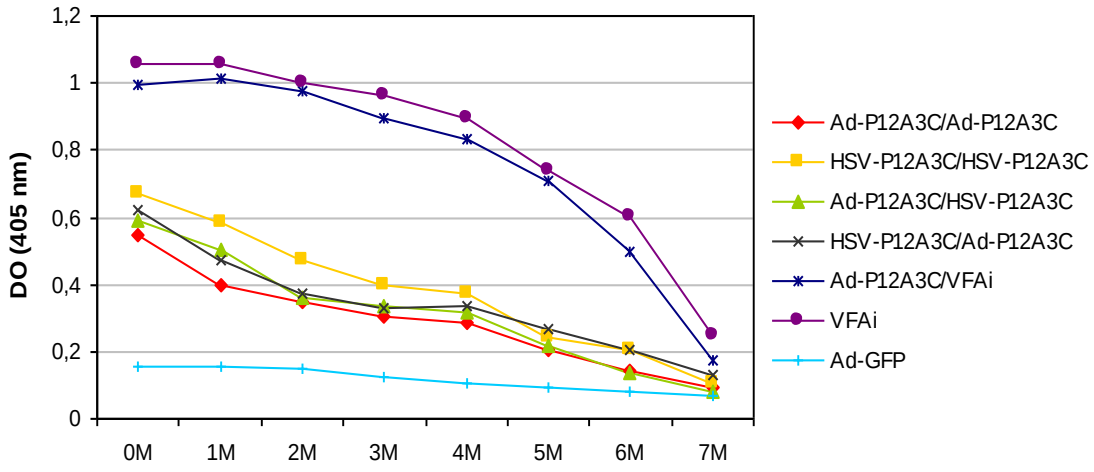


Figura 4.28.A. Análisis de la avidez de los anticuerpos anti-VFA. Gráfico de DO vs. Concentraciones crecientes de urea, de los anticuerpos inducidos por los diferentes candidatos vacunales a los 21 dpr.

A partir de cada curva del gráfico anterior, se calcularon los índices de avidez (IA) como la concentración de urea necesaria para desplazar al 50% de los Acs que estaban unidos inicialmente en la placa de ELISA.

Como se puede observar en la Figura 4.28.B, los sueros de los animales que recibieron 2 dosis de Ad-P12A3C fueron los que, con mayor facilidad, resultaron desplazados por la urea. La mitad del total de los Acs unidos fue desplazada con una concentración de 0,5M de Urea. Cuando se siguió un esquema heterólogo de inmunización, ya sea Ad-HSV o HSV-Ad, el 50% de los anticuerpos permanecieron unidos a la placa con una concentración 1M de urea. Por otro lado, el uso de 2 dosis de HSV-P12A3C incrementó al doble la avidez de los sueros (urea 2M).

Los anticuerpos que presentaron un mayor índice de avidez fueron los inducidos por la inoculación con Ad-P12A3C/VFAi y con dos dosis de VFAi (urea 6M).

B.

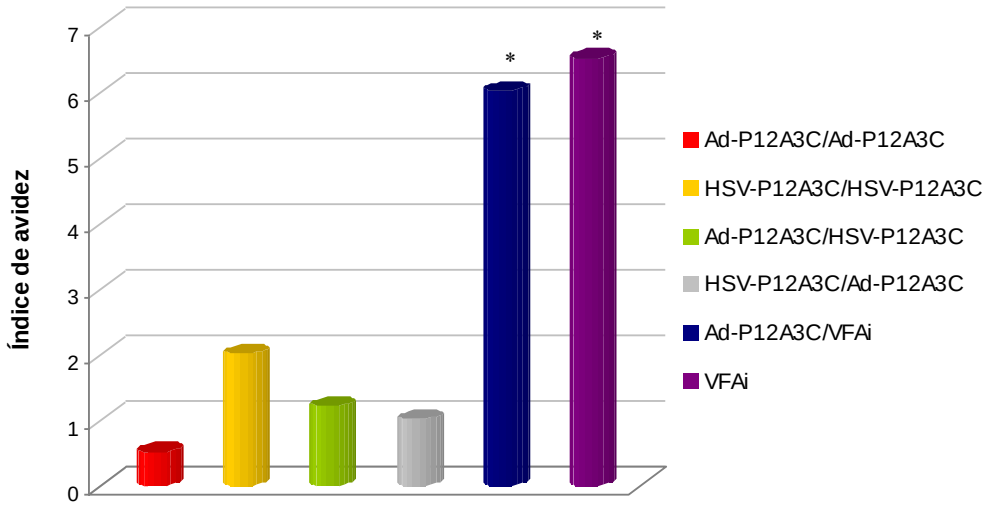


Figura 4.28.B. Análisis de avidez de los anticuerpos anti-VFA. A partir de las curvas obtenidas en el gráfico de la parte A, se calcularon los índices de avidez de los anticuerpos anti-VFA para cada grupo inmunizado, como la concentración de urea necesaria para reducir la DO en un 50%. Los asteriscos indican la existencia de una diferencia significativa entre los grupos marcados respecto a los demás grupos analizados ($p<0,05$).

4.10. Análisis de la respuesta inmune celular

4.10.1. Ensayos de linfoproliferación

Para evaluar la respuesta inmune celular inducida por los diferentes prototipos vacunales, se realizó un ensayo de linfoproliferación.

Como se puede observar en la Figura 4.29, todos los grupos inmunizados con las distintas formulaciones vacunales, a excepción del grupo inoculado con Ad-

P12A3C/Ad-P12A3C, tuvieron un aumento significativo en el índice de proliferación de linfocitos T comparado al grupo control, inoculado con Ad-GFP ($p<0,05$).

Los mayores IE fueron detectados en los grupos inoculados con 2 dosis de VFAi, seguido por los ratones inmunizados con Ad-P123C/VFAi y Ad-P12A3C/HSV-P12A3C.

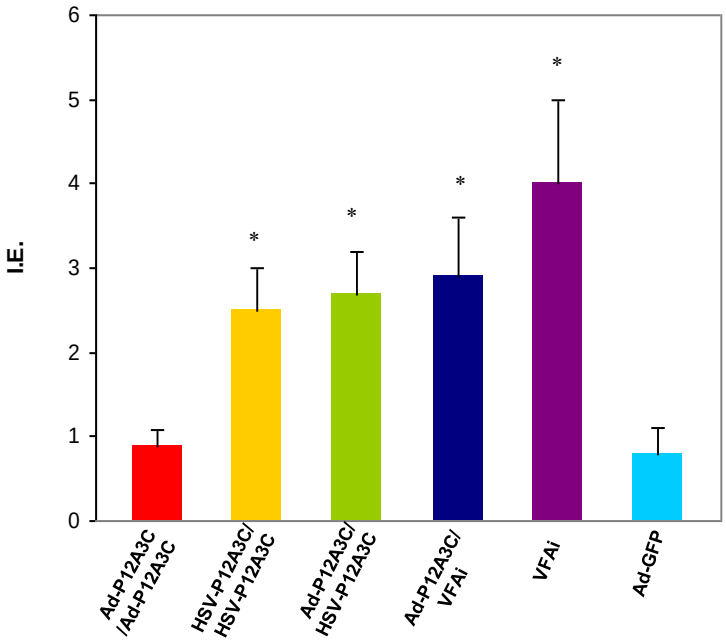


Figura 4.29. Ensayo de Linfoproliferación. Grupos de ratones fueron inmunizados con 2 dosis de los diferentes candidatos vacunales combinados según se indica en la Figura. A las 21 dpr se cultivaron las células de bazo, por triplicado, y se estimularon con antígeno O1/Campos (40 μg/ml). A las 48 h se incorporó ^{3}[H] Timidina y se determinó el índice de estimulación (IE). Los valores son representativos de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican la existencia de una diferencia significativa de los I.E. entre los grupos marcados comparados con los grupos Ad-P12A3C y Ad-GFP ($p<0,05$).

4.10.2. Detección del ARNm de citoquinas por RT-PCR semi-cuantitativa

Para analizar el perfil de la respuesta inducida por la inmunización con los distintos prototipos vacunales, se monitoreó la expresión del ARNm de distintas citoquinas representativas de una respuesta Th1 o Th2, mediante una RT-PCR semi-cuantitativa.

Para ello, se incubaron en una placa de 6 pocillos, células de bazo provenientes de los distintos ratones inmunizados. Luego, las células se estimularon con antígeno O1/Campos purificado (40 μg/ml), o con medio de cultivo y a las 24 h se extrajo el ARN total. Previo al tratamiento con la enzima ADNasa, se sintetizó primero el ADNc utilizando los primers reversos de cada citoquina y luego, se realizó la PCR con los primers específicos de cada gen (Tabla 3, M y M). Se amplificaron los genes correspondientes a las diferentes citoquinas (IL-2, IL-4, IFNγ) y al gen interno GAPDH.

En la Figura 4.30.A, se muestran los distintos productos de PCR obtenidos luego de analizar las muestras en un gel de agarosa 1,5%.

Comparando los niveles de ARNm obtenidos para cada grupo, se puede observar, como una primera aproximación, que tanto los animales inmunizados con un

esquema de tipo homólogo u heterólogo de vectores virales o combinados con el VFAi, mostraron niveles semejantes en la acumulación de ARNm de las citoquinas IL-2, IL-4 e IFNγ analizadas. En cambio, los ratones que fueron inoculados con 2 dosis del VFAi mostraron bajos niveles de IL-2 e IFNγ y altos niveles de IL-4.

No se detectó ARNm correspondiente a ninguna citoquina en cultivos de células de bazo en ausencia de antígeno (datos no mostrados).

A.

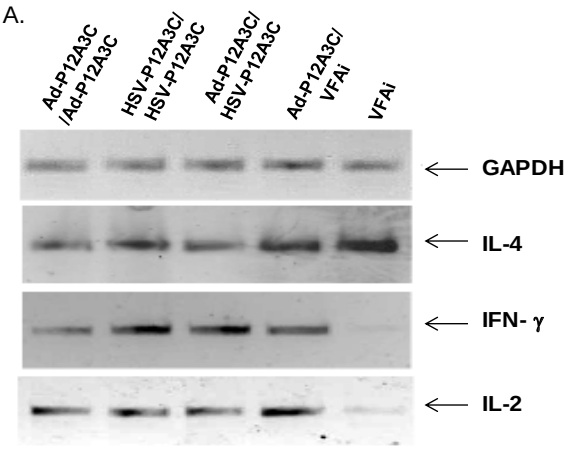


Figura 4.30.A. Detección del ARNm de distintas citoquinas y GAPDH por RT-PCR. A los 21 dpr, se extrajeron células de bazo de los distintos grupos de ratones inmunizados. Luego de 24 h de estimulación con antígeno O1/Campos purificado (40 µg/ml), se extrajo el ARN total y se sintetizó el ADNc con el primer específico de orientación reversa. Luego se realizó la PCR con los primers específicos de las citoquinas listadas a la izquierda de la figura y GAPDH.

La densidad de cada banda se analizó utilizando el software Image J. Cada dato se normalizó con la banda correspondiente al producto de amplificación del gen de GAPDH y se graficó, para cada grupo de ratones inmunizados, la expresión relativa del ARNm de las citoquinas específicas.

B.

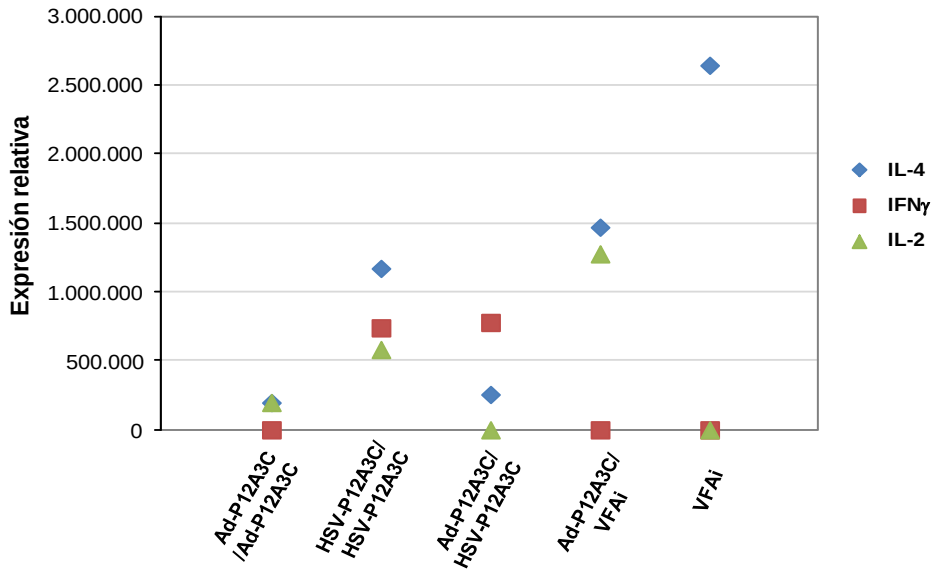


Figura 4.30.B. Expresión relativa de los ARNm de distintas citoquinas obtenidos por RT-PCR. Se analizó la densidad de cada banda mostrada en la Figura 4.30.A utilizando el software Image J. Se tomaron los valores de GAPDH para normalizar los datos obtenidos y se graficó la expresión relativa de las distintas citoquinas en cada grupo inmunizado.

Para el grupo inmunizado con Ad-P12A3C/Ad-P12A3C se obtuvieron los mismos niveles de expresión del ARNm correspondiente a las 3 citoquinas estudiadas. En cambio el grupo inmunizado con 2 dosis de HSV-P12A3C, indujo mayores niveles de ARNm en general y en particular de IL-4 (aproximadamente el doble que IL-2 e IFNγ). En contraposición, para el grupo inoculado con Ad-P12A3C/HSV-P12A3C, se observa una menor acumulación de ARNms de IL-4 e IL-2. Finalmente, para el grupo Ad-P12A3C/VFAi, se obtuvieron altos niveles de expresión de IL-4 e IL-2, mientras que para el grupo inmunizado con dos dosis de VFAi, se obtuvo solamente acumulación del ARNm de IL-4, como claramente se observó desde el gel de agarosa.

4.11. Desafío con virus vivo y medición de viremia

Para evaluar la eficacia de las diferentes formulaciones vacunales para proteger a los ratones adultos frente a la infección con virus vivo, se realizaron ensayos de desafío.

A los 21 dpr, los animales fueron inoculados con 10^4 $DICT_{50}$ del VFA cepa O1/Campos por vía i.p. y luego de 24 h fueron sangrados. Los animales fueron considerados completamente protegidos cuando monocapas de células BHK-21 no presentaron ECP luego de dos pasajes ciegos (viremia no detectada). En el caso de que se detectara ECP, los títulos de virus se determinaron inoculando diluciones de muestras de sangre entera sobre células BHK-21.

Los resultados de protección se muestran en la Figura 4.31.A. Se lograron porcentajes de protección total importantes en los grupos inmunizados con Ad-P12A3C/HSV-P12A3C, Ad-P12A3C/VFAi y con dos dosis del VFAi.

Como se puede observar en la Figura, en los grupos que recibieron una primera dosis de Ad-P12A3C y un refuerzo con VFAi o HSV-P12A3C, de un total de 4 ratones desafiados, 3 resultaron protegidos frente al desafío viral (75% de protección). En el grupo inoculado con dos dosis de Virus inactivo, 2 ratones resultaron protegidos de un total de 3 (66,7% de protección) y en los grupos inoculados con dos dosis de Ad-P12A3C o de Ad-GFP ningún ratón resultó protegido.

Consistente con estos resultados, no se logró recuperar virus infectivo de las muestras de sangre provenientes de estos tres grupos anteriormente mencionados (Figura 4.31.B). En cambio, en la sangre de los ratones inmunizados con dos dosis de Ad-P12A3C o de Ad-GFP, se obtuvieron títulos virales de aproximadamente 2 .10^4 DICT/ml.

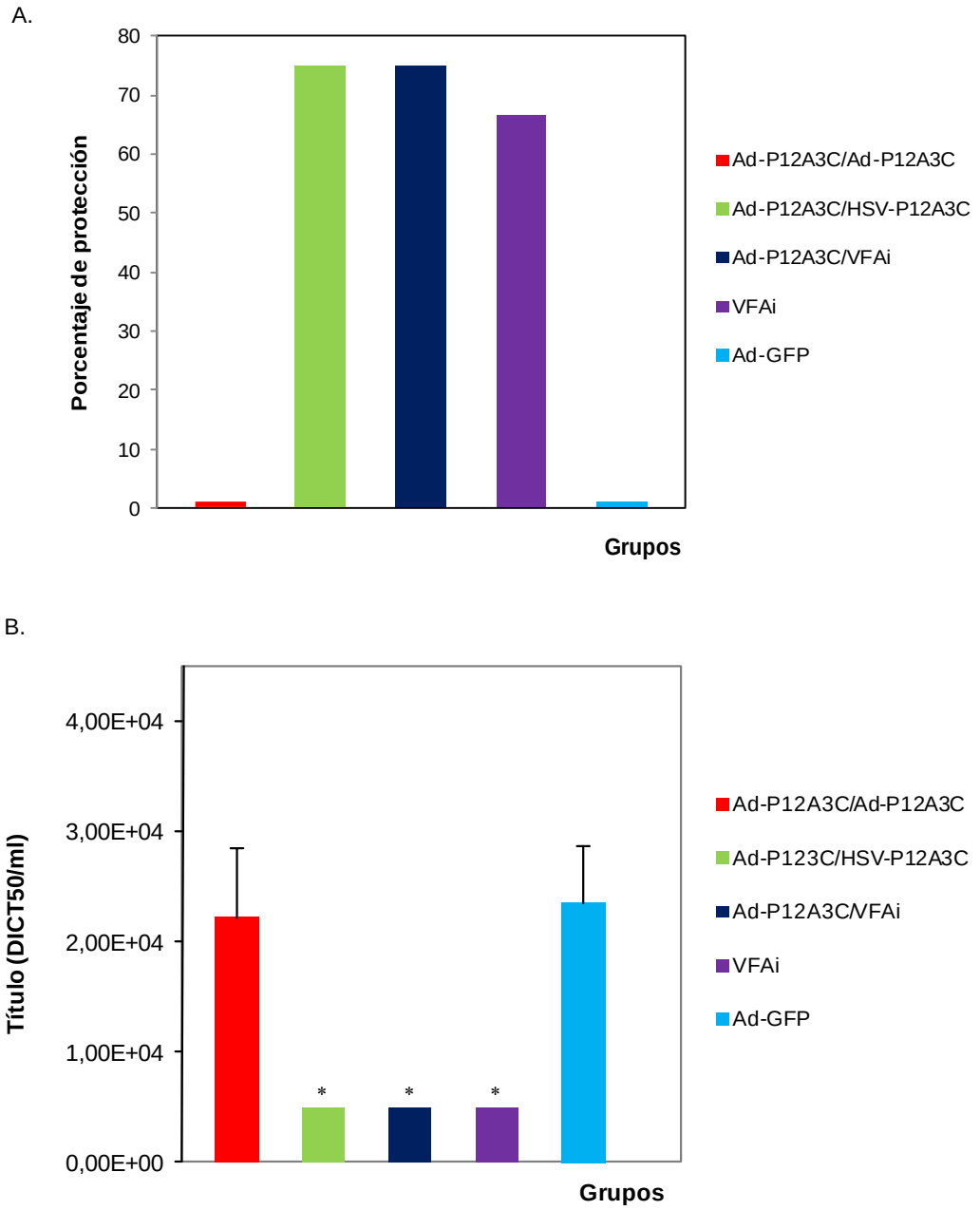


Figura 4.31. **Porcentaje de protección y medición de viremia post desafío con virus vivo de ratones inmunizados con los Ad recombinantes.** Panel A: Porcentaje de protección estimados luego de dos pasajes ciegos en células BHK-21 (número de ratones sin viremia detectada/ total de ratones desafiados, por grupo) x100. Panel B: Medición de la viremia sobre células BHK-21 a las 24 hs post desafío. Los asteriscos indican la existencia de una diferencia significativa en el título de viremia entre los grupos marcados respecto al grupo Ad-P12A3C/Ad-P12A3C y Ad-GFP ($p<0,01$).

En otro experimento independiente (Figura 4.32) se midió protección total y/o reducción de viremia post-desafío, de ratones inmunizados con 2 dosis de los vectores amplicón herpéticos.

En el grupo inoculado con dos dosis de HSV-P12A3C, o con dos dosis del VFAi, no se aisló virus infectivo de las muestras de sangre luego de un pasaje ciego

en células BHK-21. En el grupo control de ratones inmunizados con HSV-GFP, se recuperó virus en las muestras de sangre, con un título aproximado de $1{,}2.10^5$ DICT/ml.

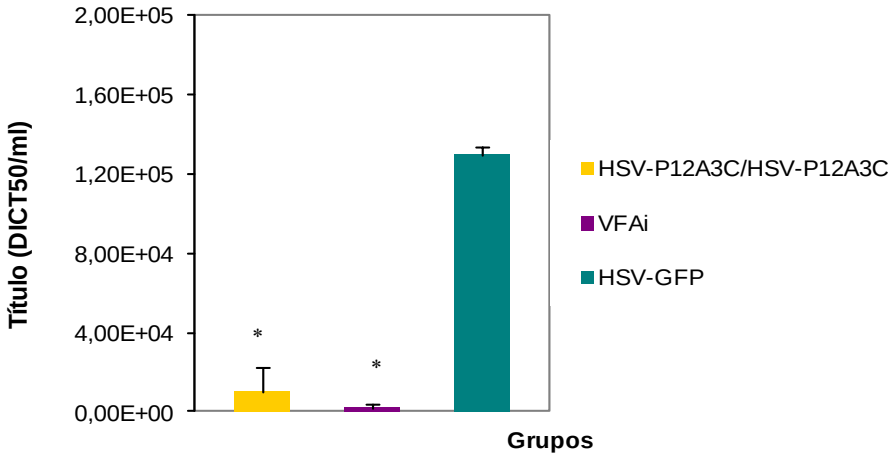


Figura 4.32. Ensayo de desafío y medición de viremia de ratones inmunizados con vectores amplicón. Grupos de ratones BALB/c fueron inmunizados con 2 dosis de HSV-P12A3C y como controles se utilizaron 2 dosis de VFAi y HSV-GFP. A los 21 dpr fueron desafiados con 10^4 $DICT_{50}$ del VFA O1/Campos**.** Se midió la viremia sobre células BHK-21 a las 24 hs post desafío. Los asteriscos indican una significancia estadística en la reducción de la viremia ($p<0{,}05$), entre los grupos indicados comparado al grupo control de HSV-GFP.

De estos resultados se puede concluir, que los candidatos vacunales inoculados en un régimen prime-and-boost heterólogo, ya sea combinando a Ad con HSV o con el VFAi, lograron proteger a los ratones frente a la infección con el VFA vivo con una significativa reducción de la viremia.

Por otro lado, ambos vectores virales administrados bajo un régimen de inmunización homólogo, se comportan diferentes frente al desafío. Los ratones inmunizados con 2 dosis de HSV-P12A3C lograron reducir la viremia en forma significativa respecto al grupo control, en cambio los ratones que recibieron 2 dosis de Ad-P2A3C, no fueron protegidos frente al desafío.

También se midieron anticuerpos neutralizantes en los sueros de los ratones inmunizados, sangrados previamente al desafío, cuyos resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Anticuerpos neutralizantes inducidos por las distintas plataformas vacunales

	Grupos				
Ratón #	**Ad-P12A3C**	**Ad-P12A3C/ HSV-P12A3C**	**Ad-P12A3C/ VFAi**	**VFAi**	**Ad-GFP**
1	<1	<1	1,3 (1:20)	<1	<1
2	<1	1,3 (1:20)	1,068 (1:12)	1,068 (1:12)	<1
3	<1	<1	<1	1,767 (1:60)	<1
4	<1	<1	<1	-	<1

Todos los animales inmunizados con 2 dosis de Ad-P12A3C o de Ad-GFP, presentaron títulos de Acs neutralizantes menores al límite de detección del ensayo.

Los ratones inmunizados con Ad-P12A3C/HSV-P12A3C, Ad-P12A3C/VFAi o con dos dosis de VFAi, que resultaron parcialmente protegidos frente al desafío viral, presentaron títulos de anticuerpos neutralizantes bajos o por debajo del límite de detección, indicando que quizás otro mecanismo podría estar involucrado en la protección obtenida.

4.12. Persistencia de los anticuerpos específicos anti-VFA

Para evaluar la persistencia de los anticuerpos anti-VFA en el tiempo, se inmunizaron ratones con los distintos candidatos vacunales y se sangraron cada 15 días, hasta los 4 meses de aplicada la dosis de refuerzo. Los sueros extraídos en cada sangría se analizaron mediante un ELISA de captura.

La Figura 4.33 muestra la cinética de los títulos de anticuerpos anti-VFA determinada para cada grupo de ratones inmunizados.

Como puede observarse en dicha figura, los niveles de anticuerpos inducidos en los grupos inoculados con dos dosis de Ad-P12A3C (línea roja) o con una dosis de Ad-P12A3C y un refuerzo con HSV-P12A3C (línea verde) aumentaron luego de recibir la dosis de refuerzo, llegando a un nivel máximo a los 15 dpr. Luego los títulos se mantuvieron constantes hasta los 43 dpr (1 mes y medio post refuerzo), seguido a lo cual comenzaron a decaer, alcanzando niveles basales hacia los 88 dpr (3 meses post refuerzo).

En el caso del grupo inoculado con dos dosis de HSV-P12A3C (línea amarilla), los títulos aumentaron inicialmente luego de la dosis de refuerzo y se mantuvieron aproximadamente constantes hasta los 118 dpr.

Para los grupos inoculados con Ad-P12A3C/VFAi (línea azul) y con dos dosis de VFAi (línea violeta) los títulos aumentaron luego de la dosis de refuerzo y se mantuvieron constantes hasta los 58 dpr. Posteriormente, los títulos decayeron medio logaritmo y se conservaron en un nivel constante, siendo más altos que los de los demás grupos, hasta el final del experimento.

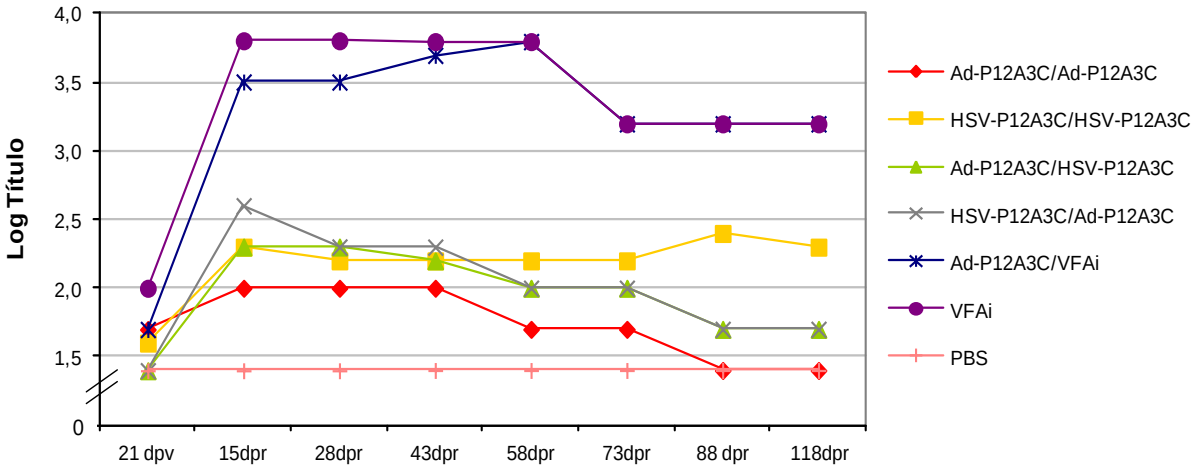


Figura 4.33. Persistencia de los anticuerpos específicos anti-VFA. Grupos de ratones fueron inmunizados con 2 dosis de los diferentes candidatos vacunales y sangrados cada 15 días hasta los 4 meses de recibido la dosis de refuerzo (118 dpr). Para cada sangría se midieron los títulos de anticuerpos específicos anti-VFA por ELISA.

De este experimento se puede concluir que los títulos de anticuerpos específicos anti-VFA en los grupos inmunizados con dos dosis de HSV-P12A3C, con Ad-P12A3C/VFAi y con dos dosis de VFAi, continuaron constantes hasta por lo menos los 4 meses de aplicado la dosis de refuerzo.

4.13. Re-activación de la respuesta inmune luego de una nueva exposición al VFAi

Con el objetivo de analizar si las células B de memoria, presentes en los ratones inmunizados son funcionales in vivo, los distintos grupos de ratones inmunizados y mantenidos por 4 meses post refuerzo, fueron re-inoculados con 0,5 μg de virus inactivado. A los 7 y 24 días de la nueva exposición con el VFAi (dpVFAi), se determinó el título de anticuerpos específicos anti-VFA, isotipo, avidez y el número de células secretoras de anticuerpos.

4.13.1. Medición de anticuerpos totales específicos anti-VFA

En la Figura 4.34 se muestra la cinética de los títulos de los anticuerpos anti-VFA desde el momento en que los animales fueron re-expuestos al virus inactivado (flecha color azul) y hasta los 24 dp exposición al VFAi.

Se observa que al recibir la nueva dosis de virus inactivado a los 4 meses post refuerzo, hay un rápido aumento del título de anticuerpos específicos en todos los grupos analizados, a excepción de los animales inoculados con PBS.

El grupo inmunizado con 2 dosis de HSV-P12A3C, luego de la re-exposición con el VFAi, aumentó el titulo de Acs en un logaritmo. Los animales inmunizados con 2 dosis de Ad-P12A3C, incrementaron los títulos de Acs al doble y por último, los grupos inoculados con una dosis de Ad-P12A3C y un refuerzo con HSV-P12A3C o con el VFAi o el grupo que recibió 2 dosis del VFAi aumentaron los títulos en dos logaritmos y medio luego de la re-exposición con el virus inactivado (Para los grupos Ad-P12A3C/VFAi y VFAi los datos en el gráfico se superponen en la misma línea).

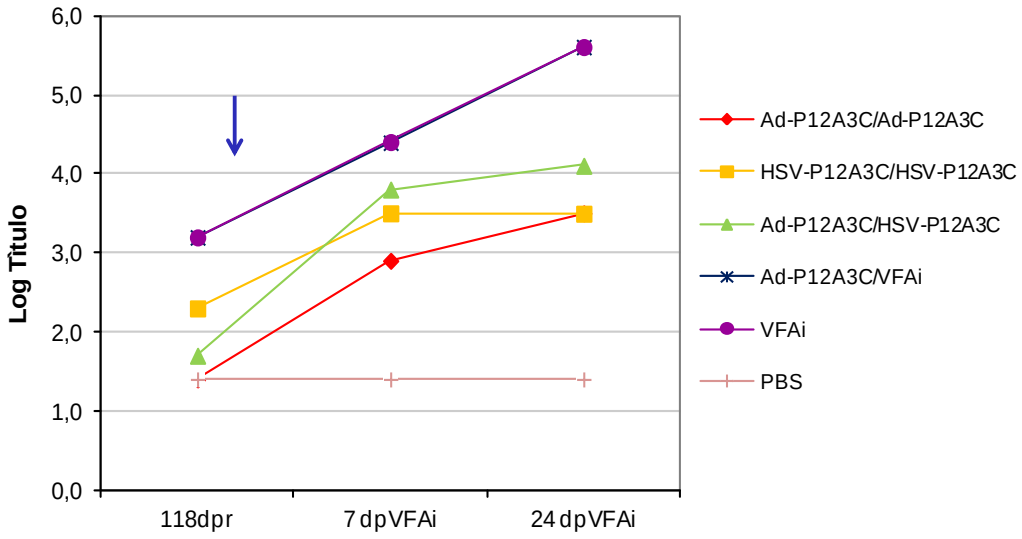


Figura 4.34. Re-activación de la inmunidad humoral frente a una nueva exposición con virus inactivado. Grupos de ratones BALB/c fueron inmunizados con 2 dosis de las diferentes plataformas vacunales. A los 4 meses post refuerzo, se les aplicó una dosis de VFAi y se midieron los títulos de anticuerpos totales anti-VFA a los 7 y a los 24 días post nueva exposición con virus (dpVFAi). La flecha azul indica el momento de la re-vacunación.

Esta rápida inducción de los anticuerpos anti-VFA en los animales que fueron re-expuestos al VFAi luego de los 4 meses de aplicado la dosis de refuerzo, indicaría que las células B de memoria, generadas durante la primo inmunización, son funcionales in vivo.

4.13.2. Detección de células secretoras de anticuerpos específicos anti-VFA

El mayor título de Acs que muestran algunos grupos puede deberse a que presentan un mayor número de células secretoras de anticuerpos (ASC) o bien, a un mismo número de ASC que secretan una mayor cantidad de anticuerpos de acuerdo al inmunógeno utilizado en la inmunización.

En un ensayo de ELISPOT, se comparó las ASC por cada millón de células de bazo obtenidas a los 21 dpr (barras de color rojo) o después de la re-exposición con el VFAi (barras de color verde).

En el panel A de la Figura 4.35, se graficó el promedio de los spots por grupo por cada millón de células de bazo, con sus respectivos errores estándar.

A.

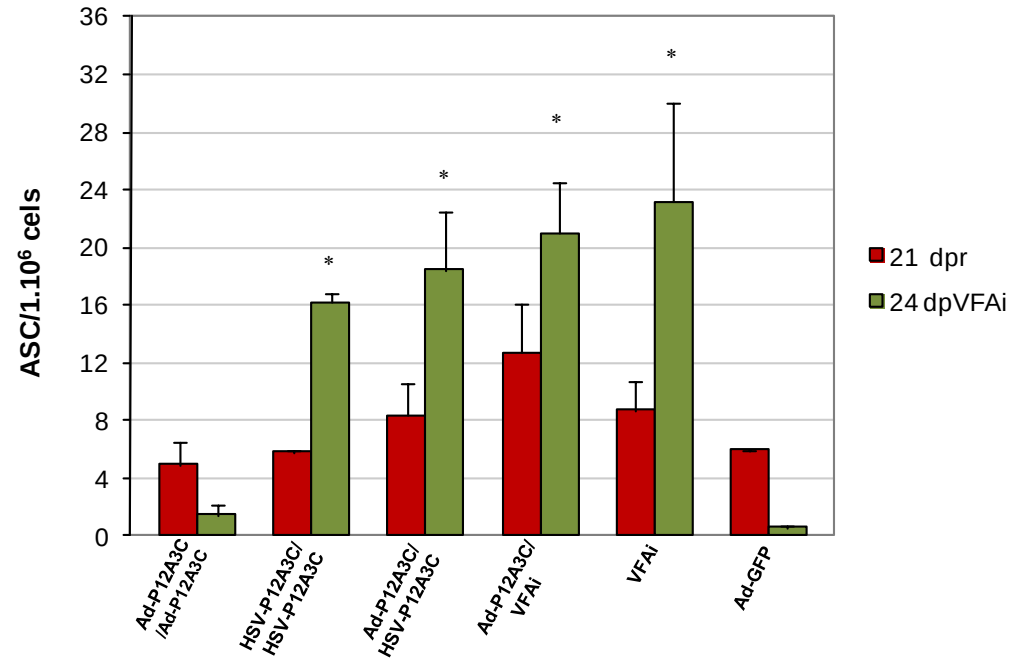


Figura 4.35.A. Cuantificación de ASC anti-VFA. Se midió el número de células secretoras de anticuerpos específicos anti-VFA utilizando la técnica de ELISPOT a los 21 dpr y a los 24 dpVFAi. Se graficó el promedio de spots obtenidos por grupo inmunizado por cada 1.10^6 de células de bazo sembradas en la placa. Los asteriscos indican una diferencia significativa de las ASC entre los grupos marcados respecto a los grupos Ad-P12A3C/Ad-P12A3C y Ad-GFP ($p<0,05$).

Si se compara solo las ASC obtenidas a los 21 dpr, se puede observar que no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos grupos inmunizados.

Sin embargo, luego de la re-exposición con el VFAi, aproximadamente a los 4 meses de haber recibido la dosis de refuerzo, los grupos inmunizados con 2 dosis de HSV-P12A3C, con una dosis de Ad-P12A3C y un refuerzo con HSV-P12A3C o con el VFAi, o con 2 dosis del VFAi aumentaron en más del doble el número de células

productoras de anticuerpos específicos anti-VFA. Los incrementos observados para estos grupos fueron significativamente mayores a los de los grupos inmunizados con 2 dosis de Ad-P12A3C o Ad-GFP.

Este resultado se ve representado, a modo ilustrativo, en el panel B de la Figura 4.35, donde se muestran fotos de los spots obtenidos. Se puede observar el aumento del número de las ASC, luego de la re-exposición al VFAi, en el grupo de ratones inmunizados con Ad-P12A3C/VFAi y caso contrario la reducción de spots para el grupo Ad-GFP.

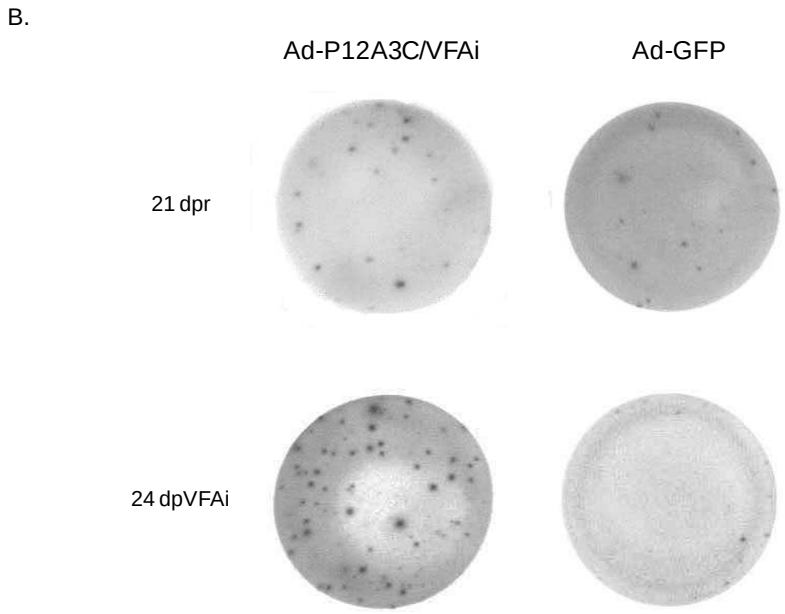


Figura 4.35.B. Cuantificación de ASC anti-VFA. Se muestran imágenes de los spots obtenidos para Ad-P12A3C/VFAi y Ad-GFP antes y después de la re-exposición con el VFAi.

A partir de estos resultados se puede concluir, que luego de la re-estimulación con el VFAi, las ASC específicas anti-VFA se duplicaron en todos los grupos estudiados, a excepción del grupo inmunizado con 2 dosis de Ad-P12A3C, confirmando que las células B de memoria son funcionales in vivo.

4.13.3. Estudio del isotipo de los anticuerpos anti-VFA

Para evaluar la relación entre los isotipos de IgG luego de la re-estimulación, se midieron los títulos de las inmunoglobulinas específicas anti-VFA de los isotipos IgG1 e IgG2a presentes en los sueros de los ratones inmunizados y se graficó el

balance IgG1/IgG2a, para cada grupo, a los 7 dpVFAi (barras de color verde) y se los comparó con los títulos obtenidos a los 21 dpr (barras de color rojo).

Como se puede observar en la Figura 4.36, luego de la re-exposición al VFAi, en todos los grupos aumentó la proporción de Acs del isotipo IgG1 respecto de la relación de isotipos obtenida a los 21 dpr, a excepción del grupo inoculado con dos dosis de VFAi, donde la nueva dosis de virus produjo un aumento de la fracción de Acs de isotipo IgG2a.

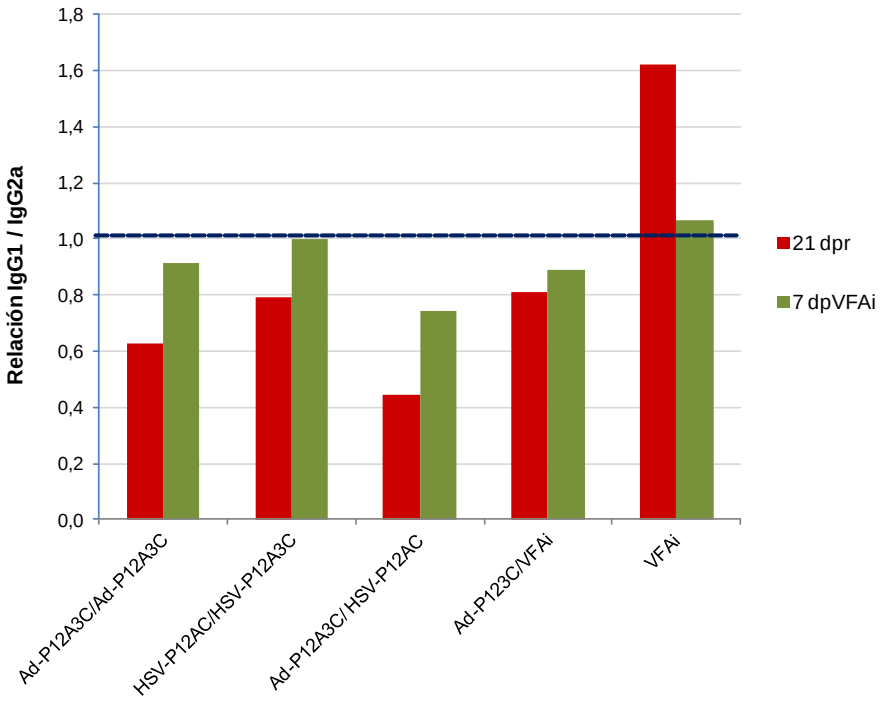


Figura 4.36. Relación IgG1/IgG2a de los Acs generados a los 21 dpr y a los 7 dpVFAi. Se midieron los títulos de las inmunoglobulinas específicas anti-VFA de los isotipos IgG1 e IgG2a presentes en los sueros de los ratones inoculados con los diferentes candidatos vacunales y re-expuestos al virus inactivado luego de 4 meses de la dosis de refuerzo. Se calculó la relación IgG1/IgG2a para cada grupo a los 21 dpr y a los 7 dpVFAi.
La línea punteada indica una respuesta balanceada.

En los grupos inoculados con Ad-P12A3C/Ad-P12A3C y HSV-P12A3C/HSV-P12A3C la exposición al VFAi balanceó la respuesta de Acs de distinto isotipo.

Sin embargo, para los grupos inmunizados con la combinación heteróloga de vectores virales o con Ad-P12A3C/VFAi, la respuesta después de la nueva exposición al virus inactivado siguió siendo la misma que a los 21 dpr, con predominio de Acs de isotipo IgG2a.

Por último, en el grupo inoculado con 2 dosis de VFAi, se observó un aumento de la fracción de Acs del isotipo IgG2a, pasando de una respuesta predominante de

Acs de isotipo IgG1 (obtenida a los 21 dpr) a una respuesta balanceada luego de la re-exposición al VFAi.

4.13.4. Estudio de la avidez de los anticuerpos anti-VFA

Por otro lado, también se compararon los índices de avidez de los anticuerpos presentes en los sueros de los ratones inmunizados, que fueron sangrados antes y después de la nueva exposición al VFAi.

En la Figura 4.37, se graficaron los IA comparando, cada grupo inmunizado con los distintos candidatos vacunales, a los 118 dpr (barras de color rojo) y a los 7 dp estimulación con VFAi (barras de color verde).

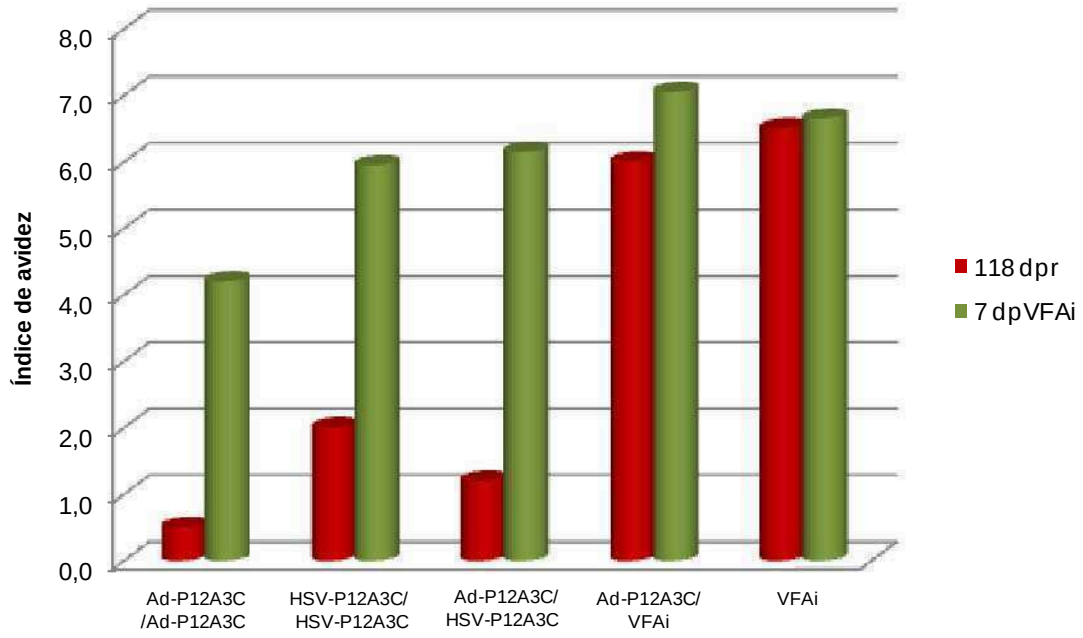


Figura 4.37. Análisis de la avidez de los anticuerpos anti-VFA a los 118 dpr y luego de la re-exposición con VFAi. Grupos de ratones fueron inmunizados con las distintas plataformas vacunales y mantenidos por 4 meses post refuerzo seguido a lo cual, fueron re-expuestos al VFAi. A los 118 dpr y a los 7 dpVFAi se hizo un ELISA de avidez comparando los IAs de los Acs obtenidos en cada sangría, para cada grupo inmunizado.

Para todos los grupos inoculados con vectores virales, se observó un incremento significativo en el IA respecto al valor obtenido antes de la re-exposición al VFAi. Específicamente, para el grupo inoculado con dos dosis de Ad-P12A3C hubo un incremento de 7 veces en el IA respecto al índice obtenido a los 118 dpr. Por otro lado, el grupo inmunizado con dos dosis de HSV-P12A3C aumentó el IA al doble y con la combinación heteróloga de vectores virales se obtuvo un incremento de 5 veces en el IA respecto al valor obtenido antes de la re-exposición al VFAi. Por último, en los

grupos inoculados con Ad-P12A3C/VFAi o con 2 dosis del VFAi no hubo cambios significativos en la avidez.

Estos resultados permiten concluir, que una nueva exposición al VFAi, no solamente produjo una rápida y mayor inducción de anticuerpos específicos anti-VFA en los grupos vacunados con los vectores virales sino que además dichos Acs presentaron mayor avidez, demostrando de esta manera que se produjo una maduración de la respuesta inmune.

4.14. Desafío con virus vivo, luego de 4 meses post refuerzo

Por último, para evaluar si la respuesta de memoria generada por la primo inmunización es capaz de proteger a los ratones frente al virus vivo, se desafió un nuevo grupo de ratones inoculados con la combinación Ad-P12A3C/HSV-P12A3C, a los 4 meses de aplicada la dosis de refuerzo, con 10^4 $DICT_{50}$ del VFA cepa O1/Campos por vía i.p. A las 24 h, se analizó la viremia en células BHK-21.

En ninguna de las muestras provenientes de los 4 ratones inmunizados con Ad-P12A3C/HSV-P12A3C se recuperó virus luego de dos pasajes ciegos, es decir que hubo protección total, en cambio las muestras provenientes de los ratones del grupo control, inoculados con Ad-GFP, presentaron títulos de virus de alrededor de $2 .10^4$ $DICT_{50}$/ml (Figura 4.38).

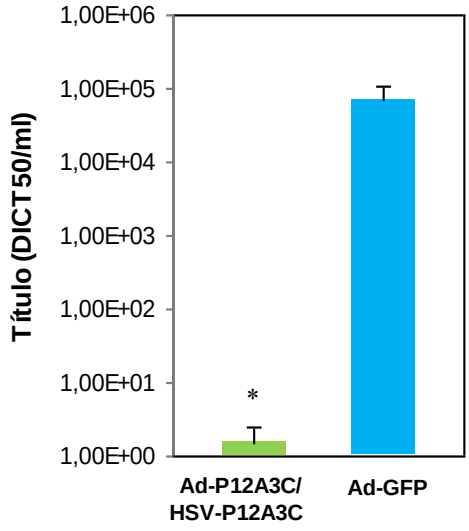


Figura 4.31. **Medición de viremia en ratones inmunizados con Ad-P12A3C/HSV-P12A3C luego de 4 meses post refuerzo.** Grupos de ratones BALB/c fueron inmunizados con 2 dosis de Ad-P12A3C/HSV-P12A3C y a los 4 meses post refuerzo fueron desafiados con 10^4 $DICT_{50}$ del VFA O1/Campos**.** El asterisco indica la existencia de una diferencia significativa en la reducción de la viremia ($p<0,01$), entre el grupo indicado y el control Ad-GFP.

Estos resultados proveen evidencia que la inmunización con Ad-P12A3C como primera dosis y HSV-P12A3C como dosis de refuerzo sería una efectiva combinación de inmunógenos capaces de inducir inmunidad protectiva a mediano plazo contra el VFA en ratones.

DISCUSIÓN

5. DISCUSION

Actualmente, las estrategias de prevención y control de la FA en Argentina y el cono Sur de America incluyen el sacrificio (rifle sanitario) de animales infectados o expuestos y la vacunación con virus inactivado químicamente. Las vacunas inactivadas han resultado muy eficaces en la lucha contra la enfermedad. El desarrollo de vacunas recombinantes, potencialmente seguras es una alternativa que ha sido extensamente explorada pero aún no tienen la efectividad de las vacunas convencionales. Sin embargo, los resultados obtenidos en varios laboratorios alientan el desarrollo de vacunas de nueva generación, ya sea de subunidad, genéticas o aquellas que utilizan vectores virales defectivos que portan antígenos del VFA (Doel, 2003); (Grubman, 2005). Uno de los motivos de mayor peso que alientan el desarrollo de vacunas recombinantes es evitar el cultivo del virus de la FA, tanto por el riesgo de escape como por lo costoso de las instalaciones requeridas con Bioseguridad de nivel 4 OIE (o NBS 3Agricultura). A esto se suma la necesidad de poder diferenciar con rapidez animales infectados de vacunados, en especial en los países que vacunan sistemáticamente y/o que tienen campañas activas de erradicación.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo de tesis, fue emplear distintos sistemas de expresión de inmunógenos del VFA, como por ejemplo vacunas génicas y vacunas derivadas de vectores virales no replicativos, explorando su combinación en protocolos de inmunización de tipo *prime-and-boos*t heterólogo, es decir primando el sistema inmune con un vector y dando refuerzos con los mismos antígenos expresados a través de un vector distinto.

Con respecto a los vectores utilizados, el vector amplicón herpético se desarrolló a través de una colaboración de nuestro laboratorio con la Universidad de Zurich (Dr. Cornel Fraefel). Por otro lado, la utilización de Adenovirus ha sido ampliamente descripta en la literatura ((Mayr et al., 1999); (Moraes et al., 2003); (Pacheco et al., 2005); (Grubman, 2005); entre otros) para otros serotipos del VFA. Para este trabajo, se construyó un vector adenoviral portando las secuencias codificantes para las proteínas capsidales de una cepa de serotipo O, a partir de un kit comercial de Invitrogen. En el caso de la vacuna a ADN, se eligió el vector pCI en lugar del clásico vector pcDNA 3.1 (Chinsangaram et al., 1998); (Cedillo-Barron et al., 2001), ya que presenta una región intrónica río arriba del transgen, que aumentaría los niveles de expresión (Gross et al., 1987); (Buchman and Berg, 1988); (Evans and Scarpulla, 1989); (Huang and Gorman, 1990).

La idea básica era contar con vectores nuevos (vectores amplicón de HSV), y otros que ya habían sido utilizados en forma individual (Ad, pCI-Neo, SFV), para estudiar su uso en forma combinada, desarrollando nuevas estrategias de vacunación.

En los modelos vacunales utilizados en este trabajo se trabajó con la secuencia de la poliproteína P1 del VFA, cepa O1/Campos, clonada en tándem a la proteína 2A, y a la proteasa viral 3C para garantizar el correcto procesamiento de la misma.

5.1. Generación de vectores que expresan proteínas estructurales del VFA

En el curso del presente trabajo se lograron expresar en células de mamífero (*in situ*) las proteínas estructurales del virus de la Fiebre Aftosa, mediante el uso de dos sistemas derivados de vectores virales no replicativos, herpesvirus (HSV-1) y adenovirus (Ad) y de un vector genético convencional, el pCI-Neo.

En los tres casos, la poliproteína P1 fue correctamente procesada por la proteasa 3C ya que fue posible detectar con sueros específicos la presencia de VP1, VP3 y VP0.

A diferencia de los vectores de Ad que son capaces de replicar en células HEK293A a altos títulos, los amplicones de HSV no replican en células Vero2.2. Sin embargo en este trabajo se detectaron mayores niveles de expresión de las proteínas del VFA con el sistema basado en vectores amplicón herpéticos. Esto se debe posiblemente, a que estas partículas pueden empaquetar hasta 150 Kpb de ADN heterólogo por el sistema de replicación de círculo rodante, por lo que es posible incluir múltiples copias de plásmido amplicón en las partículas de HSV (Kwong and Frenkel, 1984). En nuestro caso, cada partícula de vector amplicón formada, contendría aproximadamente 15 copias del plásmido amplicón y por lo tanto del transgen (3,2 Kpb del transgen, P12A3C sumado a los 7 Kpb del plásmido amplicón) en comparación a la única copia que contienen los otros vectores.

En el caso de los vectores amplicón, se pudo demostrar la generación *in situ* de VLPs (subunidades 75S) en células de mamífero infectadas con HSV-P12A3C. Además de subunidades 75S, se detectaron 12S y un componente mayoritario e inusual con una velocidad de sedimentación intermedia entre ambas, 20S. Estas 3 formas particuladas fueron aisladas por gradientes de sacarosa y visualizadas por microscopia electrónica. Una cuantificación preliminar en las condiciones usadas indicó un rendimiento de 5 VLPs por célula infectada.

Experimentos de co-inmunoprecipitación revelaron que en las subunidades 75S están presentes VP1; VP3 y VP0. Más aún, en experimentos de caracterización

frente a paneles de anticuerpos monoclonales, que reconocen epitopes conformacionales (Seki et al., 2009), la reactividad fue similar a la del virus entero, de lo que se infiere que en las VLPs generadas las proteínas adquieren una conformación antigénica similar a la de la partícula viral nativa.

Cabe destacar que esta es la primera vez que se utilizan vectores herpéticos para inmunización y *delivery* de antigenos del VFA, ya que si bien su desarrollo es de larga data se han utilizado fundamentalmente en terapia génica (Marconi et al., 2008); (Epstein, 2005). Los vectores amplicón fueron diseñados para proveer un alto perfil de seguridad dado que no expresan ningún gen viral y se empaquetan en un sistema libre de virus colaborador (*helper free*), lo que lo diferencia de otros sistemas similares que utilizan herpesvirus defectivos (Saeki et al., 2001). Sin embargo, esta cualidad representa una desventaja a la hora de producir estos vectores amplicón, ya que no es posible amplificar los stocks y los títulos obtenidos son bajos (1-5 x 10^6 UT/ml).

La respuesta inmune (descripta en detalle mas abajo) fue producida principalmente por proteínas generadas *de novo* en las células infectadas, ya que la inoculación de ratones con los vectores inactivados no indujo una respuesta de anticuerpos detectable anti-VFA, aún con agregado de adyuvante. Por otro lado, con estos amplicones se observaron anticuerpos de subclases IgG1 e IgG2a sugiriendo la generación de una respuesta mixta Th1-Th2 en ratones. Esto puede deberse a la habilidad de los vectores de producir además de proteínas intracelulares, proteínas solubles extracelulares.

Se investigó la reacción inflamatoria y la expresión *in situ* de las proteínas virales VP1 y VP3 en tejido muscular y nódulo linfático poplíteo de ratones inoculados con HSV-P12A3C. Las células del nódulo se tiñeron positivamente a las 48 hs con anticuerpos α-VP1 y α-VP3. Se observaron reacciones inflamatorias en los animales inoculados con HSV-P12A3C, las que parecieran ser debidas a la inyección *per se*, ya que se detectaron también en el control negativo inoculado con PBS.

Por otro lado, no fue posible detectar la expresión de las proteínas estructurales del VFA a través del vector derivado del alfavirus Semliki Forest, en el que solamente se logró expresar la proteína heteróloga GFP. La expresión de la poliproteina P1 de una cepa del VFA de origen chino en SFV, fue reportada por Yu et al, (Yu et al., 2006). En este caso el vector contenía solo las secuencias de la cápside, pero no la proteasa 3C.

En este trabajo, en células transfectadas con SFV-P12A3C, se pudo confirmar una disminución en la acumulación de los niveles de ARN anti-genómico y la falta de expresión de al menos una de las subunidades de la polimerasa del SFV (nsP1).

Aparentemente, la presencia de las proteínas de aftosa procesadas o la presencia de proteasa 3C podrían estar interfiriendo de alguna forma desconocida en el sistema, ya que sí se detectó expresión de otra proteína heteróloga, GFP, cuando se transfectaron células con el plásmido pSFV-GFP, así como replicación del vector vacío.

5.2. Estrategias de vacunación

Con las vacunas recombinantes disponibles (HSV-P12A3C, Ad-P12A3C y pCI-P12A3C), se procedió a estudiar la respuesta inmune generada utilizando estrategias de tipo *prime-and-boost* homólogo y heterólogo combinando los distintos vectores, así como también la vacuna convencional a virus inactivado (VFAi) en formulación oleosa.

En este estudio preliminar, se utilizaron ratones BALB/c para analizar la respuesta inmune a múltiples vectores y regímenes de inmunización. El manejo de un alto número de grupos experimentales aumenta significativamente el número de animales necesarios para los ensayos, lo que constituye un requerimiento difícil de lograr usando bovinos. Por otro lado, el modelo ratón (incluyendo las cepas BALB/c y C57BL/6) ha sido ampliamente utilizado para estudios de patogénesis y de la inmunobiología de la infección con el VFA (Salguero et al., 2005); (Wigdorovitz et al., 1999a); (Wigdorovitz et al., 1999b); (Tami et al., 2004).

Las estrategias de tipo *prime-and-boost* heterólogo emergieron como una herramienta poderosa para establecer inmunidad celular por medio de la generación de niveles elevados de células T de memoria (Ramshaw and Ramsay, 2000). La misma involucra presentar al sistema inmune (*prime)* el antígeno blanco en un vector y luego hacer una reactivación de esta inmunidad *(boost)* re-administrando el mismo antígeno pero presentado en el contexto de un vector distinto. Esta metodología ha resultado ser excelente para obtener respuestas intensas y de largo plazo (Woodland, 2004); (Liang et al., 2006); (Davtyan et al., 2010); (Vaine et al., 2010); (Duke et al., 2007) y para sortear limitaciones por inmunidad preexistente a los vectores virales utilizados. Así también, en el *prime-and-boost* homólogo se suelen generar anticuerpos dirigidos contra el vector viral utilizado en el primado que conducen a un detrimento en la calidad de la respuesta específica contra el antígeno (Sprangers et al., 2003).

En este trabajo, se eligió realizar el *priming* con el vector Ad, dado que a pesar de no haber encontrado una buena respuesta inmune en ratones, ofrecía la posibilidad de mejorarla con distintos tipos de refuerzo, siendo además un vector que ha sido

ampliamente utilizado en trabajos de otros autores (Mayr et al., 1999); (Moraes et al., 2003); (Pacheco et al., 2005); (Grubman, 2005).

En general, la vacunación heteróloga con vectores virales fue más efectiva en inducir una respuesta inmune anti-VFA, tanto humoral como celular, que el *prime-and-boost* homólogo.

Los títulos más altos de Acs específicos α-VFA correspondieron a los animales vacunados con 2 dosis de VFAi, utilizados como referencia. Pero fueron significativamente altos cuando los ratones primados con Ad-P12A3C recibieron una dosis de refuerzo con HSV-P12A3C o VFAi.

Cabe destacar que los vectores virales derivados de Ad o HSV fueron utilizados sin adyuvante. En cambio, el VFAi fue usado en una dosis alta (1 μg) y formulado en adyuvante oleoso. A pesar de esto, en la medición de viremia post desafío, los regímenes Ad-P12A3C/HSV-P12A3C, Ad-P12A3C/VFAi y 2 dosis de VFAi fueron prácticamente iguales en eficacia.

Los regímenes de inmunización con vectores generaron respuestas con predominio de Acs de isotipo IgG2a, sugiriendo un sesgo hacia una respuesta de tipo Th1, mientras que en la inoculación con 2 dosis de VFAi se generaron altos niveles de Acs con predominio de isotipo IgG1, sugiriendo una respuesta de tipo Th2. La combinación Ad-P12A3C/VFAi, aumentó la respuesta total de Acs, sin cambios en la relación de subclases de las IgGs. Estos resultados fueron confirmados por la evaluación de las citoquinas inducidas, específicamente IL-2, IFNγ e IL-4. Comparando los niveles de ARNm obtenidos para cada grupo, se observó que tanto los animales inmunizados con un esquema de tipo homólogo u heterólogo de vectores virales o combinados con el VFAi, mostraron niveles semejantes en la acumulación de ARNm de las citoquinas IL-2, IL-4 e IFNγ analizadas. En cambio, los ratones que fueron inoculados con 2 dosis del VFAi mostraron bajos niveles de IL-2 e IFNγ y altos niveles de IL-4.

Con respecto a los ensayos de linfoproliferación, todos los grupos inmunizados con las distintas formulaciones vacunales, a excepción del grupo inoculado solo con Ad-P12A3C, tuvieron un aumento significativo en el índice de proliferación de linfocitos T comparado al grupo control, inoculado con Ad-GFP ($p<0,05$).

Los ensayos de protección al desafío viral mostraron resultados muy interesantes. A pesar de que estos resultados son muy preliminares, en el modelo murino no se encontraron diferencias en el porcentaje de protección frente al desafío viral, entre dos dosis de vacuna convencional (basada en VFAi) y una dosis de vacuna

vectorial con un refuerzo de HSV-P12A3C o VFAi. El porcentaje de protección total en estos grupos fue alto (75%), con la mayor reducción en los títulos de viremia post desafío en los ratones no protegidos totalmente.

El grupo inoculado con 2 dosis de HSV-P12A3C también logró reducir la viremia, pero alcanzó un porcentaje de protección menor a los anteriores (33%). En contraste, los ratones inmunizados con 2 dosis de Ad-P12A3C desarrollaron muy bajos títulos de anticuerpos y no lograron reducir la viremia luego del desafío con virus vivo, recuperándose títulos de virus similares a los obtenidos con el grupo control inmunizado con Ad-GFP. En este sentido, en la vacunación homóloga con Adenovirus se pudo detectar la existencia de Acs dirigidos contra el vector, generados luego del primado con Ad-P12A3C que podrían explicar la menor calidad de la respuesta obtenida. Esto no se comprobó con los vectores herpéticos.

Por otro lado, y a pesar de los resultados de protección frente al desafío viral, los títulos de anticuerpos neutralizantes fueron muy bajos en todos los grupos de animales. La protección frente a la infección por el VFA ha sido siempre relacionada con la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos en suero (Pay and Hingley, 1992); (Hingley and Pay, 1987); (Van Maanen and Terpstra, 1989). Sin embargo, es posible encontrar animales protegidos con niveles sub-neutralizantes de anticuerpos (Liebermann et al., 1993) lo que sugiere que la protección estaría mediada, además, por otros componentes del sistema inmune.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren, entonces, que en los grupos inmunizados con la combinación heteróloga de vectores virales o el VFAi, estaría actuando otro mecanismo de protección. Quattrocchi y col. (Quattrocchi et al., 2011), demostraron utilizando un régimen de dos dosis de vacunas inactivadas formuladas con ciertos adyuvantes (IMS12802PR o ISA206VG), que los macrófagos juegan un rol central en la protección temprana y que los procesos de opsonización y fagocitosis son capaces de inducir inmunidad protectiva contra el VFA en el modelo murino, en ausencia de anticuerpos neutralizantes.

La evaluación de la respuesta humoral a mediano plazo en los animales inmunizados con los distintos prototipos vacunales, se realizó determinando los niveles de Acs específicos hasta por lo menos 4 meses post-dosis de refuerzo. Los niveles de anticuerpos anti-VFA permanecieron muy altos tanto en el grupo con dos dosis de vacuna inactivada como en el grupo primado con Ad-P123C y reforzado con la mitad de la dosis de VFAi.

Por otra parte, la re-exposición de los distintos grupos inmunizados al virus inactivado a los 4 meses de haber recibido la dosis de refuerzo, generó un rápido aumento de los anticuerpos específicos anti-VFA en todos los grupos, demostrando la presencia de células B de memoria, funcionales *in vivo.* En este sentido, los animales inmunizados con Ad-P12A3C/HSV-P12A3C y Ad-P12A3C/VFAi, luego de la re-estimulación, respondieron con una rápida expansión de células secretoras de anticuerpos (ASC) específicas anti-VFA, correlacionando con los altos títulos de anticuerpos obtenidos.

Es interesante destacar que, en los grupos inmunizados con los vectores virales los anticuerpos inducidos por la nueva exposición al VFAi presentaron un incremento significativo en el índice de avidez, respecto a los generados a los 21 dpr, indicando que los primeros sufrieron una maduración en su afinidad (Kang et al., 1998), mientras que el IA se mantuvo invariante, aunque en niveles altos, en los grupos donde intervino una inmunización con virus inactivado.

Los ratones inmunizados con la combinación Ad-P12A3C/HSV-P12A3C fueron capaces de reducir la viremia post desafío luego de los 4 meses de haber recibido la dosis de refuerzo, con un porcentaje de protección del 100%. Es decir que esta combinación de inmunógenos resultó efectiva para desencadenar una respuesta inmune protectiva a mediano plazo contra el VFA en ratones adultos. Esto es importante, dado que uno de los principales objetivos de la vacunación es inducir una respuesta de memoria capaz de proveer inmunidad a largo plazo contra el patógeno en cuestión (Kang et al., 2009).

Una mención especial requieren los resultados obtenidos con el vector Ad. Reconocidos grupos científicos han publicado buenos resultados de protección en animales grandes, utilizando un vector adenoviral que codifica la cápside de cepas del serotipo A (Mayr et al., 1999); (Moraes et al., 2003); (Pacheco et al., 2005); (Grubman, 2005). Los investigadores observaron que ratones inmunizados con 2 dosis de Ad-P12A3C lograron inducir Acs neutralizantes luego de la dosis de refuerzo y que cerdos fueron parcialmente protegidos luego del desafío viral (Mayr et al., 1999). También el mismo grupo, observó que bovinos y cerdos inoculados con la misma vacuna eran protegidos contra el desafío directo a los 7 días post vacunación, y los mismos presentaban niveles elevados de anticuerpos neutralizantes contra el patógeno (Pacheco et al., 2005).

El sistema usado en el presente trabajo fue adquirido comercialmente y contiene las secuencias de otro serotipo viral, por lo que no es directamente comparable con los vectores reportados en otras publicaciones. Igualmente, es

destacable que, tanto de acuerdo a nuestros datos, como a los publicados por los autores mencionados anteriormente, es necesaria la inoculación de cantidades mayores en varios órdenes de magnitud (logs) de partículas adenovirales que herpéticas, para lograr una respuesta protectora.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

6. Conclusiones

La combinación heteróloga de vectores que expresan proteínas de la cápside del VFA o la combinación de éstos con virus inactivado, ofrece la posibilidad no solo del eventual reemplazo de la vacuna convencional basada en VFAi en el futuro, sino la posibilidad de contar con vacunas más efectivas. La diferenciación de animales vacunados de infectados sigue constituyendo un desafío a nivel mundial y en particular en los países que utilizan vacunación sistemática. De modo que el desarrollo de nuevas vacunas recombinantes es un objetivo de enorme importancia práctica. El uso de antígenos expresados por vectores heterólogos es un procedimiento relativamente reciente en el campo de la vacunología, pero puede aportar a solucionar problemas importantes asociados a la inmunización convencional. Por otro lado, las proteínas expresadas por plásmidos o vectores se sintetizan, procesan y presentan en forma intracelular, lo que es mas parecido a la infección natural que la administración de antígenos inactivados y ofrece el potencial de manipular la respuesta inmune a través de incorporación de genes de citoquinas y otras proteínas (por ejemplo de otros serotipos del VFA) en el mismo vector, aumentando la eficacia de la vacunación (Kim et al., 1997); (Somasundaram et al., 1999); (Tuteja et al., 2000).

El uso de vectores virales no replicativos junto con estrategias de *prime-and-boost,* convierten a los inmunógenos recombinantes de nueva generación en una poderosa alternativa en la lucha contra enfermedades virales en el área veterinaria y humana.

Por lo tanto, como una primera aproximación, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son alentadores.

En primer lugar se caracterizó un vector nuevo derivado de herpesvirus, que es estable, seguro, capaz de diferenciar la respuesta inmune de animales vacunados de infectados. Los amplicones no contienen genes de HSV, pueden infectar muchos tipos de células, incluidas las dendríticas y otras células potencialmente capaces de presentar antígenos, tiene muy baja toxicidad y poseen una gran capacidad transgénica, que permite la incorporación de múltiples copias o de múltiples transgenes incluyendo genes de citoquinas y de moléculas inmunoestimuladoras.

Por otro lado, se demostró que la combinación de un vector viral con una dosis más pequeña de virus inactivado proveyó similar nivel de protección que dos dosis de

la vacuna inactivada convencional, generando una respuesta combinada de tipo Th1 y Th2.

Esto es importante destacar, ya que de esta manera se favorecería tanto a la inmunidad humoral estimulada a través del virus inactivado, como así también a la inmunidad celular derivada en su mayoría, del vector viral utilizado.

En resumen, estos descubrimientos extienden nuestro conocimiento sobre nuevos vectores y efectivas combinaciones para el desarrollo de vacunas contra el VFA.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abelson, P.H., 1982, Foot-and-mouth disease vaccines. Science 218, 1181.

Abrams, C.C., King, A.M., Belsham, G.J., 1995, Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. J Gen Virol 76 (Pt 12), 3089-3098.

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

Ambros, V., Baltimore, D., 1978, Protein is linked to the 5' end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine. J Biol Chem 253, 5263-5266.

Ambros, V., Pettersson, R.F., Baltimore, D., 1978, An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. Cell 15, 1439-1446.

Anderer, F.A., Schlumberger, H.D., 1965, Properties of Different Artificial Antigens Immunologically Related to Tobacco Mosaic Virus. Biochim Biophys Acta 97, 503-509.

Andino, R., Rieckhof, G.E., Baltimore, D., 1990, A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. Cell 63, 369-380.

Armstrong, R.M., 1997, Development of tests for antibodies against foot-and-mouth disease virus in cattle milk. J Virol Methods 63, 175-180.

Arnold, E., Luo, M., Vriend, G., Rossmann, M.G., Palmenberg, A.C., Parks, G.D., Nicklin, M.J., Wimmer, E., 1987, Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. Proc Natl Acad Sci U S A 84, 21-25.

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.

Banerjee, R., Tsai, W., Kim, W., Dasgupta, A., 2001, Interaction of poliovirus-encoded 2C/2BC polypeptides with the 3' terminus negative-strand cloverleaf requires an intact stem-loop b. Virology 280, 41-51.

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

Barteling, S.J., Woortmeyer, R., 1987, Multiple variants in foot-and-mouse disease virus (FMDV) populations: the Achilles heel for peptide and rec. DNA vaccines? Dev Biol Stand 66, 511-521.

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.

Belsham, G.J., 1992, Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. EMBO J 11, 1105-1110.

Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W., 1997, Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science 275, 1320-1323.

Berryman, S., Clark, S., Monaghan, P., Jackson, T., 2005, Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. J Virol 79, 8519-8534.

Bienz, K., Egger, D., Pfister, T., Troxler, M., 1992, Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. J Virol 66, 2740-2747.

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 immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. Nature 298, 30-33.

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.
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, F., 1991, An overview of the inactivation of FMDV and the implications when residual virus is present in vaccines. Dev Biol Stand 75, 37-41.
Brown, F., 1993, Review of accidents caused by incomplete inactivation of viruses. Dev Biol Stand 81, 103-107.
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-and-mouth disease. Nature 183, 1688-1689.
Buchman, A.R., Berg, P., 1988, Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. Mol Cell Biol 8, 4395-4405.
Burness, A.T., Pardoe, I.U., Fox, S.M., 1973, Evidence for the lack of glycoprotein in the encephalomyocarditis virus particle. J Gen Virol 18, 33-49.
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.
Burrows, R., 1968, The persistence of foot-and mouth disease virus in sheep. J Hyg (Lond) 66, 633-640.
Butler, J.E., 1998, Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. Rev Sci Tech 17, 43-70.
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.
Clarke, B.E., Newton, S.E., Carroll, A.R., Francis, M.J., Appleyard, G., Syred, A.D., Highfield, P.E., Rowlands, D.J., Brown, F., 1987, Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. Nature 330, 381-384.
Colmenero, P., Berglund, P., Kambayashi, T., Biberfeld, P., Liljestrom, P., Jondal, M., 2001, Recombinant Semliki Forest virus vaccine vectors: the route of injection determines the localization of vector RNA and subsequent T cell response. Gene Ther 8, 1307-1314.
Collen, T., 1994, Foot-and-mouth disease (Aphthovirus) : viral T cell epitopes. Cell-Mediated Immunity in Ruminants, 173-212.
Collen, T., Baron, J., Childerstone, A., Corteyn, A., Doel, T.R., Flint, M., Garcia-Valcarcel, M., Parkhouse, R.M., Ryan, M.D., 1998, Heterotypic recognition of recombinant FMDV proteins by bovine T-cells: the polymerase (P3Dpol) as an immunodominant T-cell immunogen. Virus Res 56, 125-133.
Collen, T., Doel, T.R., 1990, Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. J Gen Virol 71 (Pt 2), 309-315.
Cooper, P.D., 1978, Picornaviridae: Second report. Intervirol. 10, 165-180.
Cottral, G.E., Cox, B.F., Baldwin, D.E., 1960, The survival of foot-and-mouth disease virus in cured and uncured meat. Am J Vet Res 21, 288-297.
Cottral, G.E., Gailiunas, P., Cox, B.F., 1968, Foot-and-mouth disease virus in semen of bulls and its transmission by artificial insemination. Arch Gesamte Virusforsch 23, 362-377.
Cowan, K.M., Graves, J.H., 1966, A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. Virology 30, 528-540.
Cuisinier, A.M., Mallet, V., Meyer, A., Caldora, C., Aubert, A., 1997, DNA vaccination using expression vectors carrying FIV structural genes induces immune response against feline immunodeficiency virus. Vaccine 15, 1085-1094.
Curry, S., Abrams, C.C., Fry, E., Crowther, J.C., Belsham, G.J., Stuart, D.I., King, A.M., 1995, Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus

capsids. J Virol 69, 430-438.
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.
Childerstone, A.J., Cedillo-Baron, L., Foster-Cuevas, M., Parkhouse, R.M., 1999, Demonstration of bovine CD8+ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus. J Gen Virol 80 (Pt 3), 663-669.
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. J Virol 72, 4454-4457.
Chinsangaram, J., Moraes, M.P., Koster, M., Grubman, M.J., 2003, Novel viral disease control strategy: adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease. J Virol 77, 1621-1625.
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.
Davis, H.L., Mancini, M., Michel, M.L., Whalen, R.G., 1996, DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. Vaccine 14, 910-915.
Davtyan, H., Mkrtichyan, M., Movsesyan, N., Petrushina, I., Mamikonyan, G., Cribbs, D.H., Agadjanyan, M.G., 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 la Torre, J.C., Martinez-Salas, E., Diez, J., Villaverde, A., Gebauer, F., Rocha, E., Davila, M., Domingo, E., 1988, Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. J Virol 62, 2050-2058.
Dellers, R.W., Hyde, J.L., 1964, Response of Sheep to Experimental Infection with Foot-and-Mouth Disease Virus. Am J Vet Res 25, 469-473.
Devaney, M.A., Vakharia, V.N., Lloyd, R.E., Ehrenfeld, E., Grubman, M.J., 1988, Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. J Virol 62, 4407-4409.
Doel, T.R., 2003, FMD vaccines. Virus Res 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.
Domingo, E., Davila, M., Ortin, J., 1980, Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. Gene 11, 333-346.
Drzeniek, R., Bilello, P., 1974, Absence of glycoproteins in poliovirus particles. J Gen Virol 25, 125-132.
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 boost responses to an adenovirus prime. Vaccine 25, 7410-7421.
Echeverri, A.C., Dasgupta, A., 1995, Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. Virology 208, 540-553.
Ellard, F.M., Drew, J., Blakemore, W.E., Stuart, D.I., King, A.M., 1999, Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. J Gen Virol 80 (Pt 8), 1911-1918.
Epstein, A.L., 2005, HSV-1-based amplicon vectors: design and applications. Gene Ther 12 Suppl 1, S154-158.
Escarmis, C., Carrillo, E.C., Ferrer, M., Arriaza, J.F., Lopez, N., Tami, C., Verdaguer,

N., Domingo, E., Franze-Fernandez, M.T., 1998, Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-and-mouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. J Virol 72, 10171-10179.

Evans, M.J., Scarpulla, R.C., 1989, Introns in the 3'-untranslated region can inhibit chimeric CAT and beta-galactosidase gene expression. Gene 84, 135-142.

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. J Hyg (Lond) 64, 397-404.

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 (Pt 12), 3307-3311.

Fenner, F., 1976, Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology 7, 1-115.

Filgueiras, P., 2000, Detection and characterization of functional T-cell epitopes on the structural proteins VP2, VP3, and VP4 of foot and mouth disease virus O1 campos. Virology 5, 234-239.

Forman, A.J., Gibbs, E.P., Baber, D.J., Herniman, K.A., Barnett, I.T., 1974, Studies with foot-and-mouth disease virus in British deer (red, fallow and roe). II. Recovery of virus and serological response. J Comp Pathol 84, 221-229.

Fraefel, C., 2002, Gene delivery using helper virus-free HSV-1 amplicon vectors. Curr Protoc Hum Genet Chapter 12, Unit 12 12.

Francis, M.J., 1990, Peptide vaccines for viral diseases. Sci Prog 74, 115-130.

Francis, M.J., Fry, C.M., Rowlands, D.J., Bittle, J.L., Houghten, R.A., Lerner, R.A., Brown, F., 1987, Immune response to uncoupled peptides of foot-and-mouth disease virus. Immunology 61, 1-6.

Francis, M.J., Fry, C.M., Rowlands, D.J., Brown, F., 1988, Qualitative and quantitative differences in the immune response to foot-and-mouth disease virus antigens and synthetic peptides. J Gen Virol 69 (Pt 10), 2483-2491.

Frascatorius, H. 1546. De contagione et contagiosis morbis et curatione (Venezzia).

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.

Fuerst, T.R., Niles, E.G., Studier, F.W., Moss, B., 1986, Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 8122-8126.

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 U S A 90, 11478-11482.

Gamarnik, A.V., Andino, R., 1998, Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. Genes Dev 12, 2293-2304.

Garcia-Valcarcel, M., Doel, T., Collen, T., Ryan, M., Parkhouse, R.M., 1996, Recognition of foot-and-mouth disease virus and its capsid protein VP1 by bovine peripheral T lymphocytes. J Gen Virol 77 (Pt 4), 727-735.

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. J Virol 62, 2041-2049.

Gherardi, M.M., Ramirez, J.C., Esteban, M., 2001, Towards a new generation of vaccines: the cytokine IL-12 as an adjuvant to enhance cellular immune responses to pathogens during prime-booster vaccination regimens. Histol Histopathol 16, 655-667.

Giachetti, C., Hwang, S.S., Semler, B.L., 1992, cis-acting lesions targeted to the hydrophobic domain of a poliovirus membrane protein involved in RNA replication. J Virol 66, 6045-6057.

Goff, W.L., Wagner, G.G., Craig, T.M., Long, R.F., 1984, The role of specific

immunoglobulins in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assays during Babesia bovis infection. Vet Parasitol 14, 117-128.

Golini, F., Semler, B.L., Dorner, A.J., Wimmer, E., 1980, Protein-linked RNA of poliovirus is competent to form an initiation complex of translation in vitro. Nature 287, 600-603.

Gross, M.K., Kainz, M.S., Merrill, G.F., 1987, Introns are inconsequential to efficient formation of cellular thymidine kinase mRNA in mouse L cells. Mol Cell Biol 7, 4576-4581.

Grubman, M.J., 2005, Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. Biologicals 33, 227-234.

Grubman, M.J., Baxt, B., 2004, Foot-and-mouth disease. Clin Microbiol Rev 17, 465-493.

Grubman, M.J., Lewis, S.A., Morgan, D.O., 1993, Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. Vaccine 11, 825-829.

Harlow, E.L., D. , 1988, Antibodies: a laboratory manual. . Cold Spring Harbor Lab. .

Harris, K.S., Xiang, W., Alexander, L., Lane, W.S., Paul, A.V., Wimmer, E., 1994, Interaction of poliovirus polypeptide 3CDpro with the 5' and 3' termini of the poliovirus genome. Identification of viral and cellular cofactors needed for efficient binding. J Biol Chem 269, 27004-27014.

Herrera, M., Grande-Perez, A., Perales, C., Domingo, E., 2008, Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. J Gen Virol 89, 232-244.

Hingley, P.J., Pay, T.W., 1987, Sources of variability in foot and mouth disease vaccine potency estimates based on serum neutralizing antibody assay. J Biol Stand 15, 127-142.

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

Huang, M.T., Gorman, C.M., 1990, Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. Nucleic Acids Res 18, 937-947.

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.

Hyslop, N.S., 1965, Isolation of variant strains from foot-and-mouth disease virus propagated in cell cultures containing antiviral sera. J Gen Microbiol 41, 135-142.

Jackson, T., Clark, S., Berryman, S., Burman, A., Cambier, S., Mu, D., Nishimura, S., King, A.M., 2004, Integrin alphavbeta8 functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the beta-chain cytodomain in integrin-mediated infection. J Virol 78, 4533-4540.

Jackson, T., Mould, A.P., Sheppard, D., King, A.M., 2002, Integrin alphavbeta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. J Virol 76, 935-941.

Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., King, A.M., 2000, The epithelial integrin alphavbeta6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. J Virol 74, 4949-4956.

Kaneko, H., Bednarek, I., Wierzbicki, A., Kiszka, I., Dmochowski, M., Wasik, T.J., Kaneko, Y., Kozbor, D., 2000, Oral DNA vaccination promotes mucosal and systemic immune responses to HIV envelope glycoprotein. Virology 267, 8-16.

Kang, S.M., Yoo, D.G., Lipatov, A.S., Song, J.M., Davis, C.T., Quan, F.S., Chen, L.M., Donis, R.O., Compans, R.W., 2009, Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 virus-like particles. PLoS One 4, e4667.

Kang, Y., Calvo, P.A., Daly, T.M., Long, C.A., 1998, Comparison of humoral immune responses elicited by DNA and protein vaccines based on merozoite surface protein-1 from Plasmodium yoelii, a rodent malaria parasite. J Immunol 161,

4211-4219.
Kim, H.S., Woo, S.D., Kim, W.J., Choi, J.Y., Kang, S.K., 2000, High-level expression of a foreign gene by a recombinant baculovirus with an expanded host range. Cytotechnology 32, 87-92.
Kim, J.J., Ayyavoo, V., Bagarazzi, M.L., Chattergoon, M.A., Dang, K., Wang, B., Boyer, J.D., Weiner, D.B., 1997, In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. J Immunol 158, 816-826.
Kim, S., Boege, U., Krishnaswamy, S., Minor, I., Smith, T.J., Luo, M., Scraba, D.G., Rossmann, M.G., 1990, Conformational variability of a picornavirus capsid: pH-dependent structural changes of Mengo virus related to its host receptor attachment site and disassembly. Virology 175, 176-190.
Kitching, R.P., 1998, A recent history of foot-and-mouth disease. J Comp Pathol 118, 89-108.
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.
Knipe, T., Rieder, E., Baxt, B., Ward, G., Mason, P.W., 1997, Characterization of synthetic foot-and-mouth disease virus provirions separates acid-mediated disassembly from infectivity. J Virol 71, 2851-2856.
Knox, C., Moffat, K., Ali, S., Ryan, M., Wileman, T., 2005, Foot-and-mouth disease virus replication sites form next to the nucleus and close to the Golgi apparatus, but exclude marker proteins associated with host membrane compartments. J Gen Virol 86, 687-696.
Kwong, A.D., Frenkel, N., 1984, Herpes simplex virus amplicon: effect of size on replication of constructed defective genomes containing eucaryotic DNA sequences. J Virol 51, 595-603.
Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
Lewis, P.J., Babiuk, L.A., 1999, DNA vaccines: a review. Adv Virus Res 54, 129-188.
Lewis, S.A., Morgan, D.O., Grubman, M.J., 1991, Expression, processing, and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. J Virol 65, 6572-6580.
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.
Liang, R., van den Hurk, J.V., Babiuk, L.A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., 2006, Priming with DNA encoding E2 and boosting with E2 protein formulated with CpG oligodeoxynucleotides induces strong immune responses and protection from Bovine viral diarrhea virus in cattle. J Gen Virol 87, 2971-2982.
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.
Liljeström 1993. SFV expression systems,Technical manual., p. 31.
Liljestrom, P., Garoff, H., 1991, A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. Biotechnology (N Y) 9, 1356-1361.
Loeffler, 1897, Summarischer Bericht u¨ber die Ergebnisse der Untersuchungen der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem. Dt. med. Wschr. 98, 80-84.
Lundstrom, 1999, Semliki Forest virus vectors for in vitro and in vivo applications. Gene Ther Mol Biol 4, 23-431.
Marconi, P., Argnani, R., Berto, E., Epstein, A.L., Manservigi, R., 2008, HSV as a vector in vaccine development and gene therapy. Hum Vaccin 4, 91-105.
Martin-Acebes, M.A., Gonzalez-Magaldi, M., Sandvig, K., Sobrino, F., Armas-Portela,

R., 2007, Productive entry of type C foot-and-mouth disease virus into susceptible cultured cells requires clathrin and is dependent on the presence of plasma membrane cholesterol. Virology 369, 105-118.

Martinez-Salas, E., Lopez de Quinto, S., Ramos, R., Fernandez-Miragall, O., 2002, IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. Biochimie 84, 755-763.

Mateu, M.G., Da Silva, J.L., Rocha, E., De Brum, D.L., Alonso, A., Enjuanes, L., Domingo, E., Barahona, H., 1988, Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. Virology 167, 113-124.

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.

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.

Mc Cullough, K.C., Parkinson, D. & Crowther, J.R., 1988, Opsonization-enhanced phagocytosis of foot and mouth disease virus. . Inmunology 65, 187-191.

Mc Guire, T., C., Musoke, A.J. & Kurtti, T., 1979, Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages and skin. Immunology 38, 249-255.

Meloen, R.H., 1978, Differentiation between specific and nonspecific reactions of bovine sera and foot and mouth disease virus (FMDV) in immunodiffusion tests. Arch Virol 58, 35-43.

Monaghan, P., Cook, H., Jackson, T., Ryan, M., Wileman, T., 2004, The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. J Gen Virol 85, 933-946.

Moraes, M.P., Chinsangaram, J., Brum, M.C., Grubman, M.J., 2003, Immediate protection of swine from foot-and-mouth disease: a combination of adenoviruses expressing interferon alpha and a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine. Vaccine 22, 268-279.

Moscufo, N., Yafal, A.G., Rogove, A., Hogle, J., Chow, M., 1993, A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. J Virol 67, 5075-5078.

Mowat, G.N., Barr, D.A., Bennett, J.H., 1969, The development of an attenuated foot-and-mouth disease virus vaccine by modification and cloning in tissue cultures of BHK21 cells. Arch Gesamte Virusforsch 26, 341-354.

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.

Mulcahy, G., Gale, C., Robertson, P., Iyisan, S., DiMarchi, R.D., Doel, T.R., 1990, Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. Vaccine 8, 249-256.

Neff, S., Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P.W., Blystone, S.D., Brown, E.J., Baxt, B., 1998, Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. J Virol 72, 3587-3594.

Nomoto, A., Detjen, B., Pozzatti, R., Wimmer, E., 1977, The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. Nature 268, 208-213.

Novak, J.E., Kirkegaard, K., 1991, Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. J Virol 65, 3384-3387.

O'Donnell, V., LaRocco, M., Duque, H., Baxt, B., 2005, Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. J Virol 79, 8506-8518.

Ogas, C., M. Lorena; Marzocca, Marina P.; Capozzo, Alejandra; Escodeller *, Eduardo A.; Grigera, Pablo R. 2005. Construcción de un replicón de Semliki Forest Virus (SFV) recombinante capaz de expresar inmunógenos de relevancia veterinaria. In VIII Congreso Argentino de Virología, aam, ed. (Buenos Aires, Argentina), p. 78.

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.

Pancholi, P., Lee, D.H., Liu, Q., Tackney, C., Taylor, P., Perkus, M., Andrus, L., Brotman, B., Prince, A.M., 2001, DNA prime/canarypox boost-based immunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in a chimpanzee. Hepatology 33, 448-454.

Parsley, T.B., Towner, J.S., Blyn, L.B., Ehrenfeld, E., Semler, B.L., 1997, Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. RNA 3, 1124-1134.

Paul, A.V., Cao, X., Harris, K.S., Lama, J., Wimmer, E., 1994, Studies with poliovirus polymerase 3Dpol. Stimulation of poly(U) synthesis in vitro by purified poliovirus protein 3AB. J Biol Chem 269, 29173-29181.

Paul, A.V., Peters, J., Mugavero, J., Yin, J., van Boom, J.H., Wimmer, E., 2003, Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. J Virol 77, 891-904.

Pay, T.W., Hingley, P.J., 1992, A potency test method for foot and mouth disease vaccine based on the serum neutralizing antibody response produced in cattle. Vaccine 10, 707-713.

Pereira, H.G., 1977, Subtyping of foot-and-mouth disease virus. Developments in Biological Standardization 35, 167-174.

Pereira, H.G., 1981, Foot-and-mouth disease. Virus Diseases of Food Animals 2, 333-363.

Periolo, O.H., Seki, C., Grigera, P.R., Robiolo, B., Fernandez, G., Maradei, E., D'Aloia, R., La Torre, J.L., 1993, Large-scale use of liquid-phase blocking sandwich ELISA for the evaluation of protective immunity against aphthovirus in cattle vaccinated with oil-adjuvanted vaccines in Argentina. Vaccine 11, 754-760.

Petitclerc, D., Attal, J., Theron, M.C., Bearzotti, M., Bolifraud, P., Kann, G., Stinnakre, M.G., Pointu, H., Puissant, C., Houdebine, L.M., 1995, The effect of various introns and transcription terminators on the efficiency of expression vectors in various cultured cell lines and in the mammary gland of transgenic mice. J Biotechnol 40, 169-178.

Pfaff, E., Thiel, H.J., Beck, E., Strohmaier, K., Schaller, H., 1988, Analysis of neutralizing epitopes on foot-and-mouth disease virus. J Virol 62, 2033-2040.

Pollard, J.W.W., J.M. , 1990, Animal Cell Culture, Vol 5. In Methods in Molecular Biology. Humana Press. , Clifton, New Yersey.

Porter, A.G., 1993, Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. J Virol 67, 6917-6921.

Porter, A.G., Fellner, P., Black, D.N., Rowlands, D.J., Harris, T.J., Brown, F., 1978, 3'-Terminal nucleotide sequences in the genome RNA of picornaviruses. Nature 276, 298-301.

Putnak, J.R., Phillips, B.A., 1981, Picornaviral structure and assembly. Microbiol Rev 45, 287-315.

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 Res 92, 262-270.

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.
Ramsay, A.J., Kent, S.J., Strugnell, R.A., Suhrbier, A., Thomson, S.A., Ramshaw, I.A., 1999, Genetic vaccination strategies for enhanced cellular, humoral and mucosal immunity. Immunol Rev 171, 27-44.
Ramshaw, I.A., Ramsay, A.J., 2000, The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. Immunol Today 21, 163-165.
Robertson, B.H., Moore, D.M., Grubman, M.J., Kleid, D.G., 1983, Identification of an exposed region of the immunogenic capsid polypeptide VP1 on foot-and-mouth disease virus. J Virol 46, 311-316.
Robiolo, B., Grigera, P.R., Periolo, O.H., Seki, C., Bianchi, T., Maradei, E., La Torre, J.L., 1995, Assessment of foot and mouth disease vaccine potency by liquid-phase blocking ELISA: a proposal for an alternative to the challenge procedure in Argentina. Vaccine 13, 1346-1352.
Roosien, J., Belsham, G.J., Ryan, M.D., King, A.M., Vlak, J.M., 1990, Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression vectors. J Gen Virol 71 (Pt 8), 1703-1711.
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.
Rowlands, D.J., Harris, T.J., Brown, F., 1978, More precise location of the polycytidylic acid tract in foot and mouth disease virus RNA. J Virol 26, 335-343.
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. J Gen Virol 26, 227-238.
Rueckert, R., 1985, Picornaviruses and their replication, B. Fields Edition. Virology N. Y.
Russell, W.C., 2000, Update on adenovirus and its vectors. J Gen Virol 81, 2573-2604.
Rweyemamu, M.M., Terry, G., Pay, T.W., 1979, Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. Arch Virol 59, 69-79.
Ryan, M.D., Drew, J., 1994, Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. EMBO J 13, 928-933.
Saeki, Y., Fraefel, C., Ichikawa, T., Breakefield, X.O., Chiocca, E.A., 2001, Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. Mol Ther 3, 591-601.
Sakamoto, K., Yoshida, K., 2002, Recent outbreaks of foot and mouth disease in countries of east Asia. Rev Sci Tech 21, 459-463.
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.
Sambrook, J., Fritsch, J. & Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: a laboratory manual. . Cold Spring Harbor Press. Second edition.
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., Garcia-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, 129-134.
Sarnow, P., 1989, Role of 3'-end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made in vitro. J Virol 63, 467-470.
Scraba, D.G., Kay, C.M., Colter, J.S., 1967, Physico-chemical studies of three variants of Mengo virus and their constituent ribonucleates. J Mol Biol 26, 67-79.
Schlesinger, S., Dubensky, T.W., 1999, Alphavirus vectors for gene expression and vaccines. Curr Opin Biotechnol 10, 434-439.

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

Schudel, A.A., Sadir, A.M., Etcheverrigaray, M.E., Samus, S., Colilla, O., Rivenson, S., 1982, Susceptibility of squirrel and Cebus monkeys to foot-and-mouth disease virus. J Med Primatol 11, 126-132.

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. Vet Microbiol 133, 239-251.

Sellers, R.F., 1971, Quantitative aspects of the spread of foot-and-mouth disease. Vet. Bull.
41, 431.

Shahan, M.S., 1962, The virus of foot-and-mouth disease. Ann N Y Acad Sci 101, 444-454.

Shieh, J.J., Liang, C.M., Chen, C.Y., Lee, F., Jong, M.H., Lai, S.S., Liang, S.M., 2001, Enhancement of the immunity to foot-and-mouth disease virus by DNA priming and protein boosting immunization. Vaccine 19, 4002-4010.

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. Vet Immunol Immunopathol 70, 277-287.

Souza, A.P., Haut, L., Reyes-Sandoval, A., Pinto, A.R., 2005, Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. Braz J Med Biol Res 38, 509-522.

Spath, E.J., Smitsaart, E., Casaro, A.P., Fondevila, N., Fernandez, F., Leunda, M.R., Compaired, D., Buffarini, M., Pessi, H., 1995, Immune response of calves to foot-and-mouth disease virus vaccine emulsified with oil adjuvant. Strategies of vaccination. Vaccine 13, 909-914.

Sprangers, M.C., Lakhai, W., Koudstaal, W., Verhoeven, M., Koel, B.F., Vogels, R., Goudsmit, J., Havenga, M.J., Kostense, S., 2003, Quantifying adenovirus-neutralizing antibodies by luciferase transgene detection: addressing preexisting immunity to vaccine and gene therapy vectors. J Clin Microbiol 41, 5046-5052.

Strohmaier, K., Adam, K.H., 1976, [Structure of foot-and-mouth disease virus]. Zentralbl Veterinarmed B 23, 483-506.

Strohmaier, K., Franze, R., Adam, K.H., 1982, Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. J Gen Virol 59, 295-306.

Sutmoller, P., McVicar, J.W., Cottral, G.E., 1968, The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. Arch Gesamte Virusforsch 23, 227-235.

Svitkin, Y.V., Pestova, T.V., Maslova, S.V., Agol, V.I., 1988, Point mutations modify the response of poliovirus RNA to a translation initiation factor: a comparison of neurovirulent and attenuated strains. Virology 166, 394-404.

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.

Tami, C., 1999. Evaluación de vacunas peptídicas contra el virus de la fiebre aftosa en bovinos: aislamiento y caracterización de mutantes de escape. Facultad de Cs. Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

Tami, C., Peralta, A., Barbieri, R., Berinstein, A., Carrillo, E., Taboga, O., 2004, Immunological properties of FMDV-gP64 fusion proteins expressed on SF9 cell and baculovirus surfaces. Vaccine 23, 840-845.

Toja, M., Escarmis, C., Domingo, E., 1999, Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. Virus Res 64,

161-171.
Torre, L., 1980, The structural polypeptides of aphthovirus are phosphoproteins. Proc Natl Acad Sci. 77, 7444-7447.
Tuteja, R., Li, T.C., Takeda, N., Jameel, S., 2000, Augmentation of immune responses to hepatitis E virus ORF2 DNA vaccination by codelivery of cytokine genes. Viral Immunol 13, 169-178.
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. (Rome), pp. 38-41.
van Lierop, M.J., Wagenaar, J.P., van Noort, J.M., Hensen, E.J., 1995, Sequences derived from the highly antigenic VP1 region 140 to 160 of foot-and-mouth disease virus do not prime for a bovine T-cell response against intact virus. J Virol 69, 4511-4514.
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.
van Vlijmen, H.W., Curry, S., Schaefer, M., Karplus, M., 1998, Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. J Mol Biol 275, 295-308.
Villen, J., Borras, E., Schaaper, W.M., Meloen, R.H., Davila, M., Domingo, E., Giralt, E., Andreu, D., 2002, Functional mimicry of a discontinuous antigenic site by a designed synthetic peptide. Chembiochem 3, 175-182.
Wang, B., Boyer, J., Srikantan, V., Coney, L., Carrano, R., Phan, C., Merva, M., Dang, K., Agadjanan, M., Gilbert, L., et al., 1993, DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. DNA Cell Biol 12, 799-805.
Wang, C.Y., Chang, T.Y., Walfield, A.M., Ye, J., Shen, M., Chen, S.P., Li, M.C., Lin, Y.L., Jong, M.H., Yang, P.C., Chyr, N., Kramer, E., Brown, F., 2002, Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. Vaccine 20, 2603-2610.
Weeratna, R.D., McCluskie, M.J., Comanita, L., Wu, T., Davis, H.L., 2000, Optimization strategies for DNA vaccines. Intervirology 43, 218-226.
Weissman, C., 1989, Single-strand RNA. Nature 337, 415-416.
Wigdorovitz, A., Carrillo, C., Dus Santos, M.J., Trono, K., Peralta, A., Gomez, M.C., Rios, R.D., Franzone, P.M., Sadir, A.M., Escribano, J.M., Borca, M.V., 1999a, Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. Virology 255, 347-353.
Wigdorovitz, A., Perez Filgueira, D.M., Robertson, N., Carrillo, C., Sadir, A.M., Morris, T.J., Borca, M.V., 1999b, Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. Virology 264, 85-91.
Wigdorovitz, A., Sadir, A., 1996, [Mechanisms involved in the prolonged humoral immune response: behavior of aphthous fever virus]. Rev Argent Microbiol 28, 45-54.
Wild, T.F., Brown, F., 1967, Nature of the inactivating action of trypsin on foot-and-mouth disease virus. J Gen Virol 1, 247-250.
Woodland, D.L., 2004, Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. Trends Immunol 25, 98-104.
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.

Xiang, W., Harris, K.S., Alexander, L., Wimmer, E., 1995, Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. J Virol 69, 3658-3667.

Yilma, T., 1980, Morphogenesis of vesiculation in foot-and-mouth disease. Am J Vet Res 41, 1537-1542.

Yu, X., Xiao, S., Fang, L., Jiang, Y., Chen, H., 2006, Enhanced immunogenicity to food-and-mouth disease virus in mice vaccination with alphaviral replicon-based DNA vaccine expressing the capsid precursor polypeptide (P1). Virus Genes 33, 337-344.

Zamorano, P., Wigdorovitz, A., Chaher, M.T., Fernandez, F.M., Carrillo, C., Marcovecchio, F.E., Sadir, A.M., Borca, M.V., 1994, Recognition of B and T cell epitopes by cattle immunized with a synthetic peptide containing the major immunogenic site of VP1 FMDV 01 Campos. Virology 201, 383-387.

Zhang, H.Y., Sun, S.H., Guo, Y.J., Zhou, F.J., Chen, Z.H., Lin, Y., Shi, K., 2003, Immune response in mice inoculated with plasmid DNAs containing multiple-epitopes of foot-and-mouth disease virus. Vaccine 21, 4704-4707.

Zhang, H.Y., Sun, S.H., Guo, Y.J., Zhu, W.J., Shi, K., Xu, G.X., Wang, J.J., 2008, Optimization strategy for plasmid DNAs containing multiple-epitopes of foot-and-mouth disease virus by cis-expression with IL-2. Vaccine 26, 769-777.

Zhang, K., Huang, J., Wang, Q., He, Y., Xu, Z., Xiang, M., Wu, B., Chen, H., 2010, Recombinant pseudorabies virus expressing P12A and 3C of FMDV can partially protect piglets against FMDV challenge. Res Vet Sci.

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. J Virol Methods 136, 230-237.

Zhou, X., Berglund, P., Rhodes, G., Parker, S.E., Jondal, M., Liljestrom, P., 1994, Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. Vaccine 12, 1510-1514.