

Tesis Doctoral

Estudio de la acción de construcciones peptídicas dendriméricas como vacuna contra la Fiebre Aftosa en bovinos

Soria, Ivana

2017-10-20

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:

Soria, Ivana. (2017-10-20). Estudio de la acción de construcciones peptídicas dendriméricas como vacuna contra la Fiebre Aftosa en bovinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Soria, Ivana. "Estudio de la acción de construcciones peptídicas dendriméricas como vacuna contra la Fiebre Aftosa en bovinos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-10-20.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Estudio de la acción de construcciones
peptídicas dendriméricas como vacuna contra
la Fiebre Aftosa en bovinos**

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

Lic. SORIA Ivana

Director de tesis: Dra. ZAMORANO Patricia

Consejero de Estudios: Dra. DAMONTE Elsa

Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de
Ciencia y Tecnología – INTA Castelar, Instituto de Virología.

Buenos Aires, 2017

Defensa: 20 de octubre 2017

A Andrés y Pedro
Los amores de mi vida

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron involucrados en la realización y desenlace de este trabajo tesis, ya sea de manera directa como indirecta:

A Patricia Zamorano, mi directora de tesis, por darme la confianza y autonomía necesaria para poder realizar este trabajo con total libertad; por su apoyo, interés y preocupación tanto en mi vida profesional como lo personal. Muchas gracias de verdad, nunca lo voy a olvidar.

A todo el personal del Instituto de Virología por hacer del mismo un lugar placentero para ir a trabajar todos los días.

A los directores correlativos del Instituto de Virología, Fernando Fernández y Karina Tronos, por el lugar que me dieron en el Instituto para poder realizar el trabajo, cada uno en su momento.

A mis compañeros y amigos que pasaron a lo largo de tantos años de trabajo por el laboratorio D. Vale, Cecy, Vicky, Eri, Marie, Caro, Pame, Clau y el infiltrado Juan, que hacen que el día a día en el trabajo del becario (estresante en muchos aspectos) sea placentero entre mates y risas, hablando de temas tan insignificantes como, que película o serie es obligatorio ver, o substanciales como, el oso panda y su actitud hacia la vida. Por todas esas risas, por el apoyo, la ayuda, la contención y su amistad...¡Gracias totales! Mañana brindamos en el clásico after-lab de las 7 de la tarde, sito Santa Rosa 1160.

A Osvaldo, Teresa, Estela y Daniel del sector de cultivos por la buena predisposición ante los muchos pedidos de células para realizar los ensayos de la tesis

A Majo y Marie, por las horas de adquisición de mis innumerables muestras en el citómetro.

A Juan responsable del laboratorio NSB4-OIE por la gestión para mantener en funcionamiento este espacio necesario y obligatorio para poder trabajar con el VFA; a Osvaldo, Oscar "el pájaro" y Fusco por la buena predisposición al momento del desafío de los animales yendo desde muy temprano el fin de semana para habilitar la entrada.

A los que colaboraron en el complejo manejo y cuidado de los bovinos, que me hubiera sido imposible de no estar ellos. Javi Leiva, Diego "hormiga" Soraire, "Chuky", Lucas Vagnoni, Claudio Fioroni, Diego Franco y Verónica Maldonado.

A los chicos del F, especialmente Digi que estuvo auxiliándome en todas las experiencias de bovinos, con la ayuda de Danilo para las sangrías de la primera experiencia. A todo el grupo, Digi, Danilo, Juan Pega y Juan Schammas por la participación absoluta, y altamente necesaria, en el sacrificio, necropsia y procesamiento de ganglios.

A Solci, que no solo me prestó el oído como muchas de las maravillosas personas del instituto, sino que se involucró, prestándome unas horas de fin de semana para acompañarme en el monitoreo de los animales luego del desafío.

A todos los que aportaron con ideas y comentarios para mejorar el plan y ejecución de la tesis, entre ellos Mariano Perez Filguiera, Elisa Carrillo, Claudia Waldner, Claudia Mongini y Maria Montoya.

Por último, a los jurados de tesis por dedicarle de su tiempo en la lectura, evaluación y corrección de este trabajo.

Si bien todas las personas nombradas anteriormente, participaron en forma directa en alguna sección del trabajo, hay muchas personas que estuvieron presentes y que sin ellas tampoco podría haber llegado a su final.

Las chicas de la facu, las Biólocas, que en esas tardes de meriendas o cenas, nos damos ánimos para seguir en este sistema científico complicado, presentándonos a becas, consultándonos por qué paso vamos. Sin uds esto sería un poco más difícil, pero de a poco vamos concluyendo todas esta última etapa. Las quiero!

A mis suegros, Miguel y Graciela, no solo por su interés en mi carrera de grado y post-grado, sino también por la comprensión y ayuda que nos dan con Pedri día a día y por lo que voy a estar eternamente agradecida. Los quiero, son un gran apoyo para nuestra pequeña familia.

A mis papas, José Luis y Anahí, no solo por inculcarme el estudio en mi vida haciendo posible que encontrara una carrera que me apasiona; sino también por su incondicional apoyo en absolutamente todo en mi vida, también cuidando de Pedri (junto con Rosita en aquel primer año). Sin ustedes yo no podría haber llegado nunca hasta acá. No hay palabras para agradecer todo lo que hacen por mí (y por mis hermanos). Gracias por convertirme en lo que soy ¡Esta tesis es de ustedes! ¡Los quiero!

A los hombres de mi vida, Andres y Pedro, porque los amo con todo lo que soy, y esta tesis ocupó mucho de mí durante mucho tiempo. Pedri compartió muchas horas de mamá con el desarrollo y escritura de la tesis; sin embargo, ahí estaba festejando con una sonrisa y abrazos mi llegada, por más de que quedara poco del día, y que sin el apoyo absoluto de su papá (y también el amor de mi vida), no hubiera sido posible. ¡Esta tesis también es de ustedes! Los amo!!!

Índice general

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XV
1. INTRODUCCION	1
1.1. FIEBRE AFTOSA.....	2
1.1.1. El virus y la enfermedad	2
1.1.2. Distribución geográfica de la enfermedad y estatus de Argentina	6
1.1.3. Importancia económica.....	11
1.2. VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA	14
1.2.1. Clasificación y organización genómica	14
1.2.2. Estructura del viri3n y diversidad antigénica	18
1.2.3. Reconocimiento celular del virus	22
1.2.4. Ciclo infectivo	24
1.3. RESPUESTA INMUNE FRENTE A VFA	28
1.3.1. Aspectos importantes de la respuesta inmunitaria	29
1.3.2. Respuesta inmune humoral frente a VFA	36
1.3.3. Respuesta inmune celular frente a VFA	42
1.3.4. Respuesta inmune innata frente al VFA.....	46
1.4. VACUNAS CONTRA EL VFA.....	47
1.4.1. Vacuna clásica	47
1.4.2. Vacuna convencional actual.....	49
1.4.3. Nuevas estrategias vacunales contra VFA.....	51
1.4.3.1. Vacunas a virus vivo atenuado.....	51
1.4.3.2. Vacunas génicas	52
1.4.3.3. Vacunas basadas en vectores virales	54
1.4.3.4. Vacunas basadas en ARN	55
1.4.3.5. Vacunas basadas en cápsides vacías.....	56
1.4.3.6. Vacunas basadas en subunidades proteicas y péptidos sintéticos	57
1.5. PÉPTIDOS DENDRIMÉRICOS Y SU APLICACIÓN COMO VACUNA	61

2. OBJETIVOS	65
2.1. OBJETIVO GENERAL	66
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES	66
3. MATERIALES Y MÉTODOS	67
3.1. LÍNEAS CELULARES, VIRUS, PÉPTIDOS SINTÉTICOS Y ANIMALES	68
3.1.1 Líneas celulares	68
3.1.2. Virus	68
3.1.3. Péptidos sintéticos.....	69
3.1.4. Animales.....	71
3.2. INMUNIZACIÓN Y DESAFÍO VIRAL DE ANIMALES	71
3.2.1. Formulaciones vacunales	71
3.2.2. Inmunizaciones y muestreo.....	72
3.2.3. Desafío viral de los bovinos	73
3.2.4. Monitoreo de enfermedad y eutanasia	74
3.3. ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL	75
3.3.1. ELISA Fase Líquida (EFL) para detección de Igs totales específicas contra VFA O1Campos en sueros bovinos.....	75
3.3.2. ELISA para detección de IgGs s totales específicas contra VFA en sueros bovinos.....	76
3.3.3 ELISA para detección de isotipos bovinos específicos contra VFA en muestras de sangre y secreciones nasales.....	76
3.3.4. ELISA para detección de IgGs séricas totales bovinas específicas contra péptido	77
3.3.5. ELISA para detección de anticuerpos contra proteína no estructurales del VFA en sueros bovinos (ELISA comercial PrioCHECK® FMDV NS).....	78
3.3.6. Seroneutralización para la determinación del título de neutralización viral contra el VFA en muestras de sueros bovinos y cerdos (Ensayo clásico: Virus fijo - suero variable)	79
3.3.7. Seroneutralización para la determinación de porcentaje de VFA neutralizado (Ensayo alternativo: Virus variable – suero fijo)	79
3.3.8. Ensayo de opsonización-fagocitosis	80
3.4. ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR	81
3.4.1. Obtención de células mononucleares bovinas de sangre periférica.....	81
3.4.2. ELISA para medición de IFN- γ bovino.....	82

3.4.3. Linfoproliferación	83
3.4.3.1. Incorporación de timidina tritiada ($[^3\text{H}]\text{-T}$)	83
3.4.3.2. Marcación con CFSE	83
3.5. ANALISIS Y DETECCIÓN DEL VFA	85
3.5.1. Titulación viral por el método de punto final	85
3.5.2. Extracción de ARN y RT-PCR para detectar replicación viral en epitelio de bovinos	86
3.5.3. Secuenciación de ADNc proveniente de macerados de epitelio de animales infectados	88
3.6. CARACTERIZACIÓN DE RESPUESTA EN GANAGLIOS LINFÁTICOS	89
3.6.1. Obtención de órganos linfoides luego del sacrificio	89
3.6.2. Aislamiento de CMN a partir de órganos linfoides	90
3.6.3. ELISPOT de isotipos de células secretoras de anticuerpos específicos para VFA O1Campos en bovino	91
3.7. USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD .	92
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	92
4. RESULTADOS	93
4.1 EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y CAPACIDAD PROTECTORA DE LAS VACUNAS BASADAS EN EL VFA O/UK 11/01 (Experimento 1)	94
4.1.1. Evaluación de reactividad cruzada de sueros de animales vacunados con vacuna comercial que contiene VFA O1Campos	96
4.1.2. Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral inducida por los péptidos dendriméricos	97
4.1.2.1. Evaluación de los isotipos de anticuerpos inducidos	98
4.1.2.2. Evaluación de la inmunidad humoral en mucosa	99
4.1.2.3. Capacidad neutralizante de los anticuerpos séricos	100
4.1.2.4. Evaluación de presencia de anticuerpos contra proteínas no estructurales	103
4.1.3. Evaluación de la respuesta inmunitaria celular inducida por los péptidos dendriméricos	103
4.1.3.1 Evaluación de la proliferación de linfocitos de memoria a los 38 dpv .	103
4.1.3.2 Evaluación de la secreción de IFN- γ por parte de las CMNs de los animales vacunados	105

4.1.4. Evaluación de protección frente al desafío con VFA O1Campos en bovinos vacunados con los péptidos dendriméricos $B_{(OUK)2}T_{3A}$ o $B_{(OUK)4}T_{3A}$	106
4.1.5. Evaluación de secreción de IFN- γ post-desafío con VFA O1Campos	108
4.1.6. Presencia de células secretoras de anticuerpos (CSA) en órganos linfáticos	109
4.2. NUEVOS PÉPTIDOS DENDRIMÉRICOS	112
4.2.1. Alternativas para mejoramiento de un nuevo péptido dendrimérico	112
4.2.2. Diseño y síntesis de los nuevos péptidos dendriméricos	112
4.3. EVALUACIÓN DE INMUNIDAD INDUCIDA EN BOVINOS CON NUEVOS PEPTIDOS DENDRIMÉRICOS (Experimento 2)	113
4.3.1. Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral inducida por los nuevos péptidos dendriméricos	113
4.3.1.1. Evaluación de los isotipos de anticuerpos inducidos	114
4.3.1.2. Evaluación de la inmunidad humoral en mucosa	115
4.3.1.3. Capacidad neutralizante de los anticuerpos séricos	115
4.3.1.4. Evaluación comparativa de calidad de anticuerpos entre Experimento 1 y Experimento 2	116
4.3.1.5. Capacidad opsonizante de los anticuerpos inducidos por los péptidos dendriméricos.....	118
4.3.1.6. Evaluación de presencia de anticuerpos contra proteínas no estructurales	119
4.3.2. Evaluación de la respuesta inmunitaria celular inducida por los nuevos péptidos dendriméricos	120
4.3.2.1. Evaluación de la linfoproliferación de linfocitos de memoria a los 44 dpv	120
4.3.2.2. Evaluación de la secreción de IFN- γ por parte de las CMNs de los animales vacunados	121
4.3.3. Evaluación de protección frente al desafío con VFA O1Campos en bovinos vacunados con los nuevos péptidos dendriméricos $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ o $B_{(O1C)4}T_{VP1}$	122
4.3.3 Evaluación de protección frente al desafío con VFA O1Campos en bovinos vacunados con los nuevos péptidos dendriméricos $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ o $B_{(O1C)4}T_{VP1}$	123
4.3.3.1. Evaluación del VFA provenientes de las lesiones de los animales vacunados.....	125

5. <u>DISCUSIÓN</u>	127
5.1. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y CAPACIDAD PROTECTORA DE LAS VACUNAS BASADAS EN EL VFA O/UK 11/01 (Experimento 1).....	132
5.2. EVALUACIÓN DE INMUNIDAD PROTECTORA EN BOVINOS CON NUEVOS PEPTIDOS DENDRIMÉRICOS	137
6. <u>CONCLUSIONES</u>	141
7. <u>REFERENCIAS</u>	145

Resumen

ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE CONSTRUCCIONES PEPTÍDICAS DENDRIMÉRICAS COMO VACUNA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA EN BOVINOS

RESUMEN

El virus de la fiebre aftosa (VFA) causa una enfermedad altamente contagiosa entre animales con pezuña hendida. Los brotes de la enfermedad causan pérdidas económicas graves para la industria agropecuaria por lo que su control es de alta importancia. El control de la fiebre aftosa (FA) en áreas endémicas se realiza por vacunaciones periódicas con virus inactivado. La vacuna inactivada genera una respuesta humoral fuerte que confiere protección. Sin embargo, esta vacuna presenta algunas desventajas, siendo la principal la producción de virus infectivo en plantas de alta seguridad, que han llevado al desarrollo de nuevos candidatos vacunales alternativos. Las vacunas a péptido sintético del VFA son las candidatas más prometedoras al ser altamente puras, definidas, estables y seguras.

El objetivo del presente trabajo de tesis fue evaluar la capacidad inmunogénica y protectora de construcciones peptídicas dendriméricas como vacuna contra el VFA en bovinos. Inicialmente, se evaluaron si las construcciones derivadas del VFA O/UK ($B_{(OUK)_2}T_{3A}$ o $B_{(OUK)_4}T_{3A}$) que lograron protección en cerdos, eran capaces de inducir protección cruzada frente al desafío con VFA O1Campos en bovinos; sin embargo no se alcanzó la completa protección de los animales. En un segundo experimento, se diseñaron nuevos péptidos dendriméricos que contenía un epitope T bovino (21-40 de VP1, T_{VP1}) y el epitope B de la proteína VP1 [135-160] del VFA O1Campos ($B_{(O1C)}$). Se estudiaron las repuestas inmunes generadas por las estas nuevas construcciones peptídicas ($B_{(O1C)_2}T_{VP1}$ o $B_{(O1C)_4}T_{VP1}$) y la capacidad de protección de las mismas frente al desafío viral. Los títulos de anticuerpos seroneutralizantes de los animales vacunados para $B_{(O1C)_4}T_{VP1}$ fueron significativamente superiores que para $B_{(O1C)_2}T_{VP1}$ al igual que los niveles de opsonofagocitosis. En este caso, cuando los bovinos vacunados fueron desafiados con el virus infectivo, todos los animales estuvieron protegidos a la generalización podal (lesiones en las patas), y el grupo $B_{(O1C)_4}T_{VP1}$ estuvo completamente protegido, al no presentar ningún otro síntoma.

Por lo tanto, nuestros resultados muestran por primera vez que la formulación tetravalente de epítopes B seleccionados unidos a un epitope T bovino, resultó en una vacuna eficaz que confiere protección completa en bovinos inmunizados. Esta vacuna peptídica sintética, por lo tanto, es un candidato prometedor con propiedades óptimas y perspectivas razonables de aplicación clínica.

Palabras claves: VFA, vacunas a péptido sintético, construcciones peptídicas dendriméricas, protección completa, bovinos.

Abstract

STUDY OF THE ACTION OF DENDRIMERIC PEPTIDE CONSTRUCTIONS AS A VACCINE AGAINST FOOT-AND-MOUTH DISEASE IN BOVINE

ABSTRACT

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes a highly contagious disease in cloven-hoofed animals. Disease outbreaks cause devastating economic losses to the livestock industry, so disease management is of utmost importance. Foot-and-Mouth (FMD) control in endemic areas is performed by regular vaccination based on inactivated whole-virus. Inactivated vaccine elicits a strong humoral response conferring a substantial protection. However, these conventional vaccines have shown a number of disadvantages, for example the production of infective virus in high security system, that has led to the development for new alternative vaccine candidates. Synthetic peptides FMDV vaccines are the most promising candidates as they are highly pure, defined, stable and safe.

The aim of the present work was to evaluate the immunogenic and protective capacity of dendrimeric peptide constructs as a vaccine against FMDV in cattle. Firstly, we evaluated whether constructs derived from VFA O/UK ($B_{(OUK)2}T_{3A}$ or $B_{(OUK)4}T_{3A}$) which achieved protection in pigs, were able to induce cross-protection against challenge with VFA O1Campos; however, full protection was not achieved. In a second attempt, novel dendrimeric peptides were designed containing a bovine T epitope (21-40 from VP1, T_{VP1}) and the B-cell site VP1 [135-160] from FMDV O1 Campos serotype ($B_{(O1C)}$). Immune responses elicited by these new dendrimeric peptides ($B_{(O1C)2}T_{VP1}$ or $B_{(O1C)4}T_{VP1}$) were studied along with protection against challenge. The mean viral neutralization titer of animals from $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ group was significantly higher than the mean viral neutralization titer of animals from $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ group as well as the levels of opsonophagocytosis. In this case, when vaccinated cattle were challenged with the infective virus, all animals were protected from podal generalization, and group $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ was completely protected, as they did not present any other symptoms.

Thus, our results show for the first time that tetravalent formulation of selected B-cell epitopes linked to a T-bovine epitope resulted in an effective vaccine that conferred solid protection in immunized cattle. This synthetic peptide vaccine, therefore, is a promising candidate with optimal properties and reasonable prospects of clinical application.

Keyword: FMDV, Synthetic peptides vaccines, dendrimeric peptide constructs, solid protection, cattle.

Abreviaturas y siglas

ABREVIATURAS Y SIGLAS

α	Anti
%m/v	Concentración masa en volumen
[³ H]-T	Timidina tritiada
μ Ci	MicroCurie (unidad)
μ g	Microgramos
μ L	Microlitro
Ac	Anticuerpo
AcMo	Anticuerpo monoclonal
AcSN	Anticuerpo seroneutralizante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
Ag	Antígeno
Al(OH) ₃	Hidróxido de aluminio
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
AUG	Codón de iniciación de la traducción (adenina, uracilo y citosina)
BCR	Recepto de linfocito B ("B-cell receptor")
BEI	Etilenimina binaria
BHK-21	Línea celular de fibroblastos adherentes obtenidos de riñón de hámster lactante
BSA	Albumina sérica bovina
BoMac	Línea celular de macrófagos bovinos obtenidos a partir de macrófagos peritoneales bovinos
Buffer	Solución amortiguadora de pH
c.p.m.	Radiactividad en cuentas por minuto

C3b	Componente 3b del sistema de complemento
CAP	7-metil-guanosina, estructura protectora en extremo 5' de mensajeros
CD	Grupo de diferenciación ("Cluster of differentiation")
CFDA-SE	Diacetato de carboxifluoresceína éster de succinimidilo
CFS	Peste clásica porción ("Classical fever swine")
CFSE	Carboxifluoresceína éster de succinimidilo
CICUAE	Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación
CICVyA	Centro de Investigación de Ciencias Veterinarias y Agronómicas
CMH (-I/-II)	Complejo mayor de histocompatibilidad (de clase 1 / de clase 2)
CMN	Células mononucleares
CNIA	Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias
CO ₂	Dióxido de carbono
ConA	Concanavalina A
CPA	Célula presentadora de antígeno
CPS	Proteína circumsporozoito
cre	Elemento activador de replicación en <i>cis</i> ("cis-acting replication element")
CSA	Células secretoras de anticuerpos
D.O.	Densidad óptica
DICT ₅₀	Dosis infectiva de cultivo de tejido 50%
DIVA	Diferenciación de animales infectados de vacunados ("Differentiating Infected from Vaccinated Animals")
DL ₅₀	Dosis letal 50%
dpi	Días post-infección
dpv	Días post-vacunación

eIF4G	Factor de iniciación de traducción eucariota 4G (“eukaryotic translation initiation factor 4 G”)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”)
ELISPOT	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos (“Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay”)
EFL	ELISA Fase Líquida
FA	Fiebre Aftosa
FITC	fluoresceína-5-isotiocianato (“Fluorescein IsoTioCyanate”)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
H3	Histona H3
hAd5	Adenovirus defectivo humano 5
IE	Índice de estimulación
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IN	Índice de neutralización
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IRES	Sitio de entrada interna al ribosoma (“Internal Ribosome Entry Site”)
Kit	Conjunto de elementos que conforman un ensayo
Kpb	Kilopares de bases
LM	Linfonódulos mandibulares
LRM	Linfonódulos retrofaríngeos mediales
LTB	Linfonódulo traqueo-bronquiales
MAP	Sistema múltiple de antígenos peptídicos
MAR	Mutantes virales resistentes a neutralización con anticuerpos monoclonales (“Monoclonal antibody resistant”)

MEM-D	Medio "Dulbecco's Modified Essential Medium"
mg	miligramos
MgCl	Cloruro de magnesio
ml	mililitro
mM	milimolar
MSF	Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias
NK	Células "Natural Killer"
nm	Nanometro
NP	No protegido
NSB-4 OIE	Nivel de seguridad biológica 4 de la OIE
NSP	Proteína no estructural ("Non-structural protein")
°C	Centígrados
OIE	Oficina Internacional Epizootias
OMC	Organización Mundial del Comercio
OPD	ofenilenediamina-H ₂ O ₂
ORF	Marco de lectura abierto ("Open reading frame")
OVA	Ovoalbumina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PANAFTOSA	Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
PBS	Buffer fosfato salino
PBST	Buffer fosfato salino- 0,05% Tween20
PCR	cadena de la polimerasa ("Polymerase chain reaction")
PEG	Polietilenglicol
pH	Medida de acidez o alcalinidad de una disolución
PGP	Protegido a la generalización poda
poli A	Tracto de varias adenosina
poli C	Tracto de varias citidinas

PP	Parcialmente protegido
Primers	Oligonucleótidos iniciadores
RGD	Motivo de aminoácidos (arginina, glicina y ácido aspártico)
RPMI	Medio "Roswell Park Memorial Institute"
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
RT	Retro transcripción
SAP	Proteína de asociación a SLAM ("SLAM-associated protein")
scARN	Ácido ribonucleico de simple cadena
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agropecuaria
SFB	Suero fetal bovino
sIgA	Inmunoglobulina A secretoria
SLAM	Molécula de señalización de activación linfocítica ("Signaling lymphocytic activation molecule")
SN	Seroneutralización
SNB	Suero normal bovino
SNC	Suero normal de conejo
TCR	Receptor de linfocitos T ("T-cell receptor")
T _{FH}	Linfocito T colaborador folicular ("T follicular helper")
Th	Linfocito T colaborador ("T helper cell")
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral (" tumor necrosis factor")
TNV	Título e neutralización viral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF ("TNF-related apoptosis-inducing ligand")
U.I.	Unidad internacional
UNQ	Universidad Nacional de Quilmes
UTR	Regiones no traducibles ("untranslated region")

VFA	Virus de la Fiebre Aftosa
VFAi	Virus de la Fiebre Aftosa inactivado
VIAA	Antígenos asociados a la infección viral (“Virus-infection-associated antigen”)
VP	Proteína viral (“Viral protein”)
VPg	Proteína vira asociada al genoma (“viral protein genome-linked”)
wt	<i>wild type</i>

Índice de figuras

ÍNDICE DE FIGURAS**1. INTRODUCCION**

Figura 1.1 – Mapa del estatus oficial de Fiebre Aftosa de los países miembro de la OIE	7
Figura 1.2 - Zonas reconocidas por la OIE como libres de la fiebre aftosa en el territorio Argentino	10
Figura 1.3 – Organización y expresión (flecha rosa) genómica de VFA.....	16
Figura 1.4 – Representación esquemática de las proteínas VP1, VP2 y VP3 y de la partícula de VFA	19
Figura 1.5 - Representación del ciclo infectivo del VFA. Unión del VFA a célula blanco e internalización	25
Figura 1.6 – Presentación de antígeno en CPA. Las CPAs poseen dos vías de presentación funcionales	33
Figura 1.7 – Regulación e inducción de células Th1 y Th2	35
Figura 1.8– Activación de linfocitos B por reconocimiento de epitope.....	38
Figura 1.9– Representación de activación de linfocitos B tras colaboración de células T _{FH}	40
Figura 1.10 – Colaboración de células T CD4 a células T CD8	45

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1 – Esquema de vacunación y sangría de los experimentos presentados en esta Tesis	72
Figura 3.2 – Esquema representativo de análisis de linfoproliferación por marcación con CFSE.....	85
Figura 3.3 – Esquema de ubicación de ganglios procesados	90

4. RESULTADOS

Figura 4.1 – Comparación de secuencias entre cepas	95
--	----

Figura 4.2 – Títulos de anticuerpos de animales vacunados con vacuna tetravalente anti-Aftosa.....	96
Figura 4.3 – Títulos de IgGs séricas α -dendrímero o α -VFA de los animales vacunados con $B_{(OUK)2}T_{3A}$ o $B_{(OUK)4}T_{3A}$ en diferentes tiempos	98
Figura 4.4 – Isotipos de los anticuerpos séricos	99
Figura 4.5 – Isotipos de los anticuerpos de mucosa nasal	100
Figura 4.6 – Neutralización de VFA O1Campos por sueros de animales vacunados .	102
Figura 4.7 – Secreción de IFN- γ de las CMNs de los animales vacunados con los péptidos dendriméricos luego del desafío con VFA O1Campos (3dpi).....	108
Figura 4.8 – Perfiles de isotipos y niveles totales de células secretoras de anticuerpos contra VFA desarrollados en animales vacunados luego del desafío	110
Figura 4.9 – Títulos de IgGs séricas α -dendrímero o α -VFA de los animales vacunados con los nuevos péptidos en diferentes tiempos del experimento.....	113
Figura 4.10 – Isotipos de los anticuerpos séricos	114
Figura 4.11 – Isotipos de los anticuerpos de mucosa nasal	115
Figura 4.12 – Porcentaje de VFA O1Campos neutralizados por anticuerpos de sueros de animales vacunados	116
Figura 4.13 – Porcentaje de VFA O1Campos opsonofagocitado.....	119
Figura 4.14 – Comparación de lesiones en lengua de los animales vacunados y animal control	124
Figura 4.15 – Productos de RT-PCR VP1 en epitelios de lesiones dudosas y secuenciación.....	125

Índice de tablas

ÍNDICE DE TABLAS**1. INTRODUCCION**

TABLA 1.1 – Vías experimentales de entrada del virus y dosis mínimas	5
--	---

3. MATERIALES Y MÉTODOS

TABLA 3.1 – Péptidos sintéticos utilizados en esta tesis (Experimento 1)	69
--	----

TABLA 3.2 – Péptidos sintéticos utilizados en esta tesis (Experimento 2)	70
--	----

4. RESULTADOS

TABLA 4.1 – Títulos e índices de seroneutralización viral de los sueros de los animales vacunados con los péptidos B _{(OUK)₂T_{3A}} o B _{(OUK)₄T_{3A}} o vacuna comercial, a los 32dpv y de los sueros de los animales negativos.....	101
---	-----

TABLA 4.2 – Respuesta linfoproliferativa de las CMNs provenientes de animales vacunados	104
---	-----

TABLA 4.3 – Secreción de IFN- γ de las CMNs aisladas de sangre periférica de animales vacunados a los 38dpv –	105
--	-----

TABLA 4.4 –Puntaje clínico y protección de los animales vacunados con los péptidos dendriméricos B _{(OUK)₂T_{3A}} o B _{(OUK)₄T_{3A}} luego del desafío viral	107
--	-----

TABLA 4.5 – Títulos e índices de seroneutralización viral de los animales vacunados con los péptidos B _{(OUK)₂T_{3A}} o B _{(OUK)₄T_{3A}}	117
--	-----

TABLA 4.6 – Respuesta linfoproliferativa de animales vacunados	121
--	-----

TABLA 4.7 – Secreción de IFN- γ de la CMNs aisladas de sangre periférica de animales vacunados a los 44dpv	122
---	-----

TABLA 4.8 – Puntaje clínico y protección de los animales vacunados con los péptidos dendriméricos B _{(OUK)₂T_{3A}} o B _{(OUK)₄T_{3A}} luego del desafío	123
---	-----

Introducción

1. INTRODUCCION

1.1. FIEBRE AFTOSA

1.1.1. El virus y la enfermedad

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad aguda altamente contagiosa, que afecta a los artiodáctilos, incluyendo a rumiantes domésticos como bovinos, porcinos, ovinos y caprinos así como a más de setenta especies silvestres tales como: bisontes, jabalíes, camellos, llamas, alpacas, vicuñas, guanacos, antílopes, ciervos, venados, búfalos, yacks, erizos, armadillos, nutrias, elefantes y carpinchos (Alexandersen et al., 2003; Callis, 1979). Se ha reportado infección experimental en perros, gatos, conejos y chinchillas (Callis, 1979), así como detección de viremia post-inoculación experimental en gato, mono, rata y rana (Cottral y Bachrach, 1968). La infección experimental de ratones (Borca et al., 1986; Fernandez et al., 1986) y cobayos (Knudsen et al., 1979) de laboratorio permitieron establecer modelos experimentales. Los equinos no son susceptibles al virus.

Esta enfermedad fue observada por primera vez en 1514 y descripta en Venecia, Italia, por Hieronymus Fracastorius de Verona, en su publicación "De Contagione et Contagiosis Morbis et Eorum Curatione" de 1546. Siglos después, el agente etiológico de esta importante enfermedad del ganado, llamado *Virus de la Fiebre Aftosa* (VFA), fue identificado por Loeffler y Frosch en 1897, siendo además el primer virus reconocido responsable una enfermedad animal (Loeffler, 1897).

El VFA produce una enfermedad aguda, sistémica y vesicular. En una infección natural la vía principal de ingreso del virus es el tracto respiratorio, y solo con 1 a 10 partículas infectivas pueden producir la enfermedad (Donaldson et al., 1987; Sellers et al., 1971). La replicación inicial del virus ocurre en el epitelio de la faringe y en la superficie dorsal del paladar blando, tanto en bovinos como en porcinos (Alexandersen

et al., 2001; Burrows et al., 1981; Oleksiewicz et al., 2001), y en las tonsilas en ovinos (Burrows, 1968). Dicha replicación inicial ocasiona las vesículas (aftas) primarias en los tejidos mencionados, y dentro de las 24-48 horas subsiguientes aparece la fiebre y el virus logra ingresar al torrente sanguíneo. La viremia generalmente perdura entre 3 y 5 días en bovinos, y es la vía por la cual el VFA se disemina a los diferentes órganos y tejidos produciendo las vesículas secundarias. Las regiones del cuerpo del animal en que más frecuentemente aparecen estas aftas secundarias son la cavidad oral, lengua y alrededor de las pezuñas. En algunos casos aparecen lesiones en el epitelio del hocico ollares, ubre, pezones y pilares del rumen. 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 ordeño y la lactancia. Todo esto redundando 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.

La fase aguda de la enfermedad dura aproximadamente una semana, y luego disminuye gradualmente coincidiendo con la aparición de una respuesta humoral fuerte. Por lo tanto la eliminación del virus de la circulación y la reducción significativa de la carga viral en la mayoría de los órganos, secreciones y excreciones, tanto en rumiantes como en cerdos, coincide temporalmente con el comienzo de la detección de *anticuerpos neutralizantes en el suero* (AcSN) (Alexandersen et al., 2003). Si bien los animales adultos se sobreponen sin mayores complicaciones, existe un número variable de animales que se convierte en portadores asintomáticos, transformándose en reservorios naturales del virus. La región faríngea de los rumiantes es en donde el virus puede establecer una infección persistente, aún en presencia de altos títulos de AcSN (McVicar y Suttmoller, 1976). El VFA puede ser aislado de los fluidos de garganta y esófago de estos rumiantes portadores desde unas pocas semanas hasta varios años luego de la

infección inicial. El mecanismo mediante el cual la persistencia se establece no está claro, pero podría ser el resultado de un equilibrio dinámico entre la respuesta inmunitaria del animal hospedador y la selección de variantes antigénicas virales. Existe evidencia que estos animales portadores podrían ser el disparador de brotes de la enfermedad cuando son enfrentados con animales susceptibles (Hedger y Condy, 1985).

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 afectar el músculo cardíaco produciendo miocarditis (Donaldson et al., 1987; Karapinar et al., 2010) 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 inmunitaria humoral que se desarrolla contra el virus permite la disminución de la viremia y la recuperación de la enfermedad.

El contagio está determinado por tres aspectos esenciales: la cantidad de virus eliminada por el animal infectado, la capacidad infectiva del virus afuera del animal y la cantidad de virus requerida para comenzar la enfermedad en el animal susceptible (Sellers et al., 1971). Los animales susceptibles pueden contagiarse por contacto directo con animales infectados, ya sea a través de aerosoles que vehiculizan el virus hasta el tracto respiratorio, por transferencia mecánica del virus a través de cortes o abrasiones de la piel o de mucosas, o por medio de la inoculación experimental. Las vías de entrada del virus y las dosis mínimas necesarias para producir una enfermedad clínica bajo condiciones experimentales, han sido resumidas por Alexandersen y colegas (Tabla 1.1) (Alexandersen et al., 2003).

TABLA 1.1 – Vías experimentales de entrada del virus y dosis mínimas.

Especie	Inhalación	Inoculación intradérmica	Inoculación intramuscular	Instilación nasal	Administración oral
Bovino	10	100	10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶
Ovino	10	100	10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶
Porcino	>800	100	10 ⁴	desconocido	10 ⁴ -10 ⁵

Otra forma de contagio es por contacto indirecto, en el que el virus es transportado a través de maquinarias, vehículos o personas. También es importante el contagio por ingestión de alimentos contaminados con el virus, siendo esta última forma de contagio la que originó uno de los últimos brotes de FA que ocurrieron en Japón y Sudáfrica en el año 2000 y en el Reino Unido en 2001 (Knowles et al., 2001).

Las tres especies principales involucradas en un brote de FA son, el ovino como huésped de mantenimiento principalmente, el porcino como amplificador y el bovino como indicador. Esta última especie, en particular, es la más importante en la diseminación y mantenimiento de la cadena epidemiológica del VFA por su susceptibilidad al contagio por vía aérea (House y Mebus, 1998). Los bovinos infectados pueden excretar virus durante los primeros días de la enfermedad antes del desarrollo de los síntomas característicos, clasificándolos como indicadores. Los ovinos, animales de mantenimiento de VFA, pueden infectarse con el virus pero los síntomas son leves o subclínicos. Por lo tanto, su detección no es inmediata aumentando la posibilidad de contagio a otros animales. El porcino, como amplificador, juega un papel importante en la cadena epidemiológica de la FA particularmente por ser, después de infectado, un gran replicador y diseminador aéreo del VFA. (Donaldson y Ferris, 1980; Donaldson et al., 1987; Sellers y Parker, 1969).

1.1.2. Distribución geográfica de la enfermedad y estatus de Argentina

A pesar de la considerable información acumulada en los últimos años sobre el virus, la enfermedad y la disponibilidad de vacunas, la FA sigue afectando a amplias zonas del mundo, y es la enfermedad viral más transmisible en los animales. La FA ocupa un lugar importante en la lista única de enfermedades de declaración obligatoria de la *Oficina Internacional Epizootias* (OIE) también llamada Organización Mundial de Sanidad Animal.

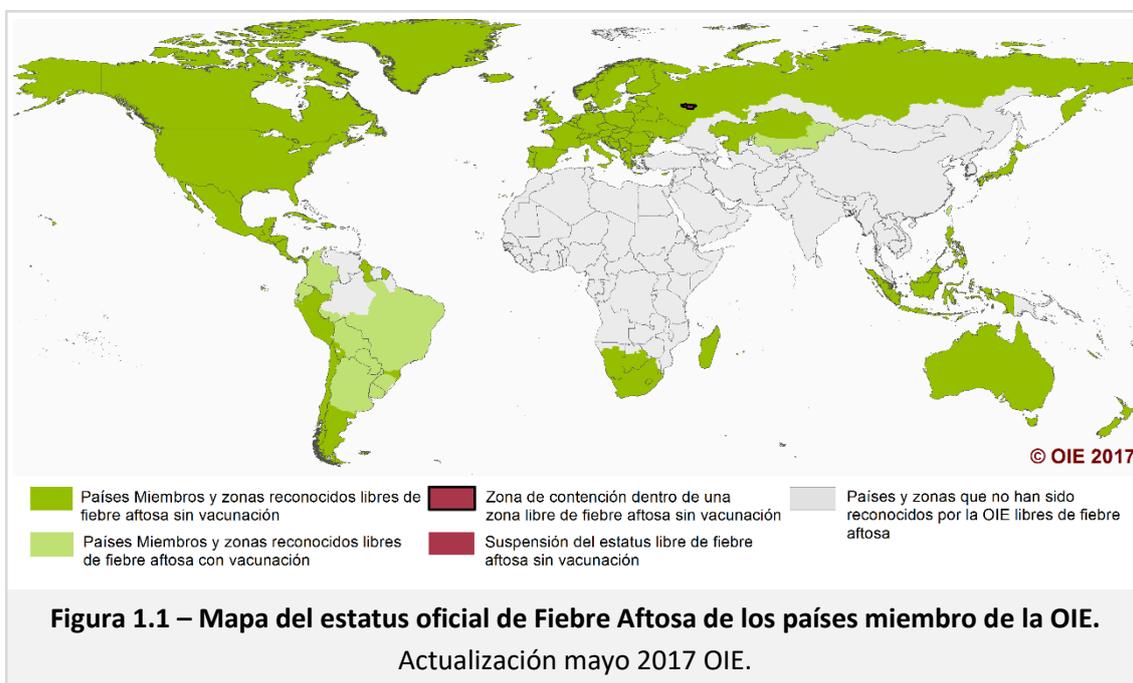
La OIE ha identificado como los patrones de enfermedad de mayor importancia:

- La alta transmisibilidad
- La rápida difusión
- Las consecuencias graves para la economía o para la salud pública
- La importancia en el comercio internacional de animales y productos animales.

La FA se encuentra entre las enfermedades animales que reúnen todas las características mencionadas, a excepción de ser un riesgo para la salud pública. En consecuencia, la OIE ha establecido, primera vez, una lista oficial de países y zonas libres de esta enfermedad (Figura 1.1). La OIE ha definido un procedimiento sobre bases científicas, transparente e imparcial, para el reconocimiento del estatus sanitario de los países miembros de la Organización, respecto a la Fiebre Aftosa en su integridad o en zonas determinadas.

A causa de su alta transmisibilidad y rápida difusión, la FA ha ocurrido en casi todo el mundo; siendo endémica en varias partes de Asia y en gran parte de África y Oriente Medio. En contraste, Australia, Nueva Zelanda, Indonesia, Japón, Centroamérica, Norteamérica y Europa Occidental están actualmente libres de FA sin vacunación, y aplican estrictas medidas sanitarias ante posibles focos de enfermedad para mantener

dicho estatus. Sin embargo, la enfermedad puede ocurrir esporádicamente en áreas típicamente libres.



El último brote registrado en Australia fue en el año 1870. En América del Norte los últimos brotes ocurridos en Estados Unidos, Canadá y México se registraron en los años 1929, 1952 y 1953, respectivamente (Samuel y Knowles, 2001). Europa logró mediante campañas de vacunación erradicar la enfermedad, suspendiendo la vacunación en 1991 y fue declarada como libre desde 1997. Desde que cesó la vacunación ha habido unos pocos brotes aislados en Bulgaria (1991, 1993 y 1996), Italia (1993), Grecia (1994, 1996 y 2000), Turquía (1995 y 1996), Albania (1996) y en la ex-República Yugoslava de Macedonia (1996) (Samuel y Knowles, 2001). También se describieron brotes en Georgia (1997) y Armenia (1996) (Kitching, 1999). Los últimos y más recientes brotes en la zona europea, se detectaron en el Reino Unido (2001 y 2007), República de Irlanda (2001), Francia (2001) y Holanda (2001) (Sutmoller et al., 2003). Sin embargo, existen países/zonas europeas que no han sido reconocidas por la OIE como libres de FA, siendo estos Mónaco, Liechtenstein, Turquía, oeste de Moldavia y Kosovo. En el año 2002 Japón recuperó su estado de país libre de

FA sin vacunación; mientras que simultáneamente ocurrían nuevos brotes de FA en la República de Corea y China en 2002 (Sakamoto y Yoshida, 2002). A partir del 24 de Julio de 2014, el estatus libre con vacunación de la República de Corea es suspendido al informarse la detección de focos en de la enfermedad en Uiseong-gun.

En Sudamérica, la mayoría de los países han aplicado la zonificación y son reconocidos libres de FA con o sin vacunación de manera zonal, y la enfermedad sigue siendo endémica solamente en unos pocos países. Chile, Guayana y Guayana Francesa son los únicos países que lograron erradicar la enfermedad y son libres sin vacunación. Por su lado, Uruguay había sido declarado en 1996 declarado "libre sin vacunación" aunque tuvo rebrotes en los años 2000 y 2001. La OIE lo declaró libre con vacunación el 22 de mayo de 2003. En la actualidad son dos los países que conservan ese status, Uruguay y Paraguay.

La FA fue una enfermedad endémica durante muchos años en el territorio argentino. En 1990, se puso en marcha un plan de control de la enfermedad y se designó al *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria* (SENASA) como el organismo responsable del control y la erradicación de la misma. A partir de ese año fue obligatoria la aplicación de la vacuna anti Aftosa formulada con virus inactivado y adyuvante oleoso. Con la regularización de la aplicación de la vacuna se logra que desde 1994, último brote de FA, hasta 1997 no se registre presencia del VFA en el territorio. El 30 de mayo de 1997, el Comité Internacional de la OIE declaró a la Argentina país libre de Fiebre Aftosa con vacunación. Esto significa que se reconoce la preocupación por controlar la enfermedad y que la vacunación es preventiva. Para mantener esta calificación no pueden aparecer animales enfermos durante al menos dos años. Con ese reconocimiento, la Argentina pudo empezar a exportar carnes a países como Estados Unidos, donde no hay casos de Aftosa desde 1929. No obstante, era altamente deseable

alcanzar el estatus “sin vacunación”, ya que el comercio internacional sería menos riguroso y la costosa vacunación que se realiza dos veces al año no sería necesaria.

Para alcanzar el estatus libre de FA sin vacunación, se debe suspender la vacunación por 12 meses, período en el cual no deben aparecer casos de animales enfermos tras controles periódicos. Es por ello que en 1999 se suspende la vacunación anti Aftosa en nuestro país, y la Argentina pasa a formar parte de los países libres de FA sin vacunación en mayo de 2000. Sin embargo, pocos meses después, agosto de ese mismo año, se detectaron animales infectados provenientes de Paraguay en la provincia de Formosa. Estos animales fueron ingresados ilegalmente, ya que Paraguay es un país libre con vacunación, y por ello los animales deben cumplir una serie de medidas de vigilancia y control para ingresar al territorio argentino, los cuales no fueron llevados a cabo. Al detectarse el VFA en algunos de estos animales, se tomaron las medidas necesarias, considerando las normas internacionales, para evitar que el virus se dispersara. En consecuencia, se sacrificaron los animales de las provincias de Formosa, Corrientes y Entre Ríos, que estuvieron en contacto con los animales infectados introducidos, y se realizaron análisis para detección de VFA en animales de alrededores, los cuales resultaron negativos. Los informes de análisis y control fueron remitidos a la OIE, organismo que permitió que la Argentina mantuviera su condición de país libre de la enfermedad en ese momento. A pesar de tener la situación controlada, Argentina sufrió un golpe comercial importante al prohibirse la importación de carnes argentinas a los Estados Unidos y China.

En abril de 2001, SENASA implementa el Plan de Erradicación de la Fiebre Aftosa 2001, mediante la Resolución N° 5/01, que establece como una de sus principales estrategias, la vacunación sistemática de los rodeos bovinos a través de la participación activa de los productores. El área donde se implementa el Programa de Vacunación Anti Aftosa Sistemática abarca la totalidad de las provincias ubicadas al norte de Río Negro

y Neuquén (Figura 1.2). El territorio ubicado al sur del paralelo 42° se mantuvo libre de la enfermedad durante la epidemia. A esta zona 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 el cual fue otorgado en Mayo del año 2002 (*Patagonia Norte B*, sin vacunación y *Patagonia Norte A* zona “buffer” con vacunación).



Con el Programa de Vacunación Anti Aftosa Sistemática en exitosa ejecución, en el año 2003 se reconoce al territorio ubicado al norte del paralelo 42° zona libre de FA que practica la vacunación (país libre de FA zonificado). En agosto de ese año, se origina un foco de la enfermedad en la provincia de Salta asociado cronológicamente con la presencia de la enfermedad en Paraguay y Bolivia. En consecuencia, se suspende el estatus de zona libre; Argentina que ya tenía declarado el alerta sanitario fronterizo y luego de la emergencia sanitaria reinstalada por este foco, adopta medidas preventivas

para evitar la invasión de la enfermedad en territorio nacional, con la delimitación de un *Cordón Fronterizo* en el año 2004. Esta zona de alta vigilancia de 25 km de ancho se encuadra en las provincias de Salta, Formosa, Misiones y Corrientes, contra las fronteras de Bolivia y Paraguay. Posteriormente, el 18 de enero de 2005 se recupera el estatus de libre de FA con vacunación. Esta franja del territorio perteneció siempre a la zona Centro-Norte, pero cuando a esta se le restituyó el estatus de libre, el cordón quedó excluido de ese reconocimiento por un acuerdo entre la OIE y los países del Comité Veterinario Permanente del Cono Sur en el año 2007. Finalmente, el 4 de febrero de 2011 se lo reconoció como libre de la enfermedad manteniendo la zonificación diferencial del Centro-Norte. Por último, una pequeña zona de altos valles andinos de pastoreo en la provincia de San Juan, Valles de Calingasta, es considerada a partir de mayo de 2013 como libre de FA sin vacunación.

1.1.3. Importancia económica

Como ya se mencionó, la FA es una de las enfermedades del ganado que causa pérdidas económicas considerables, a pesar de la baja tasa de mortalidad y la recuperación completa luego de la fase aguda. El alto grado de morbilidad, las pérdidas de productividad de carne, leche y derivados, y las lesiones asociadas a infecciones secundarias, son las pérdidas económicas directas que sufren los productores ganaderos e industrias relacionadas. Sin embargo, las pérdidas económicas más importantes son ocasionadas por las restricciones impuestas sobre el comercio internacional de ganado, y las medidas de emergencia para controlar un brote. Entre ellas se incluyen, el sacrificio de todos los animales infectados, recuperados y en contacto con los focos de la enfermedad que son sensibles a la misma (rifle sanitario), eliminación de todos los productos animales, cuarentena estricta y controles del movimiento de hacienda, equipos y vehículos, desinfección completa de los locales y de todo el material infectado,

y finalmente la ejecución de la vacunación en anillo, que abarca un radio de 15km en torno al lugar infectado.

El comercio internacional está regulado por la *Organización Mundial del Comercio* (OMC). A su vez el marco legal para el comercio de animales y productos de origen animal, está contenido en el Acuerdo sobre la *Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias* (Acuerdo MSF). El objetivo de las MSF es facilitar el comercio de estos elementos entre países sin poner en riesgo la vida o salud de las personas, animales o plantas. Este acuerdo estableció que actualmente las barreras sanitarias sean las únicas legítimas para el comercio de animales y productos animales, basándose para ello en las directrices y recomendaciones establecidas por la OIE. En los últimos años, tanto países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo, libres de la enfermedad, han sufrido la re introducción del virus, perdiendo y recuperando alternativamente el reconocimiento de país libre de FA, con las consecuencias económicas que esto implica. Por lo tanto, en países exportadores de animales y sus productos derivados, como es el caso de Argentina, las pérdidas económicas de mayor importancia se deben a las restricciones en el comercio internacional. En 2005, Argentina produjo el 9.5% de las 6.3 millones de toneladas de carne comercializadas en los mercados externos, ubicándose como tercer exportador mundial.

Tras los brotes del 2000-2001, la OIE rebajó la categoría de las carnes de nuestro país a libre de la enfermedad con vacunación regional. En marzo de 2001, con el reinicio de la vacunación, Estados Unidos suspendió las importaciones de la Argentina. Pese a las continuas peticiones para recuperar el mercado, las autoridades norteamericanas sólo aceptaron el ingreso de carne argentina proveniente de la Patagonia, considerada libre de la enfermedad sin vacunación. La Argentina terminó el año 2014 en el 11º puesto como exportador mundial de carne (60% inferior a 2005), en un proceso de pérdida de posiciones que ya lleva prácticamente una década, con la sola excepción del

año 2009 según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2014). El 30 de agosto de 2012 la Argentina solicitó la revisión de las restricciones que Estados Unidos había mantenido en relación a las importaciones de animales, carne y otros productos pecuarios procedentes de la Argentina. Luego en junio de 2015 el Órgano de Solución de Diferencias de la OMC oficializó el fallo en el que determinó que las medidas sanitarias impuestas por Estados Unidos a partir de un brote de Fiebre Aftosa en 2001, repetidas en Canadá y México, eran injustificadas, discriminatorias y sin base científica (OMC, 2015). Estas medidas provocaron pérdidas estimadas en alrededor de US\$2000 millones de dólares a la Argentina por la prohibición para exportar carne vacuna en pie y refrigerada desde todo su territorio hacia esos tres mercados. Sin embargo, semanas antes de oficializarse dicho fallo, Estados Unidos anunció el levantamiento de las barreras y el inicio del proceso de reapertura de su mercado. Voceros de la embajada de los Estados Unidos en el país explicaron que luego de una revisión científica detallada y transparente, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos concluyó que la situación de la Fiebre Aftosa en la Argentina ya no requería de una prohibición al ingreso de carne de ese país. Según cálculos del gobierno argentino, la apertura de estos mercados puede alcanzar valores de unos 280 millones de dólares anuales.

Se ha estimado que para el año 2020 la demanda de alimentos de origen animal crecerá en términos absolutos y estará acompañado de un fuerte crecimiento de la producción animal. Para aprovechar las oportunidades que presenta el comercio internacional, el país deberá, como mínimo, mantener las condiciones sanitarias establecidas en las directrices y recomendaciones de la OIE y las normas del MSF. Por lo tanto, consolidar el uso de las herramientas y metodologías apropiadas ya existentes y generar nuevos conocimientos en el área de FA, con el objetivo de contribuir a mantener la situación sanitaria actual y/o adquirir una categoría superior, constituyen dos prioridades fundamentales para Argentina, tanto para las Instituciones Públicas como para el sector productivo.

1.2. VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

1.2.1. Clasificación y organización genómica

El VFA es un virus perteneciente al género Aphovirus dentro de la familia Picornaviridae. Como su nombre lo indica esta familia reúne a virus con genoma de ARN pequeños (Pico-rna-viridae; pequeño-RNA-virus) que son importantes patógenos de vertebrados. Es un virus desnudo, por lo que la partícula viral no presenta envoltura lipídica, y contiene un ARN genómico monocatenario positivo (scARN(+)) de aproximadamente 8200 nucleótidos. Este ARN genómico se encuentra empaquetado dentro de una cápside proteica con geometría icosaédrica de entre 28-30nm de diámetro. Al ser un virus desnudo no es sensible a los solventes de lípidos como el fenol y el cloroformo, pero si es muy sensible a cambios de pH inactivándose a pHs por debajo de 6,0 y por encima de 9,0 (van Vlijmen et al., 1998). El virus puede sobrevivir en leche, suero y otros materiales orgánicos, como así también por largos periodos en la carne congelada, dentro de la medula ósea o linfonódulos (House y Mebus, 1998).

El ARN viral consiste en una región codificante flanqueada por dos *regiones no codificantes o no traducibles* (UTR por sus siglas en inglés). Ambas regiones pueden adoptar estructuras conformacionales secundarias, pudiendo actuar en *cis* como elementos de regulación en la replicación viral y expresión génica.

La proteína VPg o 3B es una proteína viral pequeña que se encuentra unida covalentemente al extremo 5' de la molécula de ARN. El 5'UTR es de aproximadamente 1200 nucleótidos, es dividido en dos regiones por un tracto de varias citidinas (poli C) de longitud variable (Rowlands et al., 1978) localizado a 400 nucleótidos río arriba del extremo 5'. Se predice que la región río arriba del poli C, adopta un plegamiento en forma de horquilla alargada que unen específicamente proteínas de la célula huésped y juega un rol clave en el inicio de la síntesis de la poliproteína viral y de nuevas cadenas de ARN. Este papel funcional y estructural no ha sido caracterizado para VFA, sino que

se adopta por analogía con la estructura de hoja de trébol de los poliovirus. Río abajo de la región poli C, se predice la presencia de 2 a 4 estructuras terciaras repetidas llamadas "pseudoknots" en una región de aproximadamente 250 nucleótidos (Clarke et al., 1987; Grubman et al., 1984), su función permanece desconocida. A continuación, sobre una estructura tipo "stem-loop" de aproximadamente 55 nucleótidos de longitud aproximadamente, se localiza un motivo altamente estable denominado *cre* (*cis*-acting replication element). Este elemento es estrictamente necesario para la replicación del ARN viral y se ha demostrado que la inserción del *cre* "wild-type" (wt) en la 3' UTR es capaz de restaurar la capacidad replicativa de un ARN que porta un *cre* defectivo en su 5' UTR (Mason et al., 2002). Previo a los codones iniciadores, y solapando parcialmente con el *cre*, se encuentra el *sitio de entrada interna del ribosoma* (IRES, "Internal Ribosome Entry Site"). El IRES es de aproximadamente 465 nucleótidos y está altamente estructurado; permite la traducción CAP-independiente (CAP, 7-metilguanosa, estructura protectora en extremo 5' de mensajeros), proporcionando un mecanismo de traducción alternativo al celular, ya que este se inhibe rápidamente por la acción de proteasas virales que clivan factores de iniciación de la traducción CAP-dependiente (Devaney et al., 1988).

La región 3'UTR es relativamente corta de aproximadamente 90 nucleótidos, aunque puede variar 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). El extremo 3'UTR es esencial para la replicación e infectividad viral, y existe evidencia de interacción de esta región de los picornavirus con varias proteínas virales y del hospedador (Lopez de Quinto et al., 2002). A esta región le sigue río abajo, análogamente a los ARN mensajeros de la célula huésped, un tracto de varias adenosinas (poli A) cuya longitud varía entre 20 y 200 bases, según la cepa viral (Porter et al., 1978).

El ARN genómico contiene un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una poliproteína larga, de alrededor de 2330 aminoácidos, que es posteriormente clivada por proteasas virales durante la traducción. La traducción se inicia, tras el reconocimiento del IRES por parte de los ribosomas, en dos codones AUG funcionales separados por 84 nucleótidos. La poliproteína es escindida mayoritariamente por proteasas codificadas por el virus para obtener los diferentes productos virales. Las tres proteasas virales que median este procesamiento son Lpro, 2A y 3C (Figura 1.3).

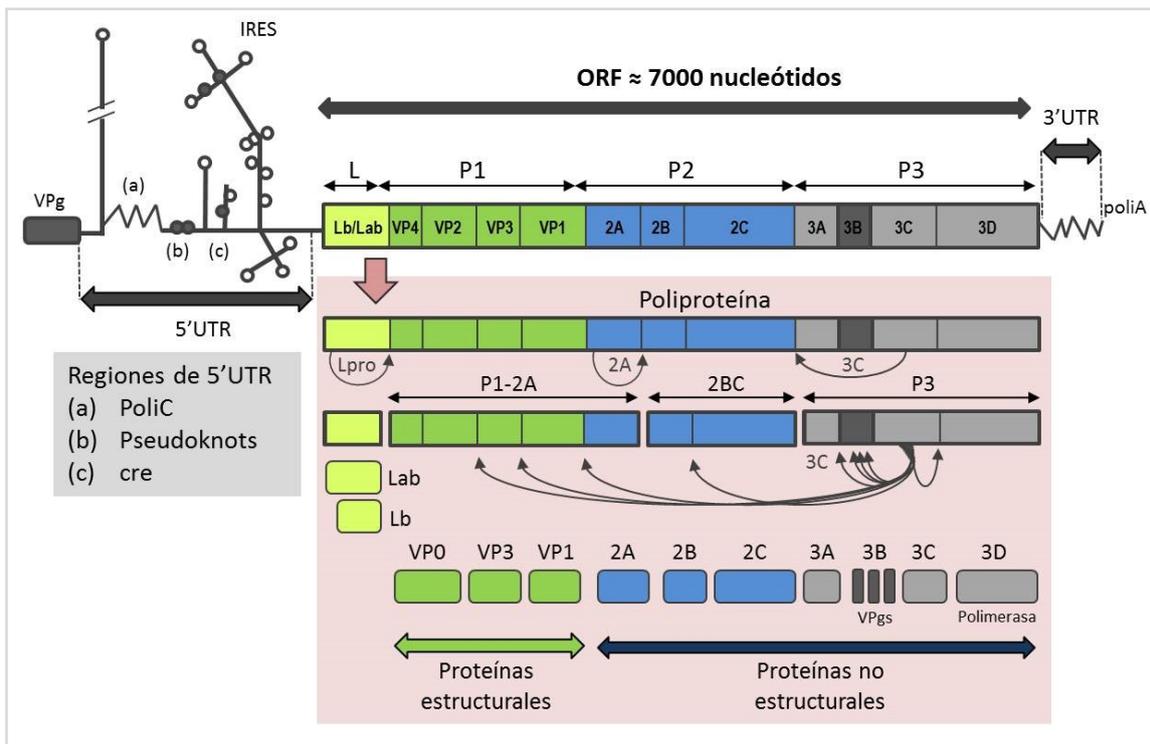


Figura 1.3 – Organización y expresión (flecha rosa) genómica de VFA. La región codificante (ORF) de 7000 nucleótidos está flanqueada por las regiones 5'UTR (1200 nucleótidos) y 3'UTR (90 nucleótidos). En el extremo 5' del RNA se encuentra unida covalentemente la proteína viral 3B (VPg). A continuación se localiza un tramo de poli C (a), la región de motivos "pseudoknots" (b), el elemento cre (cis-acting replication element) (c) y el IRES (sitio interno de unión al ribosoma). En el extremo del 3'UTR se encuentra genéticamente codificada una cola de poliA. Acción y sitio de corte de las proteasas virales (Flechas grises)

La proteína Lpro (también llamada polipéptido líder) es la primera proteína traducida, y aunque posee dos codones de iniciación AUG (Sangar et al., 1987) que codifican para dos variantes de la proteína denominadas Lab y Lb (AUG1 y AUG2 respectivamente), se ha demostrado la preferencia por el segundo codón funcional para

iniciar la traducción (Belsham, 1992) y siendo entonces la que cumple un rol más importante en la replicación del VFA (Cao et al., 1995). Esta proteína se autocliva del extremo amino terminal (N-terminal) de la poliproteína (Strebel y Beck, 1986) y se le atribuyen funciones de bloqueo en la traducción CAP-dependiente por proteólisis de eIF4G, favoreciendo así la traducción del genoma viral. Lpro es también un determinante importante de la virulencia, esencial para producir transmisión viral entre hospedadores. Sin ella el virus no puede superar la respuesta inicial de IFN tipo I del hospedador (Mason et al., 2003). Este polipéptido líder se encuentra codificado en la región L del genoma viral, a la cual le siguen las regiones P1, P2 y P3.

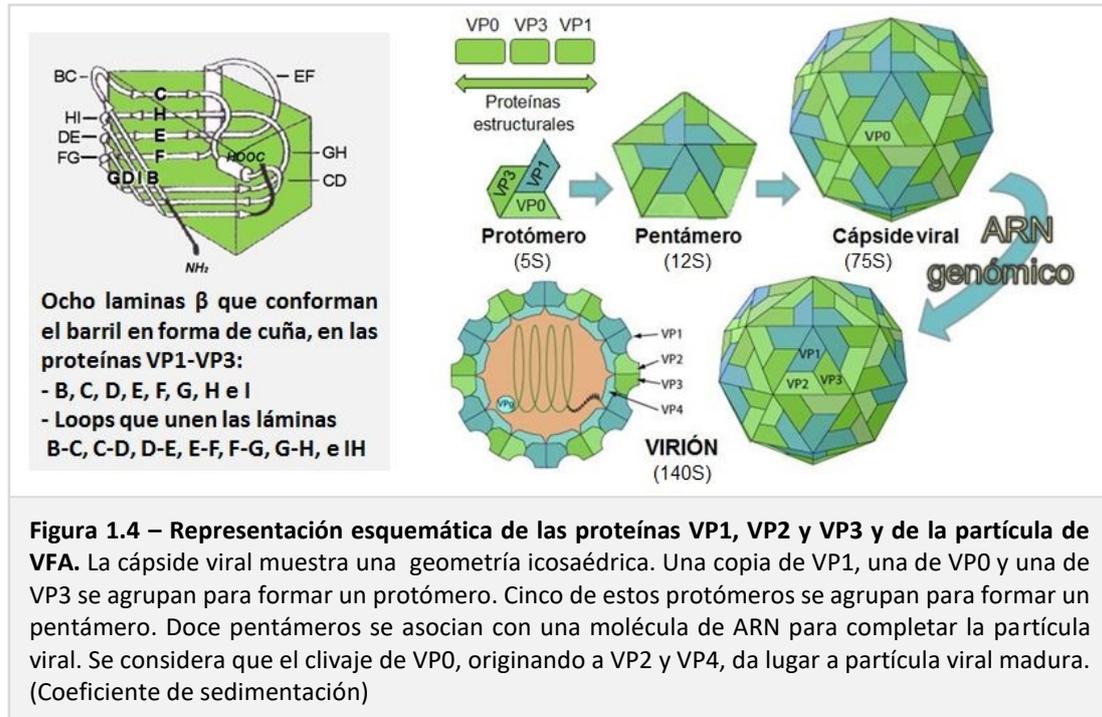
La región P1 codifica para las proteínas estructurales en el orden VP4, VP2, VP3 y VP1 (Racaniello, 2001), llamadas antiguamente 1A, 1B, 1C y 1D según la nomenclatura definida por Rueckert y Wimmer (1984). Las regiones P2 y P3 codifican para las *proteínas no estructurales* del virus (NSP, siglas en inglés) que están involucradas en la replicación. La región P2 contiene a las NPS 2A, 2B y 2C. La proteasa 2A cataliza el clivaje entre 2A y 2B; la proteína 2B contiene dominios hidrofóbicos y ha sido relacionada con permeabilidad de membranas (van Kuppeveld et al., 1997) y secreción de proteínas (Doedens y Kirkegaard, 1995). Por su lado, la proteína 2C posee una secuencia altamente conservada, contiene motivos de unión a nucleótidos trifosfato y está involucrada en la síntesis de ARN con posible actividad helicasa (Porter et al., 1993a). La proteína 2C, al igual que el precursor 2BC están involucrados e inducen la proliferación viral asociada a membrana (Bienz et al., 1990). La región P3 codifica las proteínas 3A, 3B, 3C y 3D. La región 3A se plantea, por sus motivos hidrofóbicos, que codifica para una proteína de anclaje a membrana asociada a la replicación viral. La región 3B codifica para la mencionada VPg. La región 3C codifica para una proteasa responsable de la mayoría de los clivajes de procesamiento primario y secundario de la poliproteína precursora (Porter et al., 1993b). Finalmente, la región 3D codifica para la polimerasa viral, que es una ARN polimerasa ARN dependiente.

El precursor P1-2A se genera tras el autoclivaje de la proteína Lpro del extremo N-terminal y el procesamiento del extremo carboxilo terminal (C-terminal) por la proteasa 2A. Esta última proteasa de 16 aminoácidos cataliza en *cis* la separación de P1-2A de 2BC. Posteriormente, la proteasa 3C procesa el precursor P1-2A para escindir la NSP 2A de los distintos componentes de P1, VP0 (1AB), VP3 (1C) y VP1 (1D). Para dar lugar a las proteínas estructurales maduras del virus, la VP0 se procesa autocatalíticamente en VP4 y VP2 de manera ARN dependiente una vez iniciado el empaquetamiento del genoma en la cápside viral (Curry et al., 1997). La proteasa 3C es la encargada nuevamente de procesar el precursor 2BC, dando lugar a las proteínas 2B y 2C. Finalmente, la región P3 también es procesada por la proteasa viral 3C, dando lugar a las proteínas no estructurales, 3A, tres copias distintas de 3B, dicha proteasa 3C y la ARN polimerasa viral 3D.

1.2.2. Estructura del virión y diversidad antigénica

El virión consiste en una partícula ribonucleoprotéica con simetría icosaédrica cuyo diámetro, es de unos 28-30nm. Luego del clivaje del precursor estructural P1-2A, los tres polipéptidos, VP0, VP1 y VP3, se ensamblan asimétricamente en unidades o protómeros (Figura 1.4). Cinco de estas unidades estructurales se asocian para formar un pentámero, y doce de estos pentámeros se ensamblan para conformar la cápside viral e incorporar una molécula de ARN genómico recientemente sintetizado. Por lo tanto, la cápside viral con simetría icosaédrica, está compuesta por 60 protómeros asimétricos, cada uno conformado por una copia de cada proteína viral estructural. El virión intacto presenta un peso molecular de 8400kDa (Strohmaier y 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, pentámeros, (Racaniello, 2001) 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.



El peso molecular de las proteínas VP1, VP2 y VP3, se encuentra entre 27 y 30 kDa, y adoptan configuraciones espaciales similares. Cada polipéptido adquiere una estructura terciaria en forma de barril β , compuesta por 8 láminas β antiparalelas conectadas por bucles o "loops" de longitud variable (Acharya et al., 1989) (Figura 1.4). La estructura cuaternaria final se adquiere cuando las proteínas VP0, VP1 y VP3 se ensamblan entre sí formando los protómeros. Los "loops" que unen las láminas β del barril, y los extremos C-terminales de las tres proteínas quedan expuestas en la superficie de la cápside, mientras que los extremos N-terminal están localizados en el interior. La proteína VP4, originada luego del clivaje de VP0, se localiza en su totalidad en el interior de la cápside y su extremo N-terminal está miristilado; es la proteína estructural más pequeña con un peso molecular de entre 9 y 10 kDa. La antigenicidad de la partícula viral está asociada, entonces, a los residuos aminoacídicos que están expuestos en la superficie.

El VFA es un virus antigénicamente muy diverso y heterogéneo. Con siglos de evolución en el campo, el virus sufrió variaciones que llevaron a la diversificación viral dando lugar a 7 serotipos que hoy coexisten en el mundo. 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 como su nombre lo indica se encuentra distribuido en el continente asiático.

Esta variabilidad antigénica es típica de los virus con genoma a ARN causada principalmente por las mutaciones que se producen durante la replicación. Los Picornavirus tienen una de las tasas de mutación más alta entre los virus, siendo este de una mutación por cada 10^3 - 10^5 sitios nucleotídicos por ronda de replicación (Haydon et al., 2001). Esto se debe en principio, a que sus ARN polimerasas carecen de un mecanismo de corrección de la incorporación incorrecta de nucleótidos durante la replicación. La aparición de variantes antigénicas en los virus ARN es consecuencia de tres procesos: la generación de mutantes, el éxito de los mutantes de perdurar en los procesos replicativos, y 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, lo que les confiere alta adaptabilidad y permite que las poblaciones de VFA consistan en una mezcla heterogénea de genomas (cuasiespecies) (Domingo et al., 1980).

Dentro de un mismo serotipo existen variantes (subtipos) virales. Los animales recuperados de la infección causada por una variante viral o animales vacunados contra una variante son susceptibles a la infección por un VFA perteneciente a otro serotipo o subtipo; es decir, la protección cruzada es escasa debido a las diferencias en las propiedades antigénicas e inmunológicas entre estos. Esto introduce una grave

limitación para la producción de vacunas, debiendo incluir en estas las variantes más frecuentes en cada epidemia. A su vez cada subtipo agrupa a cientos de cepas, cuya designación se realiza indicando el tipo y subtipo al que pertenece, lugar, país y año del aislamiento (por ejemplo O1/Campos/Bra/58).

La estructura de la cápside del VFA ha sido resuelta por cristalografía de rayos X para los serotipos O (Acharya et al., 1989), C (Lea et al., 1994), A (Curry et al., 1996) y algunas variantes antigénicas. A diferencia de muchos de los géneros de la familia Picornaviridae, la cápside del VFA no posee la depresión característica, llamada cañón o hendidura, que está involucrada en la interacción con los receptores de la célula hospedadora permitiendo su entrada. Por el contrario la cápside VFA relativamente lisa, sin hendidura evidente, pero sí se observa una marcada protuberancia en la superficie que corresponde al "loop" GH de la proteína VP1.

Este "loop" GH es la característica más sobresaliente del virión, y ha sido motivo de estudio por su movilidad y multifuncionalidad. Contiene un motivo altamente conservado de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que constituye el principal sitio de unión celular, y representa un sitio de neutralización crucial. El "loop" GH abarca alrededor de 20 aminoácidos, desde la posición 140 a la 160 de la VP1, y puede adoptar diferentes conformaciones espaciales sin alterar aparentemente el resto de la cápside. Es por ello que no se ha podido resolver una estructura definida para este "loop" por mapas de densidad electrónica para el serotipo O (Acharya et al., 1989) y para C (Lea et al., 1994). Sin embargo, luego de algunas modificaciones químicas para el caso del serotipo O (Logan et al., 1993) o utilización de monoclonales para el serotipo C (Verdaguer et al., 1995) se logró determinar la conformación. Dichas conformaciones son bastantes similares a pesar de la baja identidad aminoacídica. El motivo RGD adopta un giro conformacional que une a una lámina- β de su lado amino y un α -hélice de su

lado carboxilo. Las regiones situadas a los lados de estos dominios estructurales carecen de estructura secundaria, pudiendo conferirle al "loop" su particular flexibilidad.

La localización de los sitios antigénicos varía según los serotipos y han sido descritos tanto para la proteína VP1 como para las proteínas estructurales VP2 y VP3 (Kitson et al., 1990); sin embargo, la VP1 es aquella que exhibe la mayor frecuencia de variabilidad. El sitio antigénico principal localizado en el "loop" GH es denominado sitio A, y se ha determinado su alta inmunogenicidad utilizando péptidos con la secuencia aminoacídica presente en la región 140-160 de la VP1 (Bittle et al., 1982; Pfaff et al., 1988; Strohmaier et al., 1982). Se ha descrito otro sitio de neutralización a través del ensayo de mutantes virales resistentes a neutralización con anticuerpos monoclonales (AcMo) denominado MAR por sus siglas en inglés (Monoclonal antibody resistant); este sitio, denominado sitio C, está localizado en el extremo C-terminal de la VP1, aparentemente independiente del "loop" GH en serotipos A y C. Sin embargo, para el caso del serotipo O, la cercanía con el "loop" GH en la estructura de la cápside y estudios realizados por MAR, sugieren que el sitio A y C conforman un solo sitio (sitio 1) compuesto por epitopes conformacionales (Barnett et al., 1989; Mahapatra et al., 2012).

1.2.3. Reconocimiento celular del virus

El motivo RGD fue identificado, hace ya más de tres décadas, como una secuencia peptídica mínima esencial para inhibir la adhesión celular a fibronectina; las células interaccionan con la fibronectina a través de las integrinas presentes en sus membranas. Estudios estructurales y funcionales con VFA, en las últimas décadas, han establecido que el "loop" GH, específicamente el motivo RGD, de la proteína VP1 es crítico para la interacción del VFA con la integrina celular $\alpha_v\beta_3$. Los indicios iniciales de que las moléculas de integrinas estaban involucradas en el reconocimiento celular del VFA y su

internalización, fue elucidado por la alta conservación del motivo RGD dentro del contexto de un "loop" GH extremadamente variable y por ensayos con péptidos que contenían motivo RGD e inhibían la adsorción viral. Asimismo, otros ensayos iniciales mostraron que el tratamiento del VFA con tripsina provocaba la ruptura de la arginina en el motivo, perdiendo la capacidad de unirse a células susceptibles (Robertson et al., 1983). La integrina celular $\alpha_v\beta_3$, fue el primer receptor identificado para el VFA, sin embargo, estudios posteriores han identificado a otras integrinas que también actuarían como receptores, estas son $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$ y $\alpha_v\beta_8$ (Jackson et al., 2004; Jackson et al., 2002; Jackson et al., 2000). Por lo tanto, las cepas de campo de VFA usan las integrinas α_v para su adsorción e internalización en condiciones fisiológicas, siendo probablemente las integrinas $\alpha_v\beta_6$ y $\alpha_v\beta_8$ las que desempeñe un papel importante en la infección (Monaghan 2005 Jackson 2004). Vale aclarar que luego de varios pasajes del VFA en cultivos celulares, algunas cepas han prescindido el requerimiento de las integrinas para la adsorción, y en su lugar utilizan el receptor celular heparán sulfato, un proteoglicano expresado de manera ubicua; y por ello se denomina reconocimiento independiente de RGD.

La especificidad del motivo RGD es afectada por un número de parámetros estructurales y por las secuencias aminoacídicas flanqueantes. Los residuos de las posiciones -1, +1 y +2 le confieren selectividad en la unión con las integrinas celulares (Leippert et al., 1997). Se han identificado dos leucinas altamente conservadas en las posiciones +1 y +4 que son determinantes críticos para el reconocimiento del receptor. Esto sugiere que modificaciones sutiles en el "loop" GH puede tener implicaciones importantes para el reconocimiento celular dependiente de RGD por parte del virus.

1.2.4. Ciclo infectivo

Tras su unión a integrinas, el virión es introducido en la célula mediante un mecanismo dependiente de clatrina (Berryman et al., 2005; Martin-Acebes et al., 2007; O'Donnell et al., 2005). Posteriormente, el virus internalizado se localiza en un compartimento endosomal cuyo ambiente comienza a acidificarse rápidamente (Figura 1.5). Esto provoca que el virión de 140S se desensamble en las subunidades pentaméricas de 12S por el bajo pH y el ARN unido covalentemente a la proteína 3B sea liberado al citoplasma (Curry et al., 1995; Ellard et al., 1999; van Vlijmen et al., 1998).

Una vez en el citoplasma, la VPg es escindida del ARN infectante por una enzima celular antes de ser traducido (Ambros y Baltimore, 1980; Ambros et al., 1978); sin embargo se han encontrado complejos de inicio de síntesis proteica viral que contenían a VPg (Golini et al., 1980). Posteriormente, el ARN viral es reconocido por los ribosomas a través del IRES, formando polisomas encargados de la traducción de la poliproteína viral de 2330 aminoácidos. Las proteasas virales procesan la poliproteína co-transcripcionalmente para obtener los productos precursores y posteriormente las proteínas virales maduras, tanto estructurales como no estructurales. Paralelamente, las proteasas virales maduras clivan proteínas necesarias para la viabilidad celular, como factores de transcripción (eIF4G), 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 y Drew, 1994).

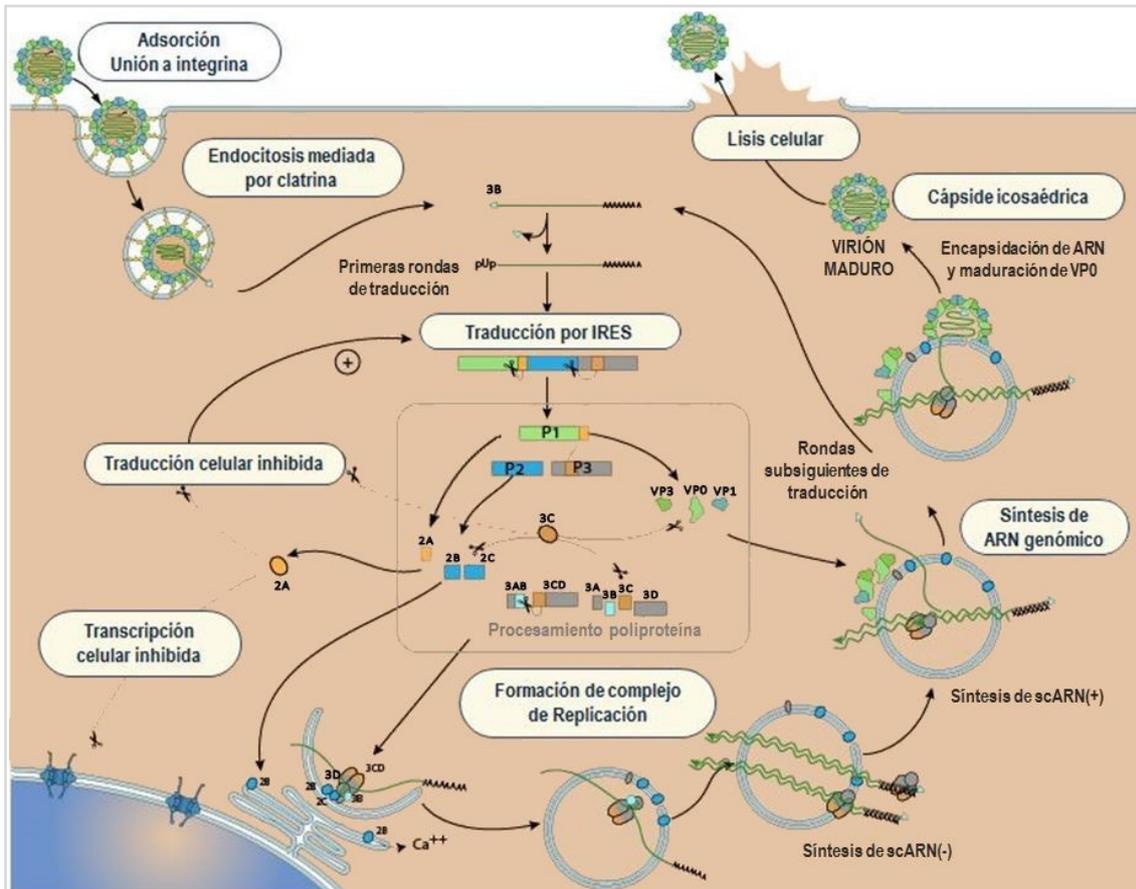


Figura 1.5 - Representación del ciclo infeccioso del VFA. Unión del VFA a célula blanco e internalización. El ARN genómico es liberado al citoplasma celular y comienza la traducción mediada por IRES. Se sintetiza la poliproteína viral y es procesada por las proteasas virales de manera *cis* y *trans*. El ARN viral es utilizado como molde para la síntesis de la molécula de ARN negativo, complementario al genoma, tras la formación de los complejos de replicación. Luego este ARN negativo es utilizado como molde para sintetizar la cadena de ARN positiva. Esta scARN(+) es empaquetada y la proteína VPO se cliva autocatalíticamente a VP2 y VP4, produciendo un virión maduro.

La traducción de las proteínas virales debe preceder a la replicación del genoma del VFA, al ser proteínas necesarias para la síntesis de nuevo ARN viral en las células infectadas. Entonces, existe un compromiso entre el uso del ARN viral para la traducción y la necesidad de utilizarlo como templado para la síntesis. Se ha demostrado que el paso de los ribosomas por el genoma previene la replicación, y en consecuencia la traducción debe ser frenada en el ARN infectante para que ocurra la replicación y lograr progenie viral (Gamarnik y Andino, 1998). Existen dos procesos necesarios para la replicación del VFA; inicialmente el ARN genómico con polaridad positiva, sirve de templado para la síntesis de un ARN antisentido o polaridad negativa (scARN(-)), que será utilizado posteriormente como templado para la síntesis de nuevo ARN genómico

(scARN(+)). En las células infectadas se acumula un exceso de scARN(+) sobre scARN(-). La causa de este exceso es el reconocimiento diferencial de la NSP 3D, polimerasa de ARN dependiente de ARN, sobre el templado negativo; esto genera templado para rondas de traducción subsiguientes como también genoma para ser empaquetado en las cápsides virales (Figura 1.5). Se ha descrito que el precursor 3CD, acumulado durante las primeras rondas de traducción del ARN infectante, no tiene propiedades de polimerasa aun, pero si posee actividad proteasa y de unión al ARN. Este precursor se une a la región *cre* del 5'UTR, siendo necesaria para la uridilación de la proteína VPg. La estructura estable en forma de "stem-loop", *cre*, de los picornavirus contiene un motivo AAACA que actúa como señal para la uridilación de VPg (3B) para la polimerasa viral, produciendo VPg_pU y/o VPg_pUpU (Gerber et al., 2001; Paul et al., 2000). Este producto actúa como cebador de la iniciación de la síntesis de ARN, explicando la presencia de VPg en los extremos 5' de los transcritos de ARN tanto positivos como negativos. A su vez el precursor 3CD incrementa la afinidad del IRES por PCBP2, una proteína celular esencial en el comienzo de la replicación (Gamarnik y 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 "complejo de replicación" (Banerjee et al., 2001; Echeverri y Dasgupta, 1995; Harris et al., 1994; Parsley et al., 1997; Paul et al., 1994; Xiang et al., 1995). La función de este complejo de replicación sería la de localizar en una misma estructura celular a todos los componentes necesarios para la replicación del ARN viral, incrementando de esa manera, la concentración local de proteínas virales no estructurales (Bienz et al., 1992).

Los pasos finales del ciclo viral son el empaquetamiento de moléculas de ARN genómico en la cápside viral y la maduración del precursor VP0 a VP4 y VP2. Se debe aclarar que los mecanismos de empaquetamiento y de maduración no están totalmente

resueltos y son probablemente los menos estudiados de todos los pasos en el ciclo de replicación del VFA. Se han realizado más estudios en otros picornavirus, como es el caso de enterovirus y se suele suponer análogas para el VFA.

Actualmente existen dos modelos que explican el ensamblado de los nuevos viriones de picornavirus. Uno de ellos propone que las proteínas estructurales en forma de pentámeros se agruparían formando cápsides vacías dónde luego ingresaría el ARN; el otro propone que los pentámeros interaccionarían con el ARN para formar el provirión (cápside con VP0 sin clivar). Aunque en algunos picornavirus esto ocurre naturalmente, no se ha demostrado que los proviriones se produzcan en las células infectadas con VFA (Grubman y Baxt, 2004). Por el contrario, estudios con marcas radioactivas han demostrado que se pueden seguir a las proteínas estructurales formando los protómeros, pentámeros, cápsides vacías y virión maduro (Yafal y Palma, 1979). Ambos modelos proponen la necesidad de la miristilación del extremo N-terminal de VP0 (Ansardi et al., 1992; Marc et al., 1991; Moscufo et al., 1991) para la formación de la cápside madura. El paso final para el ensamblado y generación de virus infeccioso es la maduración de VP0 a los productos finales VP2 y VP4 (miristilado), la cual requiere de la presencia del ARN viral. 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), aunque se unen al receptor y muestran sensibilidad al pH.

Se ha descrito que los picornavirus solo empaquetan en su cápside moléculas de scARN(+) unidas a la proteína VPg, excluyendo todas los demás ARN tanto virales como celulares (Nomoto et al., 1977; Novak y Kirkegaard, 1991). Asimismo, solo el scARN(+) recién sintetizado es empaquetado, indicando una asociación activa entre la replicación del ARN y el empaquetamiento de este dentro de la cápside viral. Posiblemente existan

señales de empaquetamiento en *cis* presentes en la molécula sintetizada de ARN que facilitan dicho proceso.

El tiempo requerido para un ciclo simple de replicación viral puede durar de 5 a 10 horas dependiendo de muchas variables, entre ellas, la cepa viral, la temperatura, el pH, la célula huésped y la multiplicidad de infección. Las partículas de virus maduras a menudo forman cristales en las células infectadas y posteriormente son liberadas por desintegración de la célula huésped. La mayoría de los picornavirus son virus citopáticos, es decir que son liberados cuando la célula pierde su integridad y se rompe (Racaniello, 2001).

1.3. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A VFA

Todos los virus son patógenos intracelulares obligados que dependen para su supervivencia de hospedadores susceptibles donde replicar. Las infecciones virales pueden ser clasificadas en dos grandes grupos de acuerdo a las características citopatogénicas de los virus involucrados: infecciones citopáticas y no citopáticas. El VFA, pertenece al primer grupo. La estrategia de supervivencia de los virus citopático es infectar al huésped, replicar rápidamente causando gran daño celular, lo que induce una rápida respuesta de anticuerpos neutralizantes. Por lo tanto, el virus debe transmitirse a un nuevo hospedador susceptible antes de ser neutralizado y controlado por el sistema inmunitario (Hilleman, 2004). Por este motivo, los virus citopáticos son alta y rápidamente contagiosos. Sin embargo, esta estrategia viral presenta el inconveniente de que, con cada transmisión, el número de hospedadores susceptibles no inmunes en una población disminuye. Consecuentemente, la posibilidad de replicación viral en la población se reduce rápidamente. Por lo tanto, la mayoría de los virus citopáticos escapan a este estado de inmunidad poblacional mediante mutaciones que generan variantes virales, que si bien presentan reacción cruzada con la variante

viral original en varios epitopes reconocidos por anticuerpos (Acs), no reaccionan de manera cruzada en aquellos epitopes involucrados en la neutralización o protección. Como resultado, individuos recuperados de la infección que presentan inmunidad contra un serotipo viral, no poseerán inmunidad protectora contra virus pertenecientes a distintos serotipos, y por lo tanto, serán susceptibles a la infección con estos últimos.

Como consecuencia de la replicación viral, la respuesta inmunitaria (incluyendo respuesta humoral y celular) es estimulada específicamente e inducirá una eficiente protección frente a reinfecciones con virus homólogo o relacionado antigénicamente (Collen, 1994; McCullough et al., 1992b).

1.3.1. Generalidades de la respuesta inmunitaria

El sistema inmunitario es un sistema de defensa natural que posee el cuerpo contra las infecciones de patógenos. A través de una reacción bien organizada, el cuerpo ataca y destruye los organismos infecciosos que lo invaden. Para realizar este cometido, el sistema inmunitario posee la capacidad de reconocer y discriminar las estructuras propias de las ajenas, caracterizándose por su especificidad y memoria.

La respuesta inmunitaria se desarrolla en tres pasos: i) el reconocimiento de manera inespecífica y específica del agente extraño por parte de los fagocitos, linfocitos T y B y otros tipos celulares; ii) la activación y regulación de los diferentes elementos del sistema inmunitario a través su interacción y iii) desarrollo de mecanismos efectores del tipo e intensidad adecuada para la eliminación o inactivación del agente extraño. Dentro del proceso de reacción frente a patógenos, la respuesta inmunitaria por parte del hospedador se puede clasificar en respuesta innata (natural o inespecífica) y adquirida (adaptativa o específica).

La respuesta innata actúa desde el inicio del proceso infeccioso. Está constituida por barreras físicas como la piel y epitelios, que a su vez produce sustancias químicas

con actividad microbiostáticas y microbicidas, y mediadores capaces de inducir y orientar a la respuesta inflamatoria local. Además, posee un componente celular que reúne a monocitos/macrófagos, mastocitos, polimorfonucleares, células NK, células NKT y células dendríticas tanto mieloides como plamocitoides. La inmunidad innata celular reconoce a los patógenos a través de los *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMPS) mediante *receptores de reconocimiento de patrones* (RRP). Por el contrario, la respuesta adaptativa se caracteriza por reconocer determinantes antigénicos, epitopes, específicos mediante determinados receptores distribuidos clonalmente en las células T y B. Esta inmunidad adaptativa tiene la capacidad de generar memoria inmunitaria, permitiendo una activación más rápida y potente en una segunda exposición con el patógeno detectado (respuesta anamnésica).

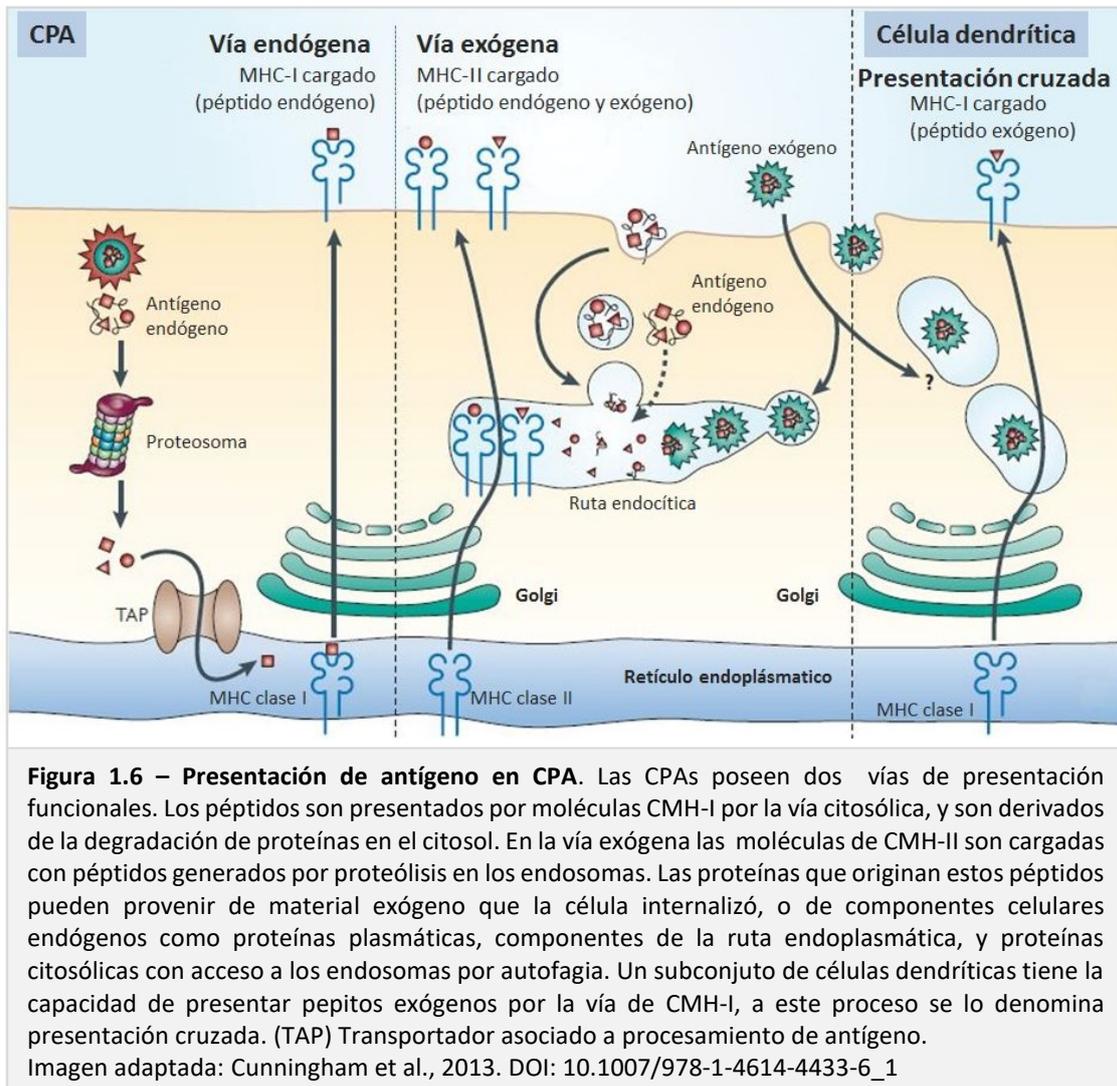
Al igual que la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa posee un componente humoral basado en la producción de anticuerpos, y un componente celular basado en mecanismos de citotoxicidad. La respuesta humoral está mediada fundamentalmente por los linfocitos B, los cuales mediante receptores específicos de antígeno (BCR, inmunoglobulinas de membrana), son capaces de reconocer los antígenos foráneos en su conformación nativa. Este reconocimiento, junto con la cooperación de las células T estimuladas específicamente, activa a los linfocitos B que proliferan específicamente y maduran a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (Ig) solubles o Acs (Igs con la misma especificidad que los BCR). El isotipo de los Acs producidos será diferente según el tipo de activación celular T que se produzca y por lo tanto según el entorno de citoquina (Abbas y Lichtman, 2004). Además, tras la proliferación, una parte de los linfocitos B permanecen como células de memoria que expresan en su superficie el receptor específico (BCR de isotipo específico) y que presentan una mayor afinidad por el antígeno. Estas células de memoria, tras una segunda activación, se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Puntualmente, los bovinos expresan isotipos IgM, IgG, IgA e IgE. Poseen 3 subclases de IgG: IgG1, IgG2 e IgG3 (anteriormente clasificada como IgG2b). Los niveles normales de IgG1 e IgG2 en suero son equivalentes (11,2 mg/ml y 9.2 mg/ml, respectivamente), mientras que los valores normal para IgG3 no son conocidos al no contar con un anticuerpos contra dicho isotipo para poder cuantificarlo (Butler, 1998). Sin embargo, datos cualitativos sugieren que IgG3 es un componente menor en el suero (Butler et al., 1987). Asimismo, los isotipos IgM e IgA (dimérica) se encuentran en una baja proporción de las Igs séricas (3mg/ml y 0.37 mg/ml respectivamente) mientras que el isotipo IgE es indetectable. En cuanto a la inmunidad de mucosas, se determinó a la IgA como la Ig principal sintetizada por los tejidos de la mucosa en bovinos y se encuentra en secreciones exocrinas, exceptuando el calostro y la leche (Mach y Pahud, 1971). Sin embargo, las secreciones de la glándula mamaria de los bovinos presentan una particular predominancia de IgG1 sobre IgA. Esto sugiere la existencia de un mecanismo de transporte adicional de IgG1 en el sistema de mucosas en estos rumiantes. Al no producirse el pasaje transplacentario de anticuerpos maternos al feto, la transferencia pasiva de los anticuerpos (inmunidad pasiva) a los terneros recién nacidos es asegurada por la alta concentración de anticuerpos, particularmente IgG1, en el calostro y la eficiente captación de las proteínas intactas por los neonatos (Pastoret, 1998). De este modo, la IgG1 constituye un isotipo importante en las secreciones de la especie bovina; ya que no solo predomina en las secreciones de la glándula mamaria, sino que también está presente en secreciones nasales, fluidos broncoalveolares, fluidos intestinales y en la bilis (Butler, 1998).

La respuesta celular esta mediada por los células T, que a diferencia de los B, sólo reconocen al antígeno una vez procesado y asociado a moléculas propias del *complejo mayor de histocompatibilidad* (CMH) (Abbas y Lichtman, 2004). Este requerimiento origina lo que se conoce como restricción por CMH, dado que dentro de una población polimórfica respecto al CMH, diferentes individuos podrán reconocer regiones distintas

de una proteína y ser cargadas en el CMH para el posterior reconocimiento por parte de las células T. Esta restricción CMH es especialmente relevante en el diseño de vacunas donde no se utiliza el patógeno entero (Butcher, 1994); es decir, estas vacunas tal vez no posean secuencias de aminoácidos, que si estén presentes en el patógeno entero, capaces de ser cargadas en el CMH. Estas moléculas de membrana y altamente polimórficas, se unen selectivamente con distinta afinidad a los péptidos procesados, y son responsables de las diferencias individuales que encontramos en una población en términos de susceptibilidad y respuesta a una enfermedad. Existen dos clases distintas de moléculas de CMH, las de clase I se expresan en todas las células nucleadas, y las de clase II están presentes únicamente en las *células presentadoras de antígenos* (CPA). Las CPA están compuestas por células dendríticas, monocitos, macrófagos, linfocitos B y células T activadas (Holling et al., 2004). La vía de entrada de los antígenos en las CPA es la que determina el destino final de los péptidos procesados en los CMH (Figura 1.6).

La función del CMH de clase I, es presentar fragmentos de proteínas producidas en el interior de las células a los linfocitos T. Las células sanas son ignoradas, pero las células que presentan fragmentos de proteínas extrañas para el organismo (infección por patógenos citosólicos) son reconocidas y atacadas por el sistema inmunitario. Debido a que los CMH-I presentan péptidos derivados de proteínas citosólicas, la vía de presentación se denomina endógena o citosólica. En la presentación de antígeno por clase II, las CPA utilizan la vía exógena o endocítica. Por esta vía las proteínas exógenas son internalizadas (fagocitosis, macropinocitosis, etc), procesadas y expuestas en los CMH-II. Las proteasas catepsina D y catepsina B son las más importantes en el procesamiento de las proteínas por su predominancia en las vesículas endosomales y lisosomales (van Lierop et al., 1994). Las células dendríticas tienen la propiedad particular de presentar, péptidos adquiridos por la vía exógena en CMH-I, a lo que se denomina presentación cruzada (Figura 1.6).



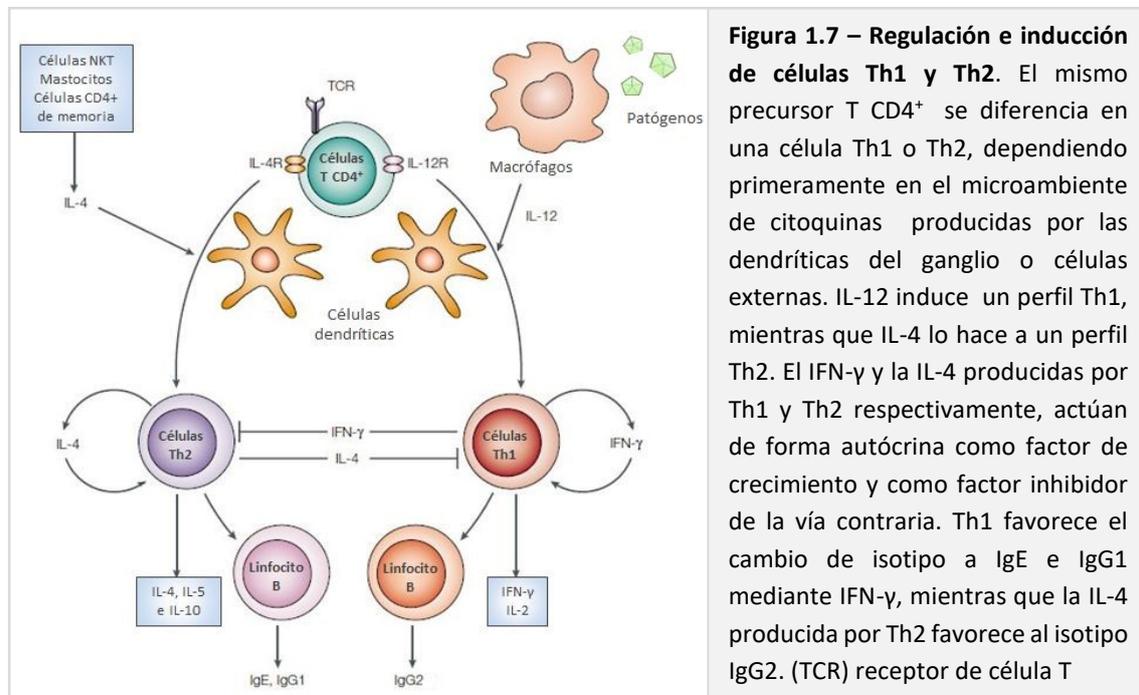
El receptor específico de los linfocitos T (TCR) está formado por un heterodímero constituido por dos cadenas similares a las inmunoglobulinas, en combinaciones $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ unidas por enlaces disulfuro. Este heterodímero está asociado sobre la membrana con un grupo de moléculas sin variabilidad morfológica denominado CD3. A su vez, las células T de sangre periférica expresan y exponen en su membrana dos tipos de correceptores: CD4 o CD8. Las células T $CD8^+$ reconocen, a través de su TCR, el antígeno expresado en células infectadas, asociado al CMH-I. En general las T $CD8^+$ presentan una función citotóxica; tras activarse, lisan la célula infectada. Las células T $CD4^+$ reconocen los epitopes T asociados a las moléculas del CMH-II y se asocian fundamentalmente a funciones cooperadoras realizadas mediante la liberación de

mediadores solubles (citoquinas), capaces de estimular la función citotóxica de los linfocitos CD8⁺ o potencian la respuesta de los linfocitos B (Noelle y Snow, 1990).

Para conseguir una estimulación de las células T que conduzca a una activación efectiva, son necesarias dos señales independientes. La primera se produce por la interacción del TCR de las células con el CMH cargado con antígeno, y la segunda señal producida por diversas moléculas co-estimuladoras presentes en las CPA. La ausencia de esta segunda señal conduce a la anergia de los linfocitos T, es decir no se produce la respuesta.

Las células T CD4⁺ constituyen una población heterogénea. De acuerdo con su perfil funcional, determinado fundamentalmente por el particular patrón de citoquinas que producen, se distinguen en Th1 o Th2. Se diferencian en uno u otro sentido según el microambiente de citoquinas presentes en el órgano linfático secundario, donde las células dendríticas activan a las células T vírgenes o naïve. Dentro del proceso de la respuesta inmunitaria específica, las células del sistema inmunitario producen diversos mediadores solubles denominados citoquinas, que regulan la respuesta inmunitaria, controlando los procesos de activación, crecimiento y diferenciación celular. La presencia de interleuquina 12 (IL-12) y citoquinas relacionadas promueven la diferenciación de las células T CD4⁺ en un perfil Th1, mientras que la presencia de IL-4 conduce la diferenciación hacia un perfil Th2 (Mena et al., 2002; Shah et al., 2012). Los linfocitos Th1 produce mayoritariamente IL-2, *interferon-γ* (IFN- γ) y *factor de necrosis tumoral-β* (TNF- β), citoquinas que promueven principalmente una respuesta de tipo celular, activando linfocitos CD8⁺ y macrófagos. La subpoblación Th2 es productora de IL-4, IL-5 e IL-10 favoreciendo el desarrollo de la respuesta humoral (Abbas y Lichtman, 2004; Mosmann y Coffman, 1989). En este proceso de polarización Th1 / Th2, un tipo de respuesta suele inhibir al otro, mediante las citoquinas específicas (Figura 1.7). Estudios *in vitro* utilizando linfocitos B bovinos demostraron que la el perfil de isotipo de

los anticuerpos producidos puede estar polarizado bajo ciertas condiciones; la expresión del isotipo IgG1 está regulado positivamente por IL-4 y el isotipo IgG2 por IFN- γ (Estes y Brown, 2002).



El IFN- γ es una citoquina que cumple un papel importante en la respuesta antiviral. Entre sus múltiples efectos biológicos, el IFN- γ es el principal activador de macrófagos, potenciando su actividad antimicrobiana y su capacidad para procesar y presentar antígenos a las células T. Además, tiene la capacidad de modular el cambio de isotipo de las Ig en los linfocitos B (Rodríguez-Carreno et al., 2002), isotipo que a su vez activa al complemento y promueve la opsonofagocitosis (fagocitosis del patógeno facilitada por una opsonina, como puede ser un anticuerpo o C3b, una proteína del complemento entre otras). Esta citoquina es producida fundamentalmente por las células T y células NK. La producción de IFN- γ se ha detectado en la respuesta inmunitaria frente a distintos virus, entre ellos VFA, donde se ha identificado su papel esencial en el control de la replicación de virus en los hospedadores (Zhang et al., 2002).

1.3.2. Respuesta inmunitaria humoral frente a VFA

La inmunidad mediada por anticuerpos se identificó hace más de un siglo como el principal mecanismo de protección frente a la infección de VFA. Así, se observó que la transferencia pasiva de suero de animales convalecientes que habían padecido la enfermedad, era capaz de proteger a animales expuestos al virus (Collen, 1994). Los animales infectados con el VFA desarrollan un estado inmunológico, caracterizado por altos niveles séricos de Acs específicos con actividad neutralizante, los cuáles persisten hasta 18 meses post infección (Wigdorovitz y Sadir, 1996). La protección frente a la infección por el VFA ha sido siempre relacionada con la presencia de estos Acs neutralizantes específicos en suero (Hingley y Pay, 1987; Pay y Hingley, 1992; Van Maanen y Terpstra, 1989). Sin embargo, es posible encontrar animales protegidos con niveles subneutralizantes de anticuerpos (Liebermann et al., 1993) lo que sugiere que la protección estaría mediada, además, por otros componentes de la inmunidad por lo menos en estos animales.

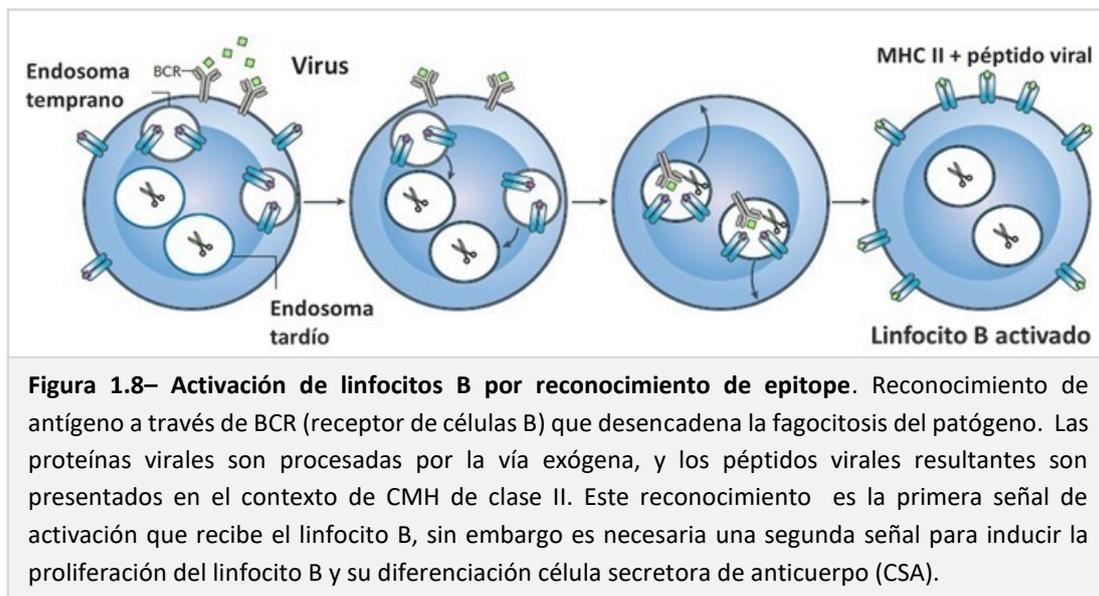
Los primeros anticuerpos neutralizantes que aparecen son las IgMs (inmunoglobulina séricas de isotipo M); lo hacen entre los 3 a 5 días luego de la infección o vacunación de los hospedadores naturales. En los bovinos, el pico de la respuesta se produce alrededor de los 5 a 10 días post-infección y va disminuyendo. Luego, al madurar la respuesta ocurre el cambio de clase predominando la respuesta a IgG1, pero siendo detectable igualmente IgG2 e IgA. Las IgGs (inmunoglobulinas séricas de isotipo G1 y G2) aparecen a partir del día 4 en adelante, alcanzando el pico de concentración entre los 10 y 15 días (Abu Elzein y Crowther, 1981; Cowan, 1973). El desarrollo de esta respuesta coincide con la resolución de las lesiones, fin de la viremia y reducción de la excreción viral.

La respuesta inmunitaria humoral inducida en mucosas también ha sido objeto de estudio, dada la importancia de la ruta oro-faríngea como principal vía de entrada para

el VFA (Alexandersen y Donaldson, 2002; Burrows et al., 1981; Francis et al., 1983). En la primera etapa de la infección, y coincidiendo con la aparición de lesiones, se puede detectar anticuerpos con actividad neutralizante en las secreciones del tracto respiratorio superior. Se cree que los anticuerpos detectados en estas secreciones, con actividad neutralizantes, provienen del suero y consisten mayormente en IgM con solo una pequeña contribución de IgA (Francis et al., 1983). Un pico de sIgA (IgA secretoria) surge alrededor de los 35 días post-infección y es casi exclusivamente sintetizada de manera local (Matsumoto et al., 1978). La detección de IgAs en mucosas, a partir de fluidos oro-faríngeos de bovinos infectados con VFA, se ha considerado como un posible indicador de persistencia viral (Parida et al., 2006). Así, su detección en mucosas se ha empleado como una herramienta útil para la identificación de bovinos infectados persistentemente con VFA o asintomáticos. El isotipos IgG1 e IgG2 bovino también son detectados en los fluidos de secreción con títulos similares a los títulos séricos, lo que sugiere que es en gran parte proveniente del suero (Salt et al., 1996).

Como se mencionó anteriormente, los anticuerpos neutralizantes dirigidos a los principales sitios antigénicos de la cápside viral pueden perdurar hasta varios años, cuatro años y medio en el caso de los bovinos. Sin embargo, las concentraciones encontradas a lo largo de ese tiempo son menores a la detectada en el pico concentración. Asimismo, las IgMs no suelen perdurar tanto tiempo, en el caso de los bovinos aproximadamente a los 50 días dejan de detectarse (Salt et al., 1996), mientras que en los cerdos se ha encontrado que persisten hasta seis meses post-infección. En este hospedador, las IgGs comienzan a aparecer entre los 4 a 7 días detectando el pico de concentración a las dos semanas post-infección (Cowan, 1973).

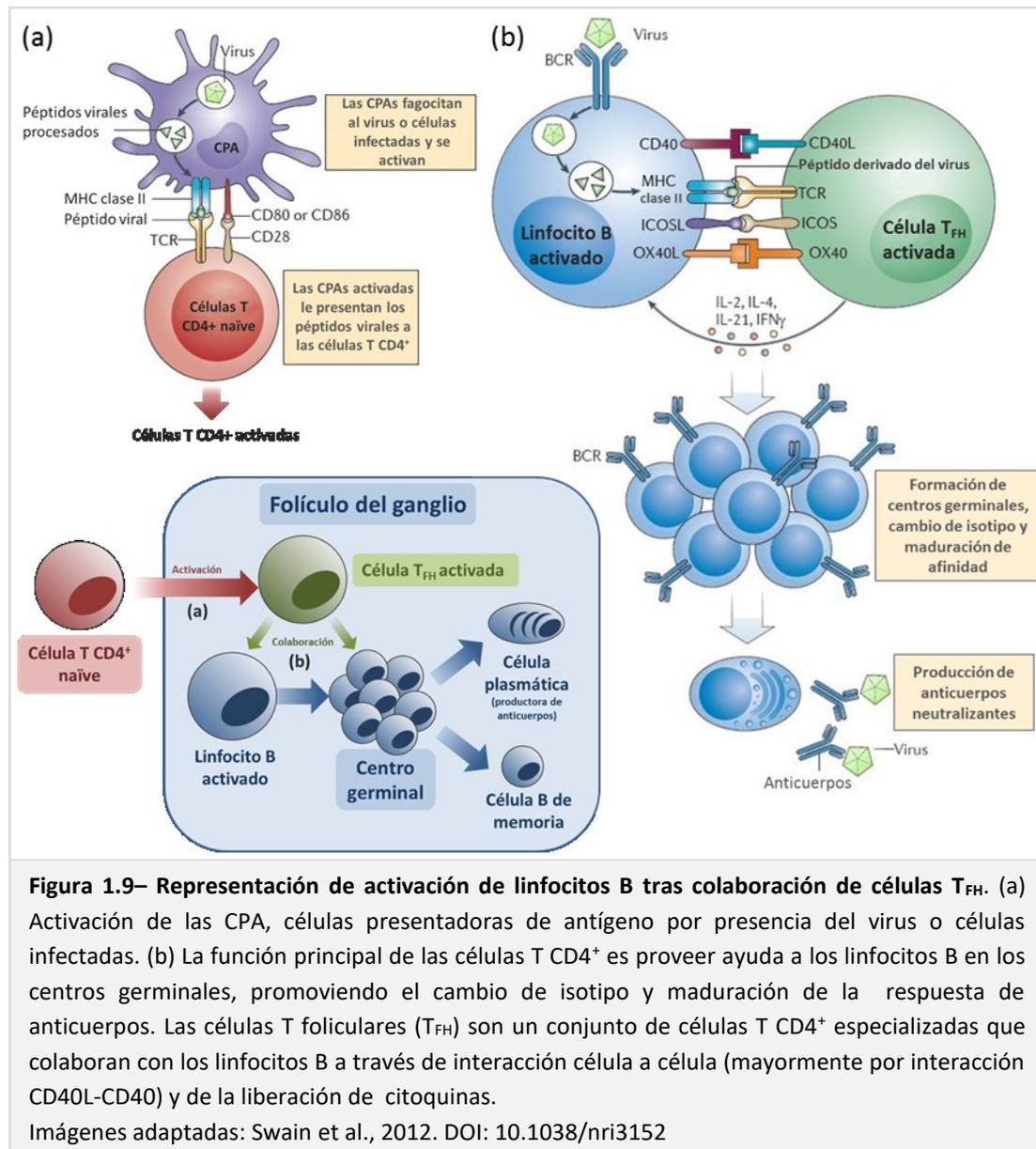
La inducción de una respuesta inmunitaria humoral específica implica el reconocimiento de epítopes virales presentes en la partícula viral por parte de los linfocitos B para producir anticuerpos específicos. Conjuntamente, es esencial el reconocimiento de epítopes T tras el procesamiento antigénico y presentación en el contexto del CMH-II (Figura 1.8). En este sentido, es crucial entender el mecanismo por el cual las células T $CD4^+$ colaboran con los linfocitos B durante una infección viral, con el objetivo de definir los requerimientos de la vacuna. Por ello, la identificación y caracterización de epítopes T en la secuencia de VFA (Bittle et al., 1982; Blanco et al., 2001; Blanco et al., 2000; Collen, 1994; Van Lierop et al., 1995a) ha sido muy importante para entender la respuesta inmunitaria celular mediada por linfocitos T $CD4^+$ y su vía de presentación antigénica (Collen et al., 1991; Garcia-Briones et al., 2000; Glass et al., 1991; van Lierop et al., 1995b).



El paso más importante para generar una respuesta antiviral por parte de las células T, es que las CPA capturen el antígeno viral en los tejidos infectados, se activen por la unión de los PAMPs del virus a sus RRP, y que migren a los ganglios linfáticos que drenan dicho sitio de infección. La naturaleza de la infección viral, como también la unión al RRP, pueden influir en el estado de activación de las CPA cargadas con los

péptidos virales y el ambiente para la polarización de la respuesta de las células colaboradoras CD4⁺. Las señales producidas por el RRP en las CPAs aumentan la expresión de las moléculas de CMH-II, moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, y de las citoquinas proinflamatorias tales como IFNs de tipo I, TNF, IL-1, IL-6 e IL-12.

Cuando las CPAs migran a los ganglios linfáticos drenantes priman a las células T CD4⁺ naïve que se diferencian en efectores antivirales (Figura 1.9a). Estas células T CD4⁺ activadas entran al folículo de linfocitos B en el ganglio linfático y le proveen ayuda, resultando en la formación de un centro germinal (Figura 1.9b). Estas células T CD4⁺ pasan a llamarse células T foliculares (T_{FH}, follicular helper T). Luego de la infección viral, las células T_{FH} comienzan a expresar SAP, *un proteína de asociación a SLAM* ("SLAM-associated protein") (Crotty et al., 2003; McCausland et al., 2007). SLAM, *molécula de señalización de activación linfocítica*, es un receptor de membrana expresado en todas las células del sistema inmunitario y posee una participación importante en las respuestas, pudiendo promover o inhibir las funciones de los receptores primarios de activación. La expresión de SAP en las células T_{FH} es necesaria para la formación de los centros germinales donde se promueve la generación de las células B de memoria y las células plasmáticas productoras de anticuerpos de larga vida media (Crotty et al., 2003; Kamperschroer et al., 2006). Por esto último, las células T_{FH} son importantes para generar una inmunidad protectora para la mayoría de los virus; en efecto, se ha comprobado que las células T CD4⁺ son un requerimiento necesario para la respuesta humoral óptima luego de la infección con coronavirus (Chen et al., 2010), virus de la viruela (Sette et al., 2008), virus de la fiebre amarilla (Liu y Chambers, 2001) o virus de la estomatitis vesicular (Thomsen et al., 1997).



Varios ligandos co-estimuladores son expresados por las células T CD4⁺ y contribuyen a promover la activación de los linfocitos B. Un importante ligando es el CD40L, que es expresado por las células T CD4⁺ activadas. El CD40L, como su nombre lo indica, interactúa con el CD40 presente de manera ubicua en los linfocitos B. Esta interacción es crucial para generar las respuestas humorales óptimas contra diversos patógenos virales. También se ha reportado que la expresión del *co-estimulador inducible de células T* (ICOS) por las células T_{FH} es importante para la formación de los centros germinales (Crotty, 2011) e inducción de respuesta humoral para algunos virus (Bertram et al., 2002). El papel que tienen otras moléculas co-estimuladoras expresadas

en las células T_{FH} aún no están totalmente esclarecidas. Por lo tanto, son necesarios más estudios que apunten a determinar la importancia de las señales adicionales que se generan entre las células T_{FH} y los linfocitos B, que promuevan la respuesta protectora de anticuerpos durante una infección viral.

Una vez en el centro germinal, los genes que codifican las cadenas pesadas y livianas de la Ig de los linfocitos B proliferantes (centroblastos) sufren una serie de mutaciones que darán como resultado la producción de anticuerpos de mayor afinidad por el antígeno (hipermutación somática) y de isotipo diferente a la IgM (cambio de isotipo). La hipermutación somática es un mecanismo por el cual la porción variable de las cadenas pesadas y livianas de las Igs sufren mutaciones puntuales con una tasa muy elevada. Cuando los centroblastos dejan de proliferar se transforman en centrocitos. Estos centrocitos expresan en su membrana las Igs mutadas. Esto significa que expresan inmonoglobulinas distintas de las del linfocito B que reaccionó por primera vez con el antígeno. Las mutaciones que son perjudiciales para la célula o que disminuyen la capacidad de reconocimiento del epítopo antigénico, conducen a la apoptosis celular. Luego, un proceso selectivo, dirigido por el antígeno, va enriqueciendo las poblaciones de linfocitos B con Igs de mayor afinidad; fenómeno que se conoce como maduración de la afinidad de las Igs.

Durante la infección, no solo se generan anticuerpos contra las variantes antigénicas de la cápside viral, sino que también se comienza a montar una respuesta humoral frente a las proteínas no estructurales del virus. Estos anticuerpos dirigidos a *antígenos asociados a la infección viral* (VIAA) como la ARN polimerasa (3D) y la proteasa (3C) son utilizados como evidencia de infección en muchas especies, siendo objetivo de detección en los llamados *ensayos de diferenciación entre animales infectados de vacunados* (DIVA, Differentiation of infected from vaccinated animals). 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 estadio de infección (agudo, convaleciente, portador o infectado).

Como se mencionó anteriormente, hay evidencia de animales con títulos de anticuerpos significativos que pueden no estar protegidos, mientras otros con títulos de anticuerpos neutralizantes bajos o nulos, pueden llegar a estarlo (McCullough et al., 1992a). Esta falta de correlación ocasional ha sugerido la existencia de otros mecanismos del sistema inmunitario que expliquen la protección del animal en ausencia de anticuerpos neutralizantes detectables, como la estimulación de una respuesta inmunitaria celular (Becker, 1994; Oh et al., 2012). Estos trabajos han sugerido que la inducción de anticuerpos mediada por células T CD4⁺, asociada a presentación vía CMH clase II, no debe ser el único mecanismo implicado en la respuesta inmunitaria protectora frente a la enfermedad, sino que la respuesta inmunitaria celular, mediada por linfocitos T CD8⁺, restringida a moléculas CMH de clase I (Childerstone et al., 1999; Guzman et al., 2008), ha de tener un papel fundamental en la respuesta protectora (Collen, 1994). También se ha sugerido que los Acs opsonizantes podrían tener un papel importante en la protección frente a la infección viral (Quattrocchi et al., 2011; Quattrocchi et al., 2014). Estos Ac opsonizantes, junto con los macrófagos, son esenciales para lograr la eliminación del virus en el animal infectado, por remoción de los complejos Ac-virus y destrucción del patógeno una vez fagocitado.

1.3.3. Respuesta inmunitaria celular frente a VFA

El papel de la inmunidad celular en la protección contra el VFA en los hospedadores naturales es un asunto de controversia y escasamente estudiado. Se han reportado respuestas antivirales mediadas por células T, luego de la infección o vacunación en porcinos y bovinos (Blanco et al., 2001; Childerstone et al., 1999; Glass et al., 1991) y

se ha sugerido que esta inmunidad mediada por células está involucrada en la eliminación viral de animales infectados persistentemente (Oh et al., 2012; Zhang et al., 2002).

La identificación y caracterización de los epitopes T son importantes para entender, no solo la inmunidad humoral mediada por las células T CD4⁺, sino también la inmunidad celular mediada por las células T CD8⁺ (células T citotóxicas). Como se señaló anteriormente estos epitopes T exógenos son cargados en el contexto de los CMH de clase II y reconocido por células T CD4⁺ o también, en el caso particular de las dendríticas, en CMH de clase I y son reconocidos por de células T CD8⁺. Existen muchas publicaciones demostrando que la respuesta de las células CD4⁺ tienen un papel importante en la protección frente al VFA; sin embargo, es poco lo que se ha estudiado sobre la respuesta anti-VFA restringida a CMH-I, a pesar de haberse reportado una inmunidad celular frente a este virus. Por lo tanto, la significancia de la inmunidad celular en términos de protección frente al VFA permanece incierta.

La respuesta específica mediada por células T citotóxicas es mayor en animales infectados que en vacunados (Garcia-Valcarcel et al., 1996). Childerston y colaboradores, han observado actividad T-CD8⁺ anti-VFA recién a las 5 semanas post-infección (Childerstone et al., 1999). Este grupo ha propuesto que los linfocitos T CD8⁺ participan en el estadio 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 protectora sería mediada por anticuerpos, con un rol preponderante de la actividad neutralizante. Sin embargo, en la etapa tardía, la presencia de células T CD8⁺ podría tener un rol más importante.

Al igual que en el caso de la colaboración con los linfocito B, las células T CD4⁺ promueven la activación de las células T CD8⁺ a células efectoras (citotóxicas) o de memoria; aunque los mecanismos de acción están menos estudiados para esta última

colaboración. Sin embargo, la interacción entre CD40L-CD40 entre las células CD4⁺ y las CPA sigue siendo de gran importancia. Esta interacción y posterior activación de las CPA, las convierte en células competentes para estimular a los CD8⁺ naïve; a esto se lo ha denominado licenciamiento de las CPA (Bennett et al., 1998; Bennett et al., 1997). Sin embargo, este mecanismo podría ser solo de menor importancia en el caso de los virus, ya que las CPA pueden ser efectivamente activadas por la señalización gatillada por los RRP al detectar los PAMPs de estos patógenos (Johnson et al., 2009; Lee et al., 2003). No obstante, no está claro del todo si las CPA directamente activadas por RRP son funcionalmente equivalentes de aquellas que se activaron tras la interacción con las CD4⁺ (Hamilton-Williams et al., 2005) (Figura 1.10). Se ha demostrado que para algunos virus la ausencia de células T CD4⁺ compromete la generación de una respuesta primaria citotóxica (Belz et al., 2002; Novy et al., 2007; Riberdy et al., 2000; Smith et al., 2004).

Durante la respuesta primaria, el licenciamiento de las CPA por parte de las CD4⁺ probablemente ocurre posterior a la polarización de los distintos perfiles de las Th. No está definido si los distintos subconjuntos de Th poseen roles diferentes en colaborar con las células T CD8⁺. No obstante, las Th totalmente polarizadas podrían promover una respuesta eficiente por parte de las células citotóxicas frente a la infección viral a través de mecanismos distintos al licenciamiento de las CPA. Por ejemplo, luego de la interacción antígeno específica entre la CPA y las células CD4⁺ (CMH-II – TCR) las quimiocinas producidas atraen activamente a las células CD8⁺ a las CPA, y la interacción entre las CD4⁺ y las células CPA protegen a estas últimas de la lisis mediada por las células citotóxicas (Mueller et al., 2006) llevando, posiblemente, a una más eficiente activación de las células CD8⁺.

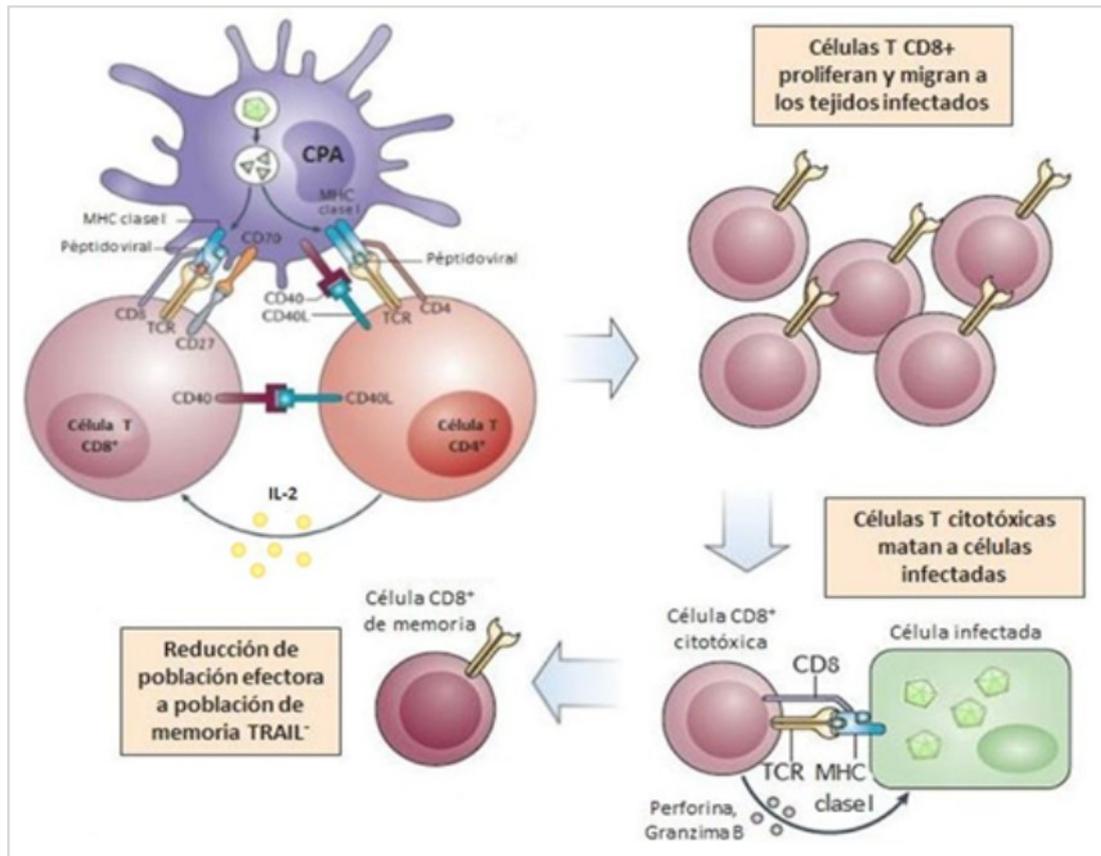


Figura 1.10 – Colaboración de células T CD4 a células T CD8. La vía mejor caracterizada en la generación de células CD8 efectoras es la secreción paracrina de IL-2 y la activación de las CPA mediado por la interacción de CD40L-CD40, conocido como licenciamiento de las CPA. Este licenciamiento podría no ser un requerimiento imprescindible, ya que el VFA posee PAMPs que podrían activar o licenciar a las CPA de manera CD4⁺ independiente vía RRP. La colaboración CD4 si tiene un papel importante en la generación de memoria funcional CD8, disminuyendo la expresión de TRAIL en las células CD8⁺ y facilitando la respuesta citotóxica durante infecciones siguientes. (CPA) Célula presentadora de antígeno; (ICOS) co-estimulador inducible de células T; (ICOSL) ligando de ICOS; (TCR) receptor de células T. Imágenes adaptadas: Swain et al., 2012. DOI: 10.1038/nri3152

Sumado a lo antes dichos, las células CD4⁺ facilitan el desarrollo funcional, patógeno específico, de la memoria de las células CD8⁺, que proporciona una respuesta a infecciones posteriores (Janssen et al., 2003; Northrop et al., 2006; Shedlock y Shen, 2003; Sun y Bevan, 2003). Un mecanismo por el cual las células T CD4⁺ promueven este desarrollo involucra la disminución en la expresión (regulación negativa) del *ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF* (TRAIL) en las células CD8⁺ activadas a través de la secreción de IL-21 entre otras, disminuyendo o aplazando la susceptibilidad a la “muerte por activación” mediada por TRAIL (Janssen et al., 2005). Se observó que la secreción de IL-21 por las células colaboradoras es crucial para esta regulación negativa

(Barker et al., 2010). Por el contrario, las células CD8⁺ que no recibieron colaboración de CD4⁺ sufren apoptosis mediada por TRAIL luego de la re-exposición al antígeno.

Conjuntamente existen otras vías por las cuales las células CD4⁺ promueven la generación de células CD8⁺ efectoras y de memoria. La producción parácrina de IL-2 por las células CD4⁺ durante el inicio de la activación de las células CD8⁺ y el aumento de expresión de CD25 (receptor de IL-2) en estas células efectoras (Obar et al., 2010), mejora drásticamente la potencia de la respuesta citotóxica de memoria subsecuente (Williams et al., 2006). A su vez, las células CD4⁺ mejoran la producción de citoquinas por parte de las CPA que aumentan las respuestas iniciales de las células CD8⁺, estas citoquinas incluyen a IL-1, IL-6, TNF e IL-15. Finalmente, la interacción directa de la molécula CD40 en las membranas de las células CD8⁺ naïve y el CD40L de las células CD4⁺ pueden aumentar la generación de las células CD8⁺ de memoria.

1.3.4. Respuesta inmunitaria innata frente al VFA

En contraste con la respuesta adaptativa, es poco lo que se ha estudiado sobre la participación de la inmunidad innata en contrarlar la replicación del VFA; sin embargo, el interés ha ido aumentando con el paso del tiempo. Varios estudios ha demostrado que los IFN- α , - β y - γ pueden estar involucrados en la defensa contra el VFA en los animales susceptibles (Brown et al., 2000; Chinsangaram et al., 2001; Chinsangaram et al., 1999; Zhang et al., 2002). Equivalentemente, otras citoquinas pueden también tener un rol importante en esta defensa. Un estudio en cerdos, vacunados con la vacuna comercial, demostró que a pesar de no mostrar una respuesta sistémica inflamatoria, el plasma presentaba actividad quimiotáctica sobre los leucocitos de sangre periférica (Rigden et al., 2003). Además, en los cerdos vacunados los niveles de IL-6, IL-8 e IL-12 en el plasma aumentaban luego de la vacunación, sugiriendo una activación de los monocitos/macrófagos (Barnett et al., 2002). A pesar de que los niveles de IL-6 e IL-8 parecerían no estar relacionados con la protección en estos animales, los niveles de IL-

12 fueron mayores en los cerdos vacunados que estuvieron protegidos al desafío por contacto. Esto sugiere una participación en la inducción de monocitos/macrófagos mediada por citoquinas en la protección de la enfermedad (Barnett et al., 2002). Se ha mencionado además, que el microambiente producido por las células de la inmunidad innata induce la polarización de las células CD4⁺ a Th1 o Th2.

Finalmente, se ha demostrado que tanto las IgG1 como la IgG2 de bovinos son capaces de fijar complemento *in vitro* (IgG1 más eficiente), como así también de interactuar con alta afinidad con los receptores Fc de los fagocitos (Goff et al., 1984; McGuire et al., 1979). Por lo tanto, estos anticuerpos que sería capaces de promover la opsonización y la fagocitosis de los complejos inmunes, median mecanismos protectores más allá de la neutralización (McGuire et al., 1979; Quattrocchi et al., 2011).

1.4. VACUNAS CONTRA EL VFA

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. Es por ello que las vacunas actuales dirigidas contra patógenos virales se evalúan casi exclusivamente en su capacidad de generar fuertes respuestas de anticuerpos neutralizantes. La protección mediada por anticuerpos puede durar un largo período de tiempo, y la presencia de esos anticuerpos neutralizantes pueden prevenir, más que combatir, la infección en el momento del encuentro con el patógeno.

1.4.1. Vacuna clásica

La primera vacuna contra el VFA fue desarrollada por Valle, Schmidt y Waldmann en 1937. Los antígenos virales para la formulación de la vacuna eran obtenidos de lesiones de animales enfermos. El virus era primero adsorbido a hidróxido de aluminio Al(OH)₃ que funcionaba a su vez como adyuvante y luego era inactivado con formaldehído 0.02%. En 1951, esta fue reemplazada por una vacuna basada en la

producción *in vitro* del virus a gran escala, sobre cultivos primarios de epitelio de lengua de bovinos crecidas en suspensión (Frenkel, 1947). Indudablemente este método de producción 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. A partir de 1960 comenzaron a desarrollarse métodos de producción de virus en diversos cultivos celulares.

La etapa más importante en la producción de vacunas contra el VFA es la inactivación viral y el desarrollo de un ensayo que verifique y asegure la inactivación total (prueba de inocuidad). En el caso del VFA en particular, es absoluta la necesidad de garantizar la inocuidad ya que la ocurrencia de la enfermedad acarrea consecuencias económicas graves para el país afectado. La vacuna clásica tenía el grave inconveniente de no contar con una prueba de inocuidad por la toxicidad del $Al(OH)_3$ en ratones lactantes o cultivos celulares, ambos métodos utilizados para la detección y titulación del VFA en aquel momento. En consecuencia, grandes lotes de vacunas podían contener trazas de virus vivo indetectables. Sin embargo, la vacuna funcionaba de manera efectiva en el campo sin provocar ningún brote que se pudiera vincular de forma directa a la campaña de vacunación. Hasta que en 1981, se detectó una cepa aislada de un brote en Inglaterra que podría estar relacionado con el virus vacunal. Este hecho fue el propulsor de la búsqueda de nuevas alternativas para la formulación de la vacuna. El nuevo inactivante viral de primer orden que se comenzó a utilizar fue la *etilenimina binaria* (BEI), una aziridina elegida entre las demás por su menor toxicidad (Bahemann, 1975, 1990; Doel y David, 1984).

Durante más de 50 años la vacuna anti Aftosa se preparó con adyuvante de $Al(OH)_3$. En 1968 el *Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* (PANAFTOSA) inició el estudio de una vacuna anti Aftosa con adyuvante oleoso. Se comprobó que inducía títulos de anticuerpos contra el VFA más altos y estables que la vacuna en uso (Auge de Mello et

al., 1977; Bahnemann y Mesquita, 1987; PANAFTOSA, 1978). Esta vacuna entonces fue incorporada dentro de los programas regulares de vacunación en varios países, en reemplazo a la vacuna clásica.

1.4.2. Vacuna convencional 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; y la inactivación del VFA se realiza usualmente por tratamiento con BEI. La integridad de las partículas 140S es crucial para la eficacia de las vacunas. A diferencia de la antigua inactivación viral, las aziridinas no poseen las propiedades fijadoras del formaldehído. Como consecuencia, la inactivación con BEI resulta en una pérdida de casi el 10-30% de las partículas 140S, mientras que las vacunas inactivadas con formaldehído podían ser estables hasta por 5 años. A su vez, el medio ambiente altamente heterogéneo que constituyen los lisados vacunales, favorece la degradación y la aglomeración de las partículas. Incluso un aumento en la temperatura por sobre los 15°C, lleva a la ruptura progresiva de las cápsides, generando partículas 12S (pentámeros de VP1, VP2 y VP3) con muy baja actividad inmunogénica.

El virus inactivado posee relativamente baja inmunogenicidad por lo que se utilizan sustancias adyuvantes que actúan como vehículos y como inmunoestimuladores. El adyuvante que se utiliza en la vacuna actual es el adyuvante oleoso que reemplazo al $Al(OH)_3$ y generó estados de protección más duraderos. En resumen, la vacuna se formula a partir de una suspensión estable del virus inactivado la cual se emulsiona con el adyuvante oleoso. 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.

La ejecución de programas sistémicos de vacunación anti Aftosa ha permitido reducir el número de brotes y la erradicación de la enfermedad en muchas partes del mundo. No obstante, existen algunos inconvenientes asociados a la producción de las vacunas anti Aftosa inactivadas químicamente:

- El alto costo de producción en contención de seguridad biológica nivel 4 de la OIE (NSB4-OIE) en países libres de la enfermedad.
- La producción y manipulación de grandes cantidades de virus infectivo aumenta el riesgo de escape viral.
- 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 protectora.
- La composición química indefinida en cuanto al contenido del antígeno vacunal y la presencia de contaminantes celulares, relacionado en algunos casos, con shocks anafilácticos en los animales vacunados (Barteling y Vreeswijk, 1991).
- La necesidad de un alto grado de purificación del antígeno viral, asegurando la ausencia de trazas de proteínas no estructurales, que tras las sucesivas campañas de vacunación logren montar un respuesta de anticuerpos contra estas y no se pueda distinguir estos animales vacunadas de animales infectados. (Ensayos DIVA)
- La necesidad de incluir más de una cepa de cada serotipo, ya que en la mayoría de los casos no ofrecen protección cruzada

- La falta de protección durante los primeros días post-vacunación al no inducir una respuesta inmunitaria protectora rápida.
- El corto tiempo de salvaguarda de estas vacunas inactivas obligan a realizar esquemas periódicos de vacunación (Auge de Mello et al., 1977; Auge de Mello y Gomes, 1977).

Debido a estas desventajas de las vacunas convencionales y a que la enfermedad no ha sido aún erradicada en el mundo, se han desarrollado numerosas estrategias alternativas dirigidas a la mejora de la inmunogenicidad y seguridad de las vacunas actuales.

1.4.3. Nuevas estrategias vacunales contra VFA

1.4.3.1. Vacunas a virus vivo atenuado

Las vacunas a virus vivo modificado o vacunas atenuadas, consisten en la utilización de virus con capacidad infectiva reducida, pero capaces de mantener su inmunogenicidad. En un principio, la atenuación se llevó a cabo seleccionando subpoblaciones adaptadas a replicar en huéspedes no susceptibles, como ratones adultos u otros animales de laboratorio (Mowat et al., 1969; Mowat et al., 1962). 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.

Distintas estrategias han sido desarrolladas desde aquel momento para generar variantes de VFA atenuados. La delección o mutación de regiones del genoma viral que están implicadas en el bloqueo traduccional de la célula infectada (Lpro) (Almeida et al., 1998; Chinsangaram et al., 1998b; Piccone et al., 1995; Segundo et al., 2012) o implicadas en el reconocimiento de receptores (motivo RGD) (McKenna et al., 1995)

han sido algunas de ellas. No obstante, la selección de variantes virales que utilizan otros receptores alternativos (Baranowski et al., 2000; Zhao et al., 2003), riesgos de reversión a fenotipos virulentos o la incapacidad de inducir una buena respuesta inmunitaria protectora en el animal (Chinsangaram et al., 1998b; Mason et al., 1997), son los principales inconvenientes de este tipo de estrategias. Se debe resaltar que a pesar de encontrar una posible vacuna atenuada efectiva, como es el caso de la vacuna para cerdos desarrollada por el grupo liderado por la Dra. De los Santos (Segundo et al., 2012), la utilización de vacunas a virus vivo para el control de FA es altamente polémica.

1.4.3.2. Vacunas génicas

Las vacunas basadas en ADN también han sido otra de las alternativas desarrolladas para muchos agentes virales por su capacidad de inducir tanto una respuesta humoral como celular (Ulmer et al., 1996; Ulmer et al., 1998; Wolff et al., 1990). Estas vacunas representan un cambio básico en el modo en que los antígenos son presentados. Involucran la introducción directa en las células del organismo de ADN plasmídico codificante para un antígeno proteico, que luego es expresado en estas células blanco (Wang et al., 1993). Esto lleva a una respuesta inmunitaria efectiva (Davis et al., 1996; Fynan et al., 1993), que implica tanto la parte humoral como la celular contra diversos agentes infecciosos.

Algunos de los candidatos analizados como vacunas a ADN en hospedadores naturales del VFA o en modelos animales (ratón o cobayo) son plásmidos que expresan:

- a)** el genoma completo (Ward et al., 1997) o parcial (Kotla et al., 2016))
- b)** el genoma con deleciones del sitio RGD, afectando su unión a receptores celulares (Beard et al., 1999; McKenna et al., 1995)
- c)** combinaciones de epitopes B y T caracterizados para VFA
(Borrego et al., 2011; Zhang et al., 2003)

d) cápsides vacías (Cedillo-Barron et al., 2001; Chinsangaram et al., 1998a; Mignaqui et al., 2013; Porta et al., 2013)

Este tipo de vacunas presentan algunas ventajas claras sobre otras estrategias vacunales; son fácilmente producidas y escaladas, marcando una gran diferencia con la producción de un patógeno inactivado o una proteína recombinante, son más estables, y posibilitan la manipulación génica permitiendo modular la respuesta inducida en el hospedador (Restifo et al., 2000). A su vez, se podrían desarrollar y formular vacunas multivalentes con plásmidos que codifiquen para diferentes antígenos serotípicos.

Esta estrategia de vacunación con plásmidos que contienen secuencias de VFA, ha sido exitosa para inducir inmunidad protectora en el modelo ratón (Wang et al., 2008; Zou et al., 2010). Sin embargo, en los animales hospedadores, como bovinos, ovinos y porcinos, alcanzar la protección por la vacunación con ADN ha presentado más inconvenientes. Uno de ellos es el requerimiento de reinmunizaciones sucesivas con altas dosis de ADN plasmídico para inducir niveles significativos de anticuerpos específicos neutralizantes, como también la incorporación de adyuvantes y citoquinas (e.g., GM-CSF, IL-2) lo que induce en algunos casos total (Wong et al., 2002) o solo una protección parcial en cerdos (Borrego et al., 2011; Mingxiao et al., 2007). Sin embargo, esta es una estrategia que no ha sido abandonada por los investigadores, buscando nuevos métodos con el fin de mejorar la respuesta inducida por la vacuna y su capacidad protectora frente al VFA. La utilización de adyuvantes moleculares, aumento de expresión del antígeno viral por promotores fuertes y constitutivos, empleo de secuencias intrónicas para facilitar la expresión en algunos tipos celulares, y la utilización de la estrategia prime-and-boost (esquema combinado de vacunación entre plásmido y virus atenuados) (Dar et al., 2013; Fowler et al., 2012) son algunos de los métodos utilizados para mejorar las vacunas génicas contra el VFA.

1.4.3.3. Vacunas basadas 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.

Los vectores virales han sido exitosamente utilizados para el delivery de secuencias codificantes de la cápside de VFA en los animales. La estrategia mejor documentada y más efectiva es la que utiliza como vector al *adenovirus defectivo humano 5* (hAd5). A diferencia de las vacunas génicas, cuyo objetivo es la expresión de un antígeno específico para ser presentado al sistema inmunitario, las estrategias de vectores virales tienen como propósito proveer la información genética necesaria para expresar y procesar todas las proteínas estructurales del VFA; generando posiblemente cápsides vacías en las células infectadas con el hAd5 portador. Las vacunas hAd5-VFA son las más estudiadas y han demostrado ser vacunas inactivadas eficientes contra el VFA. Tanto en porcinos como en bovinos, se ha reportado protección total temprana frente al VFA; el desafío se realizó 7 días post-vacunación con una única dosis (Moraes et al., 2002; Pacheco et al., 2005; Schutta et al., 2015). Esta vacuna hAd5-VFA consiste en la expresión de todas las proteínas de la cápside, y de las proteasas 2A y 3C necesarias para el procesamiento de las proteínas estructurales; el resto de las proteínas no estructurales no estaban contempladas en la vacuna, lo que coloca a esta vacuna en la categoría DIVA. Esta es una de las vacunas alternativas para VFA más prometedoras, con resultados satisfactorios de protección en más de 150 animales (Schutta et al., 2015). Actualmente, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos le ha concedido una licencia condicional a la vacuna hAd5-VFA del serotipo A₂₄, permitiendo por primera vez la producción de una vacuna anti-Aftosa en este país, que puede ser

utilizada en caso de emergencia. Las vacunas dirigidas a los otros serotipos, están siendo producidos en lotes experimentales, y testeados en bovinos en Estados Unidos como parte del proceso de licenciamiento.

Equivalentemente a la vacuna inactivada comercial, las vacunas a vectores virales no logran la protección a los 4 días post vacunación en todos los animales inmunizados. Para cubrir esta ausencia de inmunidad se ensayó el tratamiento con IFN, por ser una de las primeras proteínas cuya expresión es inducida por el sistema inmunitario frente a una infección viral (Vilcek, 1996). Así, se ha demostrado que la infección productiva de VFA se inhibe en células pretratadas con IFN- α/β (Chinsangaram et al., 2001; Chinsangaram et al., 1999; Sellers, 1963) y que éste puede inducir una rápida respuesta protectora frente a VFA (Chinsangaram et al., 2003) En este sentido, se ha descrito la protección "inmediata" de cerdos vacunados con una combinación de adenovirus que expresan IFN- α y uno que expresa una subunidad vacunal de VFA (Moraes et al., 2003). Estos resultados indican que la combinación de vacunas derivadas de vectores virales junto con terapia antiviral podría ser útil 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.

1.4.3.4. Vacunas basadas en ARN

El bloqueo específico de la expresión de los genes virales o la actuación directa sobre el genoma del virus son la base de algunas estrategias alternativas basadas en la tecnología del ARN que se están desarrollando frente al VFA. Moléculas de ARN complementarias (antisentido) dirigidas frente a las 5' y 3' UTRs del genoma del VFA (Bigeriego et al., 1999; Carrillo et al., 2005; Rosas et al., 2003) o frente al segundo

codón iniciador de la traducción (Gutierrez *et al.*, 1993), fueron capaces de inhibir específicamente la producción de virus en cultivo celular.

La inhibición de la replicación viral por interferencia de ARN (iARN) es otra estrategia antiviral que ha sido ensayada contra el VFA. La administración de pequeñas moléculas de ARN interferente (siARN) es capaz de mediar la degradación específica de mensajeros de ARN y el silenciamiento génico específico (Bennink y Palmore, 2004; Bitko *et al.*, 2005; Haasnoot *et al.*, 2003). iARNs dirigidos frente a distintas regiones conservadas o esenciales del genoma de VFA, usados en combinación de más de uno o individualmente, han demostrado ser capaces de inhibir específicamente la replicación del virus en cultivo celular y en ratón lactante (Cong *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2014; Kahana *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2012).

1.4.3.5. Vacunas basadas en cápsides vacías

La obtención de cápsides vacías estructuralmente similares a los viriones (VLPs) y por lo tanto inmunogénicas, es otra de las estrategias que ha sido desarrollada contra el VFA (Abrams *et al.*, 1995; Grubman *et al.*, 1985). Durante la infección viral es posible aislar partículas vacías enteras. Estas cápsides vacías se unen a su célula blanco y se ha demostrado que son capaces de inducir un respuesta de anticuerpos neutralizantes (Rowlands *et al.*, 1975).

Distintos sistemas de expresión se han utilizado para producir las VLPs, sin embargo los bajos rendimientos obtenidos dificultan su aplicación vacunal (Belsham *et al.*, 1991; Roosien *et al.*, 1990). Existen trabajo en los cuales se reporta una protección en los modelos de animales de laboratorio (Mignaqui *et al.*, 2013); sin embargo, recientemente el grupo liderado por el Dr. Charleston, ha desarrollado una vacuna basada en cápsides vacías que ha resultado exitosa para la protección en bovinos (Porta

et al., 2013). Dicha estrategia consta de la expresión de una cápside vacía recombinante en células eucariotas, que posee una mutación dirigida con el objetivo de aumentar la estabilidad de la cápside vacía completa. Esta mutación permite predecir la formación de un puente disulfuro entre cisteínas de la VP2, productos de la mutación, que uniría entre sí a los pentámeros de la cápside. Esta vacuna, ha demostrado inducir títulos de anticuerpos neutralizantes sostenidos en el tiempo y proteger a los animales vacunados a las 34 semanas luego de la vacunación, lo que la posicionaría como una buena candidata.

1.4.3.6. Vacunas basadas en subunidades proteicas y péptidos sintéticos

La estrategia basada en subunidades proteicas consiste en la utilización de proteínas derivadas del virus, producidas por técnicas de ADN recombinante. Inicialmente se consideró que la proteína VP1 podía ser la proteína candidata para esta estrategia, fundamentado por la información de la estructura de la cápside viral incluyendo la prominente exposición de la VP1 y la importancia inmunogénica del "loop" GH de esta proteína estructural. En 1975 se aísla por primera vez la proteína VP1 a partir de virus purificado y se utiliza para inmunizar cerdos. Estos animales vacunados logran inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes (Bachrach et al., 1975). Años después, la proteína VP1 por técnicas de ADN recombinante es expresada en *E. coli* (Kupper et al., 1981) y utilizada como inmunógeno en animales hospedadores (Kleid et al., 1981). Los resultados de este trabajo indicaron que la VP1, logra proteger a los bovinos y porcinos vacunados contra el desafío con el VFA infeccioso. Sin embargo, diversos trabajos posteriores basados en esta estrategia no alcanzaron la inmunidad protectora esperada en los animales vacunados, a pesar de inducir un título alto de Acs neutralizantes. Por lo tanto la capacidad protectora específica de VP1, sintetizada en un sistema bacteriano resultó muy inferior a su equivalente en la partícula viral madura y

puso en evidencia la falta de conocimientos sobre la estructura de los epitopes virales neutralizantes.

La secuenciación nucleotídica de diferentes cepas del VFA mostró una variación en dos regiones de la VP1. Estas regiones representaban las ya mencionadas, región del "loop" GH expuesto en la superficie del virión y el extremo C-terminal de la VP1; ambas regiones corresponden a epitopes B. Trabajos basados en la síntesis y utilización de estos péptidos como inmunógenos acopladas a proteínas transportadoras como *hemocianina de lapa californiana* (KLH), demostraron que estas regiones peptídicas podían inducir altos niveles de anticuerpos neutralizantes en cobayos, conejos y bovinos (Bittle et al., 1982; Pfaff et al., 1982), pero solo se alcanzaba la protección contra el desafío de VFA en el modelo de cobayo.

Las investigaciones subsiguientes se centraron mayormente en modificar los péptidos basados en la VP1 con el fin de inducir una respuesta de Ac neutralizantes sin la necesidad de estar acoplados a una proteína transportadora, y adicionalmente realizar las modificaciones necesarias para alcanzar la protección en los hospedadores naturales. El modelo de cobayo fue el más utilizado para estudiar la inmunogenicidad de los péptidos no acoplados a proteínas transportadoras contra el VFA. En la gran mayoría de los trabajos, los péptidos que corresponden al "loop" GH de la VP1 logran inducir una respuesta de Ac neutralizantes y los animales vacunados se encuentran protegidos frente al desafío viral (Francis et al., 1987a). Paralelamente, otros trabajos sugirieron que péptidos de esta región no solo formarían epitopes B sino también epitopes T en el modelo de cobayo (Surovoi et al., 1988; Vol'pina et al., 1988). A su vez, se concluyó que los péptidos son más efectivos, en términos de protección, cuantos menos residuos aminoacídicos adicionales contenga el péptido lineal (Doel et al., 1988). Entonces, un péptido de 80 residuos que abarca la región 134-213 de la VP1, es menos efectivo que los péptidos de 40 o 45 residuos que contienen secuencias comprendidas en el primer péptido mencionado (CC-200-213-PPS-141-158-PCG o (134-160)-(196-213)

respectivamente). Finalmente, se evalúa la protección que confiere el péptido de 40 residuos para tres serotipos de VFA (O, A y C) frente al desafío con virus homólogo y heterólogo; el péptido del serotipo C resulta ser el menos efectivo de los tres péptidos, y los péptidos del serotipo A y O logran una protección tanto para el desafío homólogo como heterólogo (Doel et al., 1990).

Previamente, el grupo liderado por el Dr. Mowat reporta, en el año 1986 por primera y única vez, que un péptido lineal que abarca las regiones de VP1 estudiadas (residuos 141 a 158 y 200 a 213 del serotipo O1Kaufbeuren, péptido de 40 residuos) sintetizadas de manera colineal, induce una respuesta de Ac neutralizantes y protege a bovinos del desafío intradermolingual con VFA infeccioso (DiMarchi et al., 1986). Esta protección se observa en dos animales de un total de tres vacunados con una única dosis de péptido y en tres animales de un grupo de tres con una revacunación a los 32 días post-vacunación. Sin embargo, en trabajos donde se estudia estos péptidos en un número mayor de animales, se logra una protección limitada y se genera un escape de mutantes virales resistentes a anticuerpos contra la región antigénica (Rodriguez et al., 2003; Taboga et al., 1997). Unos de los inconvenientes que podrían tener estas vacunas peptídicas es la falta de epitopes B conformacionales. Estos sitios antigénicos representaban solo regiones lineales, continuas, de la cápside del virus; sin embargo, como se mencionó anteriormente existen epitopes B conformacionales que involucran distintas regiones de una proteína de la cápside o más de una proteína. Otro inconvenientes que presentan las vacunas peptídicas, es que están diseñadas para contener principalmente epitopes B del VFA, y no tienen en cuenta la incorporación de los epitopes para la respuesta de células T CD4⁺. Se demostró que esta incorporación es importante para la adecuada colaboración en la respuesta humoral y celular frente al VFA (Collen et al., 1991; Francis et al., 1987b; Wang et al., 2002).

El concepto de que los péptidos inmunogénicos, utilizados como vacuna, deberían contener también epitopes T virales para obtener una efectiva respuesta neutralizante

fue aceptado de manera universal. Estos epitopes deben ser reconocidos idealmente por las células T en el contexto de un CMH-II representado de manera frecuente en la población de los hospedadores naturales (epitope inmunodominante). El grupo liderado por el Dr. Spooner, concluyó que la respuesta T a la región 149-158 de VP1 era inmunodominante en bovinos (Glass et al., 1991), aunque este péptido no lograba primar a células T contra VFA (van Lierop et al., 1995b). A su vez, se identifica a otra secuencia de la VP1, que abarca los aminoácidos 21-40, como un epitope T inmunodominante en bovinos (Collen et al., 1991). Las células bovinas que responden a este péptido son células T CD4⁺ restringidas a CMH-II y secretoras de IL-2; por lo tanto esta región es definida como un epitope T colaborador. Trabajos siguientes se basaron en la combinación de péptidos inmunogénicos que constituían epitopes B, con péptidos que habían sido descritos como epitopes T del VFA y eran reconocidos por un número significativo de bovinos o porcinos (Blanco et al., 2001; Blanco et al., 2000; Collen et al., 1991; Glass et al., 1991; Van Lierop et al., 1995a).

Una de las estrategias péptidicas exitosas más recientes donde se incluyen tanto epitopes B como epitopes T, es la implementada por el grupo dirigido por la Dra. Blanco. Cerdos que fueron vacunados con una construcción peptídica dendrímica, presentaron una sólida protección frente al desafío viral. Esta construcción dendrímica consistía en una copia de un epitope T inmunodominante en cerdo [residuos (21-35) de la NSP 3A] (Blanco et al., 2001) unida a cuatro copias del epitope B [residuos (136-154) de la VP1]. Tras la vacunación de los animales, esta vacuna inducía altos niveles de anticuerpos neutralizantes contra VFA, activación de las células T, secreción de IFN- γ y una potente respuesta de IgA tanto sistémica como en mucosas (Cubillos et al., 2008).

1.5. PÉPTIDOS DENDRIMÉRICOS Y SU APLICACIÓN COMO VACUNA

Los dendrímeros son una nueva clase de polímeros ramificados bien definidos. En general, estos polímeros poseen tres características estructurales: un núcleo central o core, grupos funcionales en la periferia y unidades puentes que unen las otras dos estructuras mencionadas. Los péptidos dendriméricos pueden ser definidos ampliamente como cualquier dendrímero que contenga enlaces peptídicos. En particular, en 1988, Tam y colaboradores desarrollaron un *sistema múltiple de antígenos peptídicos* (MAP) (Tam, 1988). La estructura básica de los MAPs posee un core particular constituido a partir de lisinas. Cada molécula de aminoácido básico posee dos grupos amino (α y ϵ), que son aprovechados para unir los grupos funcionales. De esta manera la lisina constituye puntos de ramificación para el crecimiento logarítmico de la molécula peptídica; es decir, por cada lisina el dendrímero puede portar dos grupos funcionales.

Los péptidos dendriméricos, macromoléculas bien definidas, multivalentes, degradables por proteasas celulares y estables, son ideales para portar pequeños antígenos. En contraste con la mayoría de los péptidos sintéticos lineales, los MAPs utilizan una matriz basada en un núcleo peptídico, que como se mencionó antes puede ser una secuencia de lisinas o un secuencia aminoacídica elegida especialmente, conformando una macromolécula que es inmunogénica *per se* sin el requerimiento de proteína transportadora. El trabajo pionero en la utilización de MAPs como inmunógenos para FA, fue realizado en el modelo cobayo (Francis et al., 1991). Se inmunizaron cobayos con tres construcciones distintas de MAPs, compuestos por un core de lisina que unía dos, cuatro u ocho moléculas del péptido 141-160 de la VP1 (dendrímero bivalente, tetravalente u octavalente respectivamente). Estos MAPs inducen niveles de Acs neutralizantes similares a los inducidos con péptidos acoplados a proteínas transportadoras, y logran proteger a los animales frente desafío viral. Por lo tanto, la habilidad de inducir niveles protectores de Acs neutralizantes es una clara ventaja en el desarrollo de vacunas a péptido sintético. A diferencia de las proteínas transportadoras

usadas normalmente con los péptidos lineales, el tamaño de los epitopes T y epitopes B, su posición y la cantidad de estos en los MAPs, pueden ser definidos y controlados por el investigador; esto permite examinar la influencia de dichos factores en la inmunogenicidad y antigenicidad de la vacuna.

Se han diseñado un gran número de péptidos dendriméricos basados en sistema MAP, con o sin core peptídico. Asimismo, dendrímeros peptídicos conteniendo epitopes B y/o epitopes T de uno o más antígenos, han demostrado ser agentes inmunológicamente eficientes induciendo una respuesta inmunitaria a una variedad de agentes infecciosos.

Estudios recientes demostraron el potencial de los MAPs como inmunógenos, ya que son capaces de inducir respuesta de anticuerpos y respuesta celular frente a infecciones bacterianas humanas, como la peste bubónica (Ali et al., 2013; Rai et al., 2015), virales, incluyendo al VIH-1 (Vogel et al., 1994; Walker y Fast, 1994; Zhang et al., 2013) y también parasitarias. Por ejemplo, para el caso de la malaria, el MAP (T1B)₄ basado en un epitope B y un epitope T de *Plasmodium falciparum* ha mostrado inducir una respuesta protectora mediada por anticuerpos frente al desafío con el esporozoíto en ratones y simios (Moreno et al., 1999). Esta vacuna fue evaluada en un ensayo clínico (fase I) para corroborar su seguridad e inmunogenicidad en voluntarios sanos. Las respuestas inducidas, aunque potentes y prometedoras, se encontraban restringidas a tres genotipos determinado de CMH de clase II, que se encuentran representados en el 25-35% de la población, dependiendo del origen étnico (Nardin et al., 2000). Esto destaca la importancia de la inclusión de un epitope T adecuado e inmunodominante en las vacunas peptídicas dendriméricas para lograr una respuesta inmunitaria efectiva en una población de individuos con diversos CMH de clase II. Posteriormente, con la inclusión de un epitope T "universal", esta vacuna logra inducir una respuesta con niveles altos de anticuerpos contra la proteína circumsporozoito (CSP), que reviste a los esporozoitos, en voluntarios con diversos CMH clase II (Nardin et al., 2001).

En relación a infecciones virales de importancia veterinaria, se han evaluado péptidos dendriméricos diseñados para ser utilizados como vacuna contra la peste porcina clásica (CFS, por sus siglas en inglés). La inmunización de cerdos con tres construcciones dendriméricas distintas, basadas en epitopes del virus de la CFS (mismo epitope T, diferentes epitopes B), reducen significativamente la severidad de los signos clínicos de la enfermedad luego del desafío letal con el virus de la CFS (Tarradas et al., 2011). Sin embargo, las respuestas inmunitarias inducidas no logran alcanzar una protección completa, observándose solo protección en dos de los animales inmunizados con una de las construcciones dendriméricos ensayados. Con el objetivo de mejorar la inmunogenicidad de esta construcción, se seleccionó e incorporó a la vacuna, el epitope T correspondiente a la proteína NSP 3A del VFA, que había resultado inmunodominante en cerdos (Blanco et al., 2001). La sustitución del epitope T basado en el virus de la CFS por el epitope T basado en la proteína NS 3A del VFA, logra inducir niveles de anticuerpos neutralizantes significativamente mayores al inducido por el péptido dendrimérico original. Sin embargo, nuevamente no se alcanza la protección completa de los animales.

Para el caso del VFA, una de las enfermedades de mayor importancia veterinaria, los resultados de trabajos realizados recientemente en cerdos vacunados con péptidos dendriméricos fueron altamente prometedores para el uso de estos péptidos como vacuna contra la enfermedad. El grupo liderado por la Dra. Esther Blanco evaluó inicialmente, la inmunogenicidad de un péptido dendrimérico compuesto por cuatro epitopes B, basados en la proteína VP1 del VFA serotipo C, unido al ya mencionado epitope T inmunodominante en cerdos. Esta vacuna logró inducir una respuesta inmunitaria tanto celular como humoral, alcanzando altos títulos de anticuerpos neutralizantes y protegiendo a los cerdos inmunizados frente al desafío viral (Cubillos et al., 2008). Posteriormente, los investigadores diseñaron un péptido dendrimérico para ser utilizado como vacuna contra el VFA serotipo O. Este serotipo está ampliamente

distribuido alrededor de todo el mundo, y por lo tanto es fundamental su consideración para la prevención de la enfermedad y búsqueda erradicación; mientras que el serotipo C no circula desde 2005 (Jamal y Belsham, 2013). Estas vacunas que contenían péptidos dendriméricos con 2 o 4 epitopes B de la proteína VP1 de la cepa OUK 11/01 unidos a un epitope T, las cuales lograron nuevamente proteger a los animales vacunados frente al desafío viral (Blanco et al., 2016).

En resumen, por todo lo detallado anteriormente, los péptidos dendriméricos son una opción atractiva para ser seleccionados como inmunógenos que induzcan en los animales vacunados una respuesta inmunitaria efectiva logrando la protección de la enfermedad, y que además, poseen características ventajosas por sobre la vacuna comercial formulada con virus inactivo.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo de Tesis tiene como objetivo evaluar la capacidad inmunogénica y protectora de construcciones peptídicas dendriméricas como vacuna contra la Fiebre Aftosa en bovinos, un hospedador natural del virus que es de gran importancia económica.

Esta investigación se enmarca dentro del objetivo general de nuestro grupo de trabajo, que consiste en buscar nuevas vacunas contra el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) que eviten el uso de virus en su formulación

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Evaluar la inmunogenicidad y capacidad protectora en el bovino, de las vacunas peptídicas que resultaron protectoras en cerdo, diseñadas por el grupo de investigación liderado por la Dra. Esther Blanco.
- b) Diseñar un péptido dendrimérico capaz de mejorar la respuesta inmunitaria protectora inducida en bovino y evaluar la inmunogenicidad de dichos péptidos.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LÍNEAS CELULARES, VIRUS, PÉPTIDOS SINTÉTICOS Y ANIMALES

3.1.1 Líneas celulares

Para la amplificación del VFA, titulación del VFA y para los ensayos de *seroneutralización* (SN) se utilizó la línea susceptible BHK-21 (fibroblastos de riñón de hámster neonato) tanto en monocapa como en suspensión.

Para el ensayo de opsonofagocitosis se utilizó la línea BoMac (macrófagos bovinos). Esta línea celular fue establecida a partir de macrófagos peritoneales bovinos transfectados con ADN de SV40. Se ha reportado que esta línea mantiene la morfología de los macrófagos residentes del peritoneo y la mayoría de las propiedades fisiológicas como la capacidad de fagocitar.

3.1.2. Virus

Para los test de ELISA, se utilizó VFA inactivo de la cepa O1 Campos, inactivado con BEI y peleteado con PEG gentilmente cedido por la empresa Biogenesis-Bagó. Luego fue purificado utilizando un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa (15%- 45%).

Para las pruebas de desafío viral se utilizó virus activo del mismo serotipo gentilmente cedido por el SENASA. Este virus proviene de vesículas de bovinos infectados con VFA O1Campos y ha sido amplificado una vez sobre la línea celular susceptible BHK-21.

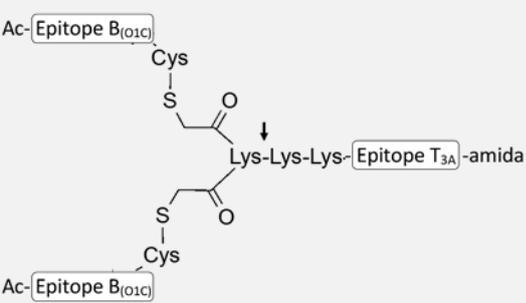
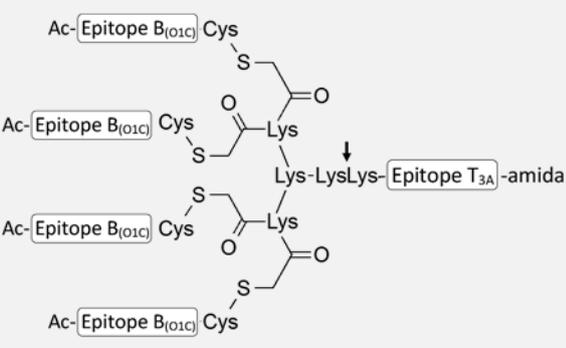
Para los ensayos de SN se utilizó el virus cedido por SENASA al que se le realizó una segunda ronda de amplificación en BHK-21 para alcanzar un título viral mayor.

Toda manipulación de virus vivo es realizada bajo normas de bioseguridad en el laboratorio de contención biológica NSB-4 OIE de INTA.

3.1.3. Péptidos sintéticos

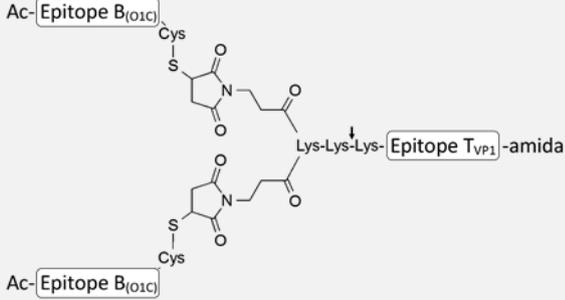
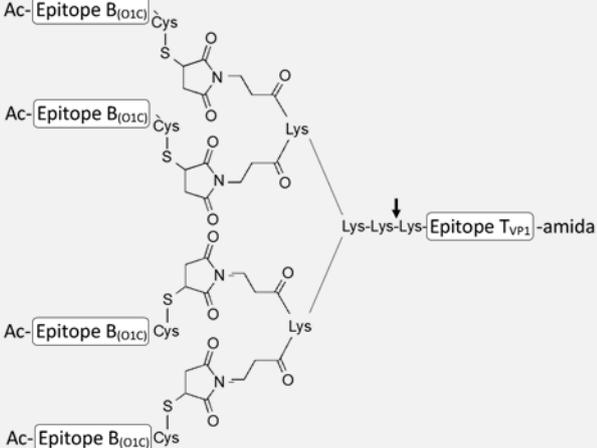
Los péptidos utilizados en esta tesis (Tabla 3.1 y 3.2) fueron sintetizados en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona, por el grupo liderado por el Dr. D. Andréu, utilizando para ello una modificación del método de síntesis en fase sólida (Kowalczyk et al., 2011). Los mismo son producidos a partir de la conjugación de un epítipo T elongado por su extremo N-ter con residuos de lisina proporcionando 2 o 4 niveles de ramificación y funcionalizado con grupos cloroacetilo ($B_{(OUK)2}T_{3A}$ y $B_{(OUK)4}T_{3A}$, Experimento 1) o con grupos maleimida ($B_{(O1C)2}T_{VP1}$ y $B_{(O1C)4}T_{VP1}$, Experimento 2), y epítipes B con una cisteína C-ter cuyo grupo tiol reacciona tanto con los grupos cloroacetilo como grupos maleimida.

TABLA 3.1 – Péptidos sintéticos utilizados en esta tesis (Experimento 1). Secuencias de péptidos lineales y estructura de dendrímeros

Péptidos	Proteína VFA (residuos)	Secuencia
$B_{(OUK)}$	VP1 (140-158)	PVTNVRGDLQVLAQKAART-amida
T_{3A}	3A (21-35)	AAIEFFEGMVHDSIK-amida
$B_{(OUK)2}T_{3A}$	VP1 (140-158)x2; 3A (21-35)	
$B_{(OUK)4}T_{3A}$	VP1 (140-158)x4; 3A (21-35)	

* La flecha en la secuencia de $B_{(OUK)2}T_{3A}$ y $B_{(OUK)4}T_{3A}$ indica un sitio putativo de clivaje para catepsina D

TABLA 3.2 – Péptidos sintéticos utilizados en esta tesis (Experimento 2). Secuencias de péptidos lineales y estructura de dendrímeros

Péptidos	Proteína VFA (residuos)	Secuencia
$B_{(01C)}$	VP1 (135-160)	RYSRNAVPNVRGDLQVLAQKVARTLP-amida
T_{VP1}	VP1 (21-40)	ETQIQRRQHTDVSFIMDRFV-amida
$B_{(01C)_2}T_{VP1}$	VP1 (135-160)x2; VP1 (21-40)	
$B_{(01C)_4}T_{VP1}$	VP1 (135-160)x4; VP1 (21-40)	

* La flecha en la secuencia de $B_{(01C)_2}T_{VP1}$ y $B_{(01C)_4}T_{VP1}$ indica un sitio putativo de clivaje para catepsina D

Por lo tanto, para el caso de los dendrímeros tetravalentes, los epitopes B se unen al correspondiente epitope T a través de un árbol de tres lisinas unida a dos lisinas adicionales, mientras que para el dendrímeros bivalentes solo fue necesaria la unión lineal de tres lisinas. La presencia de lisinas lineales en estas estructuras puentes, define un sitio putativo de corte de la catepsina D. Se ha sugerido que esta proteasa endosomal/lisosomal participa en el procesamiento de antígenos *in vivo*, originando fragmentos peptídicos que pueden ser cargados en el MHC-II por la vía de presentación exógena de las CPA (van Lierop et al., 1994).

Aunque los dos módulos eran accesibles en forma muy pura mediante síntesis en fase sólida, las conjugaciones basadas en tioéter son procesos lentos y no selectivos, por lo que se requiere una purificación extensiva. Por el contrario, $B_{(O1C)_2}T_{VP1}$ y $B_{(O1C)_4}T_{VP1}$ se producen casi cuantitativamente en una reacción tiol-alqueno limpia (Monso et al., 2013). Luego de la purificación, todos los constructos fueron satisfactoriamente identificados por cromatografía líquida-espectrometría de masas.

Por lo tanto, se sintetizaron dos tipos de péptidos: lineales y dendriméricos. Todos los péptidos fueron utilizados como antígenos en la estimulación de células mononucleares (CMN) bovinas, y solo los dendriméricos fueron utilizados como inmunógenos.

3.1.4 Animales

Se utilizaron 22 bovinos seronegativos para VFA de edades entre 1 y 2 años. De estos animales, 10 son provenientes del sur del país y fueron utilizados para el Experimento 1; y 12 bovinos nacieron en el campo de INTA Castelar y se utilizaron en el Experimento 2. Los sueros de los todos los animales fueron chequeados para corroborar que fueran libres de anticuerpos contra VFA O1Campos (títulos de anticuerpos por ELISA fase líquida <1.3)

3.2. INMUNIZACIÓN, MUESTREO Y DESAFÍO VIRAL DE ANIMALES.

3.2.1. Formulaciones vacunales

Para la formulación de la vacunas peptídicas dendriméricas, se utilizó el adyuvante MONTANIDE ISA 50 V2 Seppic (cedido gentilmente por Biogenesis-Bagó) en una emulsión simple agua en aceite (2:3). La formulación de la vacuna con dicho adyuvante fue realizada siguiendo las instrucciones del fabricante: se colocó en un recipiente adecuado el volumen requerido del adyuvante, se procedió a agitar vigorosamente y se adicionó gota a gota un volumen de la solución de péptido dendrimérico, de

concentración conocida, equivalente a 2:3 del volumen de adyuvante. La formulación final tiene una concentración de 1mg/ml de péptido dendrimérico y 60%v/v de adyuvante oleoso.

Por otro lado, se utilizó la vacuna comercial BIOAFTOGEN® (cedida gentilmente por Biogenesis-Bagó) para el grupo control positivo (grupo vacuna comercial) para las determinaciones inmunológicas. Dicha vacuna contiene en su formulación oleosa a las cepas del VFA: A24 Cruzeiro, A Argentina 2001, O1 Campos y C3 Indaial.

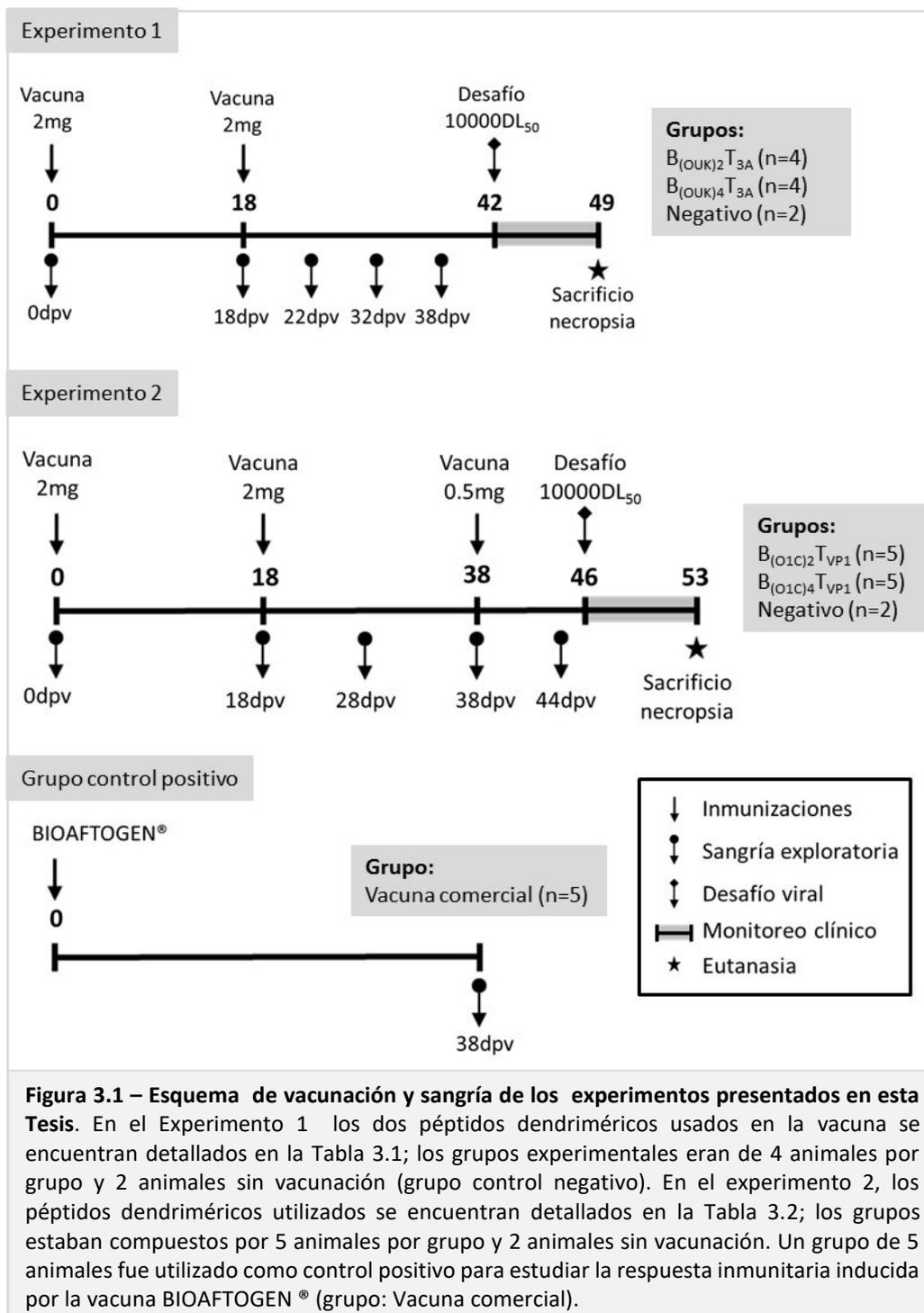
3.2.2. Inmunizaciones y muestreo

Los bovinos fueron inmunizados con 2 ml de vacuna por vía subcutánea en el cuarto delantero izquierdo, a los 0 dpv y 18 dpv en ambos experimentos (Figura 3.1). En el Experimento 2 fueron inmunizados por una tercera vez con un cuarto de la dosis (0.5 mg/ml, 2ml volumen final de la vacuna).

Los animales fueron sangrados por la vena yugular en distintos tiempos a lo largo del experimento (Figura 3.1), y la sangre fue recolectada en tubos para proceder a la separación del suero.

Para las secreciones nasales, se les colocaron apósitos compactos de algodón en la nariz de los animales se los dejó por un entre 2 y 3 minutos. Luego, se los colocó en un tubo cónico de 50ml, con una base de tubos de 0,5ml para proceder a la centrifugación y separación de la secreción. Los tiempos muestreados para las secreciones nasales fueron 22 y 32 dpv para el Experimento 1 y 28 dpv para el Experimento 2.

Un grupo de 5 animales libres de anticuerpos contra VFA, fue inmunizado con la vacuna comercial anti-Aftosa de Biogenesis-Bagó. Este grupo *control positivo* fue utilizado como control de calidad de la respuesta inmunitaria esperada e inducida por las vacunas peptídicas. Este grupo de animales permite comparar los parámetros inmunológicos inducidos por las vacunas experimentales con respecto a la vacuna convencional formulada con virus inactivado con BEI de uso corriente.



3.2.3. Desafío viral de los bovinos

Las experiencias de desafío fueron realizadas en el box de aislamiento bajo Normas de Bioseguridad Biológica nivel 4 para la OIE del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas de INTA Castelar. Este box está especialmente diseñado para contener y aislar animales de gran porte. En ambos experimentos, los bovinos

inmunizados son desafiados por instilación intranasal, con una dosis de 10000 DL₅₀ de VFA de serotipo O1 Campos, capaz de generalizar la infección en animales seronegativos. El procedimiento se realizó por goteo de 0.5ml la suspensión viral (10000 DL₅₀/ml) por narina, en animales previamente sedados con xilacina (Rompun®, en la dosis indicada por el fabricante). Asimismo, la manipulación de muestras infecciosas, titulación de muestras por efecto citopático, o ensayos a partir de muestras de los animales infectados se realizaron en el laboratorio de Bioseguridad NSB-4 OIE de INTA. Las muestras de sangre durante el monitoreo clínico fueron extraídas por punción de la vena yugular y utilizando tubos de suero o colocadas en tubos cónicos de 15 ml con Heparina sódica (concentración final en sangre 10 U.I./ml).

3.2.4. Monitoreo de enfermedad y eutanasia

Luego del desafío, los animales fueron monitoreados durante los 7 días siguientes en los cuales se registró la aparición de signos y síntomas de la enfermedad. Se consideró animal protegido frente a la FA a aquel que no presentaba las vesículas típicas de la enfermedad, ni en patas ni en cavidad oral, durante el monitoreo; y animal protegido frente a la generalización podal a aquellos que no presentaran lesiones en ninguna de sus patas.

El método para el sacrificio de los animales desafiados se encuentra aprobado por la Comisión Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación (CICUAE) del CICVyA del INTA-CNIA. Éste método consistió en la insensibilización de los animales mediante bala cautiva en la región frontal del cráneo, seguido de inmediato por degüello que permitió la completa exanguineación. Luego de las necropsias los animales se descartaron en el digestor de las instalaciones del box NSB-4 OIE.

3.3. ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL

3.3.1. ELISA Fase Líquida (EFL) para detección de Igs totales específicas contra VFA O1Campos en sueros bovinos.

La técnica fue realizada acorde al protocolo descrito por Hamblin y colaboradores (Hamblin et al., 1986). Placas Inmulon II fueron adsorbidas con 50 μ l por pocillo de suero de conejo anti-VFA, en buffer carbonato-bicarbonato pH=9,6 e incubadas a 4°C durante toda la noche (16-18 horas). Luego de lavar 3 veces con buffer fosfato salino (PBS)-0,05% Tween20 pH=7 (PBST), se colocaron 70 μ L por pocillo de buffer de bloqueo (PBST-OVA 1%) y se incubó durante 30 minutos a 37°C con agitación. En placas de baja adsorción se realizó la fase líquida, mezclando diluciones de sueros problema con un volumen equivalente de suspensión viral inactivada (cepa O1 Campos) en dilución óptima. Ambas diluciones se realizaron en buffer de bloqueo. La fase líquida se incubó durante 60 minutos a 37°C con agitación. Luego de descartar la solución de bloqueo de las placas Inmulon II, la fase líquida fue transferida a las placas bloqueadas. Se incubó durante 60 minutos a 37°C con agitación. Se lavaron las placas 3 veces con PBST. Se adicionaron 50 μ L por pocillo de suero de cobayo detector anti-VFA, en dilución óptima en PBST-5% suero normal conejo (SNC)-5% suero normal bovino (SNB) y se incubó durante 30 minutos a 37°C con agitación. Se volvieron a lavar las placas 3 veces con PBST y se agregó 50 μ L por pocillo de suero anti-cobayo conjugado con peroxidasa (KPL) en dilución óptima en PBST-5%SNC-5%SNB. Se incubó 30 minutos a 37°C con agitación. Se lavó nuevamente y se reveló por el agregado de 50 μ L por pocillo de ofenilenediamina-H₂O₂ (OPD) como sustrato de la peroxidasa. Se leyó la densidad óptica (D.O.) a 490 nm en un lector MR 5000 microplate. Los títulos de los anticuerpos fueron obtenidos como la dilución de suero que otorga el 50% de la D.O. del promedio de absorbancia de los controles sin suero (8 pocillos solo con virus inactivado, máxima D.O.).

3.3.2. ELISA para detección de IgGs totales específicas contra VFA O1Campos en sueros bovinos

Se puso a punto un ELISA captura para la determinación de Igs específicas contra VFA totales bovinas. Se cubrieron placas Inmulon II con suero anti-VFA de conejo diluido a la concentración óptima en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 durante toda la noche a 4°C. Luego de lavar con PBST, las placas fueron bloqueadas con buffer PBST-OVA5% por 40 minutos en agitación a 37°C, se descartó el buffer luego de la incubación y se adicionó 50ul de una suspensión de virus inactivo en una dilución óptima en el mismo buffer, y se incubó por 30 minutos a 37°C con agitación. Se lavaron nuevamente con PBST y se adicionaron los sueros en diluciones seriadas a partir de 1:50 y se incubaron por 1 hora 40 minutos a 37°C con agitación. Posteriormente, se lavaron las placas y se adicionó el anticuerpo anti-IgGs de bovino conjugado con peroxidasa (KPL) en dilución apropiada en PBST 5% SNC. Luego de incubar 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente, se lavaron las placas y se reveló utilizando OPD como sustrato de la peroxidasa. Se leyó la D.O. a 490 nm en un lector MR 5000 microplate. Se calculó el título de cada suero como el logaritmo de la inversa de la última dilución cuya D.O. es mayor al punto de corte. Se incluyeron controles positivos y sin suero en cada placa. El punto de corte para cada dilución de suero, se calculó como la D.O. promedio de al menos 5 sueros negativos más 2 desvíos estándar.

3.3.3. ELISA para detección de isotipos bovinos específicos contra VFA O1Campos en muestras de sangre y secreciones nasales

Se puso a punto un ELISA captura para la determinación de isotipos bovinos. Se cubrieron placas Inmulon II con suero anti-VFA de conejo diluido a la concentración optima en buffer carbonato-bicarbonato pH=9,6 durante toda la noche a 4°C. Luego de lavar con PBST, las placas se bloquearon con PBST 10% suero normal equino (SNE) durante 1 h a 37°C. Luego se adicionó el virus inactivo a concentración optima en PBST 10% SNE y se incubó durante 1 h a 37°C. Las placas se lavaron y se adicionaron los

sueros/hisopados a evaluar en diluciones seriadas en base 5. Se incubó 1 h a 37°C en el caso de IgG1 e IgG2 y a temperatura ambiente en el caso de la IgA. Se lavaron las placas y se adicionó los anticuerpos monoclonales de ratón anti-isotipo en cada caso (gentilmente donados por el Dr. S. Srikumaran, University of Nebraska, USA). Se lavaron las placas y se adicionó el anticuerpo anti-IgGs de ratón conjugado con peroxidasa en dilución apropiada en PBST 5% SNC. Se incubó 1 hora a 37°C con agitación, se lavaron las placas y se reveló utilizando OPD como sustrato de la peroxidasa. Se leyó la D.O. a 490 nm en un lector MR 5000 microplate. Se consideraron positivos aquellos sueros/hisopados que superaron la D.O. del punto de corte establecido como la media de la D.O. alcanzada por los sueros/hisopados negativos más dos desvíos estándar. Se calculó el título de cada suero como el logaritmo de la inversa de la última dilución cuya D.O. es mayor al punto de corte. Se incluyeron controles positivos y sin suero en cada placa

3.3.4 ELISA para detección de IgGs séricas totales bovinos específicas contra péptido

Se puso a punto un ELISA indirecto para la determinación de IgGs específicas totales en bovino contra péptido dendrimérico. Se cubrieron placas MaxiSorp (Nunc) con una concentración de 30µg/ml de péptido dendrimérico en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 durante toda la noche a 4°C. Luego de lavar con PBST, las placas fueron bloqueadas con buffer PBST-OVA5% por 40 minutos en agitación a 37°C, se descartó el buffer luego de la incubación y se adicionaron los sueros en diluciones seriadas a partir de 1:50 y se incubaron por 1 hora a 37°C con agitación. Posteriormente, se lavaron las placas y se adicionó el anticuerpo anti-IgGs de bovino conjugado con peroxidasa en dilución apropiada en PBST-OVA5%. Luego de incubar 1 hora a 37°C en agitación, se lavaron las placas y se reveló utilizando OPD como sustrato de la peroxidasa. Se leyó la D.O. a 490 nm en un lector MR 5000 microplate. Se calculó el título de cada suero como el logaritmo de la inversa de la última dilución cuya D.O.

es mayor al punto de corte. Se incluyeron controles positivos y sin suero en cada placa. El punto de corte para cada dilución de suero, se calculó como la D.O. promedio de al menos 5 sueros negativos más 2 desvíos estándar.

3.3.5 ELISA para detección de anticuerpos contra proteína no estructurales del VFA en sueros bovinos (ELISA comercial: PrioCHECK® FMDV NS)

Se siguieron las indicaciones del fabricante del ELISA PrioCHECK® FMDV NS. Brevemente, se adicionaron 20µl de los sueros, tanto experimentales como los controles proporcionados por el fabricante, a 80 µl de buffer ya agregados a las placas proveídas en el kit. Estas placas están recubiertas la proteína NSP 3ABC recombinantes captado por un AcMo específico. Las placas se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego del período de incubación las placas se lavaron 6 veces, se les agregó 100µl del conjugado monoclonal anti-3ABC (distinto al de captura) e se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora. Las placas se lavaron 6 veces y se les agregó la solución que contiene al cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) dejando revelar el ensayo por 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se leyó la D.O. a 450 nm en un lector MR 5000 microplate. Los valores de D.O. 450nm de las muestras se expresan como la inhibición porcentual relativa a la D.O. 450 máxima (control negativo=D.O. 450nm máx.)

$$IP = 100 - \left(\frac{D.O. 450nm \text{ de la muestra}}{D.O. 450nm \text{ máx.}} \right) \times 100$$

Si la IP de los sueros experimentales es <50% se considera que no hay anticuerpos contra la proteína NSP 3ABC, mientras que si IP es ≥50% el suero presenta anticuerpos que se unieron a la proteína NSP bloqueando la unión del conjugado y es considerado un suero positivo (animal infectado). Para que este resultado sea válido deben cumplirse los siguientes criterios: la D.O. 450nm máxima debe ser mayor a 1,000; la IP del control positivo medio debe ser >50%; la IP del control positivo fuerte debe ser >70%.

3.3.6. Seroneutralización para la determinación del título de neutralización viral contra el VFA en muestras de sueros bovinos y cerdos (Ensayo clásico: Virus fijo - suero variable)

Los sueros fueron primeramente incubados a 56°C durante 30 minutos para inactivar los componentes del complemento. Posteriormente, los sueros en diluciones seriadas en base 2 en medio MEM-D (comenzando por 1/4) fueron incubados durante 1 hora a 37°C con 100 DICT₅₀ de VFA activo por pocillo; cuatro replicas por dilución de suero. Luego, se adicionaron a cada pocillo 100ul de células BHK-21 en suspensión en una concentración de 300.000 células/ml cuyo medio contenía 20% suero fetal bovino (SFB). La aparición de efecto citopático fue evaluada a las a las 72 horas de incubación a 37° C mediante observación en el microscopio. En cada ensayo se tituló la alícuota de virus utilizada para la SN y se utilizó un suero control positivo y negativo para asegurar que las determinaciones realizadas en diferentes fechas fueron comparables entre sí. Se calculó el título de neutralización viral (TNV) de cada suero como el log de la inversa de la dilución en cual se observa el 50% de efecto citopático. Este ensayo clásico de seroneutralización, es uno de los ensayos prescrito por la OIE que comprueba la inmunidad proporcionada por la vacunación para conseguir la aprobación de venta y exportación de los animales vacunados (OIE, 2017).

3.3.7. Seroneutralización para la determinación de porcentaje de VFA neutralizado (Ensayo alternativo: Virus variable – suero fijo)

Los sueros previamente inactivados a 56°C durante 30 minutos se diluyeron en medio MEM-D (1/8). Se realizaron 4 dilución seriadas en base 10 del VFA en medio MEM-D. Un volumen de 50µl de cada suero fue adicionado a 4 pocillos de cada dilución viral. Esta mezcla de suero y virus fue incubada por 1 hora a 37°C. Luego de dicha incubación, se agregó 100ul de células BHK-21 en suspensión en una concentración de 300.000 células/ml cuyo medio contenía 20%SFB. La aparición de efecto citopático fue

evaluada a las 72 horas de incubación a 37° C en estufa de 5% CO₂, mediante observación en el microscopio. A su vez, se utilizó un suero control positivo y negativo para asegurar que las determinaciones realizadas en diferentes fechas fueron comparables entre sí. En cada ensayo se tituló la alícuota de virus utilizada para la SN sin suero interferente y se calcularon los títulos virales por el método de punto final de cada mezcla virus-suero (titulación por punto final con aproximación de Reed y Muench, mayor detalle en *Materiales y métodos sección 3.5.1*). Los resultados son expresados como el porcentaje de VFA neutralizado (%VFA neutralizado) calculado respecto al título viral sin suero o como índice de neutralización (IN) calculado respecto al título viral en presencia de un suero sin Ac anti-VFA.

$$\%VFA \text{ neutralizado} = 100 - \left(\frac{\text{Título viral con suero experimental}}{\text{Título viral sin suero interferente}} \times 100 \right)$$

$$IN = \log \left(\frac{DICT_{50} \text{ con suero experimental}}{DICT_{50} \text{ con suero control negativo}} \right)$$

3.3.8. Ensayo de opsonización-fagocitosis

El VFA inactivado y purificado fue marcado con FITC (Sigma, St. Louis, MO) como ha sido descrito anteriormente (Hartshorn et al., 1996; Huber et al., 2001). Brevemente, se incubaron 1 hora a 37°C un volumen de FITC (1mg/ml en buffer sodio carbonato 1M pH9.6) con 10 volúmenes de virus en una concentración de 2mg/ml. Luego de la incubación, esa suspensión se dializó frente a PBS por 18 horas a 4°C con agitación, con recambio del PBS en las primeras horas de diálisis. El volumen de virus marcado (VFA-FITC) fue recuperado de las bolsas de diálisis. El ensayo de opsonofagocitosis con virus inactivo marcado que se empleó, es una adaptación con cambios menores de la técnica referida anteriormente (Huber et al., 2001). Los sueros de los animales, previamente inactivados, se incubaron con un mismo volumen de VFA-FITC por 1 hora a 37°C en placas de 96 pocillos de cultivo celular. Luego de la incubación, se agregó a la suspensión de VFA-FITC opsonizado, 1x10⁶ células de la línea BoMac en suspensión y se incubó por 30 minutos a 37°C en estufa de 5% CO₂. La

fluorescencia extracelular fue amortiguada con 0.2mg/ml de una solución de Azul de Tripán. La fluorescencia fue analizada usando un citómetro FACSCalibur y el software CellQuest (BectonDickinson). Los resultados son expresados como el porcentaje de células VFA-FITC⁺ (%BoMac VFA-FITC⁺). El corte de opsonización-fagocitosis basal para VFA, se estableció como el promedio de %BoMac VFA-FITC⁺ con al menos 5 sueros libre de anticuerpos contra el virus más 2 desvíos estándar.

3.4. ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR

3.4.1. Obtención de células mononucleares bovinas de sangre periférica

Se extrajo sangre de la vena yugular de los animales, utilizando 3.8%*m/v* de citrato de sodio en relación 1:10 final en sangre, a distintos tiempos a lo largo de la experiencia (Figura 3.1). La sangre fue centrifugada por 20 minutos a 700g, y la capa de células blancas resultante retirada en la interfase fue diluida en PBS relación 1:3 y sembrada sobre el gradiente comercial Ficoll-PaqueTM plus (GE Healthcare). Luego de la centrifugación por 25 minutos a 400g, este gradiente logra la sedimentación de células de mayor densidad, como los eritrocitos y células polimorfonucleares, en el fondo del tubo y la purificación de las CMN en la interfase del plasma y el Ficoll-Paque. Se recupera el 60±20% de los linfocitos presentes en la muestra original de sangre. De las células presentes en la interfase, 95±5% de las células obtenidas son mononucleares viables, 3±2% son granulocitos, 5±2% son eritrocitos y menos del 0,5% de las plaquetas totales quedan retenidas en la muestra. La banda de células mononucleares fue retirada de la interfase del gradiente y diluida en RPMI 1640 5% SFB. Las células se lavaron dos veces con el mismo medio y finalmente se re suspendieron en RPMI completo [RPMI 1640 10% SFB adicionado con HEPES (10mM), L-Glutamina (2mM), piruvato (1mM) y β-Mercaptoetanol (0.05 mM)]. Se estableció la viabilidad mediante conteo en cámara de Neubauer con el colorante de exclusión Azul de Tripán.

3.4.2. ELISA para medición de IFN- γ bovino

Se puso a punto un ELISA captura para la determinación de IFN- γ bovino en sobrenadantes de cultivo. Las células mononucleares se incubaron con los siguientes antígenos durante 72 horas en placas de 96 pocillos fondo U: (I) VFA 5 μ g/ml, (II) los péptidos sintéticos, tanto lineales como dendriméricos, a una concentración de 50 μ g/ml y (III) con Concanavalina A (ConA) 5 μ g/ml. Como control negativo, se emplearon CMN incubadas con medio solo. Pasado ese tiempo el sobrenadante de cultivo fue retirado y congelado.

Se cubrieron placas Inmulon II toda la noche a 4°C, con AcMo anti IFN- γ en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Las placas se lavaron y se bloquearon con PBST 0,1% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se descartó el bloqueante, se colocaron los sobrenadantes sin diluir y diluidos al medio (1/2) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. A su vez, se incubaron diluciones seriadas en base 2 del IFN- γ bovino recombinante para establecer una curva estándar. Se lavaron las placas y se adicionó anticuerpo policlonal de conejo anti IFN- γ en dilución de uso en PBST 0,1% BSA. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente las placas, se agregó anticuerpo biotinilado anti IgGs de conejo (KPL) en dilución de uso en PBST 0,1% BSA y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar se adicionó peroxidasa conjugada con estreptoavidina (KPL) en dilución de uso en PBST 0.1% BSA y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Luego del lavado se agregó o-fenilenediamina-H₂O₂ como sustrato de la peroxidasa. Se incubó al resguardo de la luz y se leyó la D.O. a 490 nm en un lector MR 5000 microplate. Las D.O obtenida para cada dilución del IFN- γ recombinante se graficó en función de la concentración. Esta curva permite la interpolación de las D.O. de los sobrenadantes de las CMNs incubadas devolviendo la concentración de IFN- γ secretado por la estimulación antígeno específica. El sitio de corte fue calculado como el promedio de la secreción de IFN- γ por las CMNs de los animales a los 0dpv más dos desvíos estándar.

3.4.3. Linfoproliferación

Para los ensayos de linfoproliferación se utilizaron dos técnicas distintas, incorporación de timidina tritiada ($[^3\text{H}]\text{-T}$) y marcación con carboxifluoresceína éster de succinimidilo (CFSE). Para ambos ensayos las CMNs aisladas de sangre periférica de los bovinos fueron sembradas en placas de 96 pocillos y estimuladas *in vitro* con los siguientes antígenos: (I) VFA $5\mu\text{g/ml}$, (II) los péptidos sintéticos, tanto lineales como dendriméricos, a una concentración de $50\mu\text{g/ml}$ y (III) con Concanavalina A (ConA) $5\mu\text{g/ml}$. Como control negativo, se emplearon CMN incubadas con medio solo.

3.4.3.1. Incorporación de timidina tritiada ($[^3\text{H}]\text{-T}$)

Este ensayo se realizó en placas para cultivo celular de 96 pocillos fondo plano, utilizando una concentración de $2,5 \times 10^5$ CMN/200 μl por pocillo. Luego de incubar las células con los antígenos por triplicado durante 3 días a 37°C en estufa de $5\%\text{CO}_2$, se les realizó un pulso de $1\ \mu\text{Ci}$ / pocillo de $[^3\text{H}]\text{-T}$ y se las incubó 18 horas más. La incorporación del radioactivo a las células se midió empleando un contador de centelleo (Wallac 14, Perkin Elmer Life Sciences) el cual expresa la radiactividad en cuentas por minuto (c.p.m.). Los resultados para cada antígeno se expresan como índices de estimulación (IE).

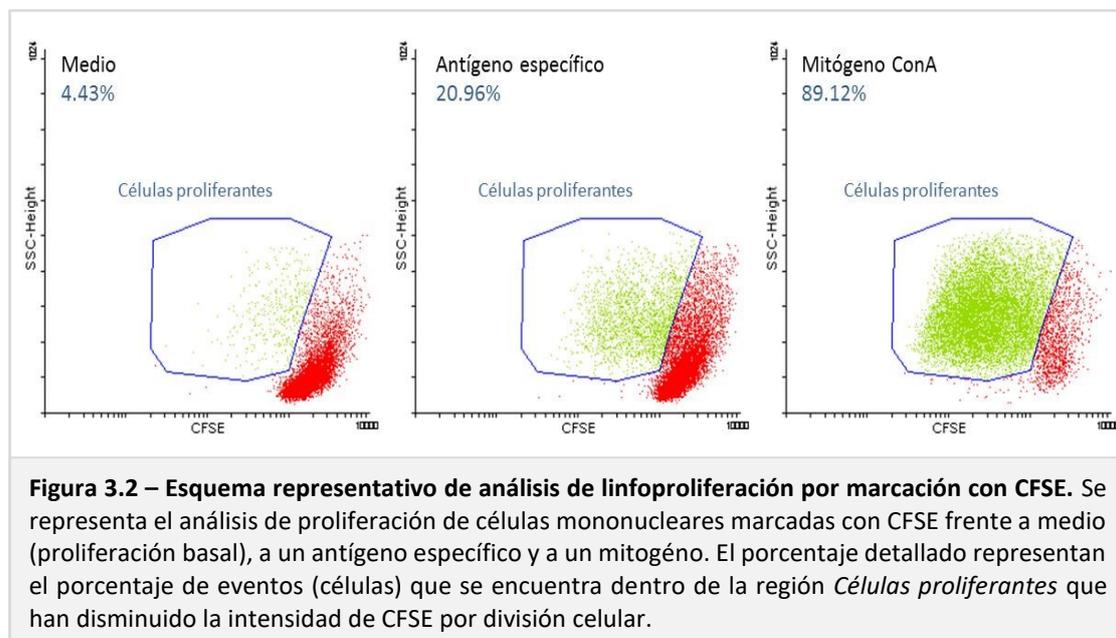
$$IE = \frac{\overline{\text{c.p.m. cultivo de CMNs estimulados}}}{\overline{\text{c.p.m. cultivo de CMNs sin antígeno}}}$$

3.4.3.2. Marcación con CFSE

Esta técnica utiliza la marca intracelular fluorescente CFSE para etiquetar a las celular proliferantes. El CFSE se une covalentemente a componentes citoplasmáticos de las células, lo que resulta en la fluorescencia brillante uniforme. Tras la división celular, el colorante es distribuido en partes iguales entre las células hijas, lo que permite una

resolución de hasta ocho ciclos de la división celular mediante citometría de flujo, permitiendo la discriminación de las sucesivas rondas de división celular. El CFSE se comercializa como *diacetato de carboxifluoresceína éster de succinimidilo* (CFDA-SE). Este compuesto no es fluorescente pero es altamente permeable a la célula. Una vez en el citoplasma las esterasas celulares remueven los grupos acetatos, convirtiendo la molécula CFDA-SE a la molécula fluorescente ya mencionada CFSE.

Este ensayo se realizó en placas para cultivo celular de 96 pocillos fondo U, utilizando una concentración de 5×10^5 CMNs/200 μ l por pocillo. Antes de incubar las células con los antígenos estas deben ser marcadas. Para proceder a la marcación la concentración de células debe ajustarse a 2×10^7 células/ml en PBS y estar correctamente resuspendidas sin agregados celulares. Se preparó una solución 2X de CFDA-SE (6 μ M) en PBS del **mismo volumen** que la solución de células. En un tubo que sea de 10 veces el volumen de las células, se mezclaron ambas soluciones [Final: 3 μ M CFSE, 1×10^7 células/ml] y se incubaron por 30 minutos en baño de 37°C o estufa de CO₂. Se agregó 10 volúmenes de PBS 5% SFB frío y se incubó 5 minutos en hielo para lavar y secuestrar el CFSE libre en solución. Se lavó 2 veces más con PBS con 5 volúmenes. Se resuspendió finalmente en RPMI completo ajustando a una concentración de 5×10^6 células/ml. Finalmente se siembran 100 μ l de las suspensiones celulares en las placas de 96 pocillos con los 100 μ l de los correspondientes antígenos previamente sembrados. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 5 días. Las células se cosecharon y la fluorescencia fue adquirida y analizada usando un citómetro FACScan y el software CellQuest (BectonDickinson). Los resultados son expresados como el porcentaje de células proliferantes con CFSE (%proliferación CFSE positiva) por pérdida de marca (Figura 3.2).



3.5. ANALISIS Y DETECCIÓN DEL VFA

3.5.1. Titulación viral por el método de punto final

Placas de 96 pocillos fueron sembradas con células BHK-21, a una densidad de 1×10^4 células por pocillo. A las 24 horas las monocapas con una confluencia de 80%, fueron lavadas con MEM-D libre de suero. Se realizaron diferentes diluciones en base 10 de la muestra a titular en MEM-D con 5% de SFB. Se colocaron 100 μ l/pocillo de cada dilución por cuadruplicado. La presencia o ausencia de efecto citopático fue evaluada a las 72 horas de incubación a 37°C en estufa con 5% de CO₂, por observación en microscopio.

La titulación a punto final se basa en la determinación de las dosis infecciosas que causa efecto citopático en el 50% de las unidades de prueba. La razón por la cual se elige esta zona del efecto citopático es para lograr una determinación precisa, ya que una pequeña variación en la dilución le corresponde una variación claramente detectable en la respuesta. Normalmente el 50% del efecto buscado no corresponde exactamente a una de las diluciones de trabajo, por lo que es necesario hacer una interpolación matemática para definirla. El método más empleado para este fin es el de Reed y

Muench (Reed y Muench, 1938). Se basa en la suposición de que el número de unidades de prueba afectadas varía proporcionalmente al log10 de la dilución, es decir que a diluciones menores (mayor concentración de virus) el porcentaje de efecto será mayor que a diluciones mayores (menor concentración de virus). Además, se supone que en la zona cercana al 50% de efecto, éste varía linealmente con la dosis.

$$\log(1DICT_{50}) = \log(dil > 50\%efecto) - (\bar{d}relativa 50\% \times \log dil^{-1})$$

$$\bar{d}relativa 50\% = \frac{\% efecto dilución > 50\% - 50\%}{\% efecto dilución > 50\% - \% efecto dilucion < 50\%}$$

$$\log dil^{-1} = \log (factor de dilución entre < 50\% y > 50\%)$$

De aquí se obtiene la dilución en la cual hay 1 DICT₅₀ en el inoculo utilizado y puesto en contacto con las células; la inversa de esta dilución devuelve las DICT₅₀ presentes en la solución sin diluir; y para conocer su concentración debemos relativizar las dosis infectivas al volumen del inóculo.

$$Título viral DICT_{50} = (dilución 1 DICT_{50})^{-1} / vol. inoculo$$

3.5.2. Extracción de ARN y RT-PCR para detectar replicación viral en epitelio de bovinos

Se tomaron, al momento del sacrificio de los animales (7dpi), muestras de epitelio de lesiones que se consideraban dudosas, y se le realizó el ensayo de retro transcripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la proteína NS 3D para confirmar la presencia del virus en dichas lesiones. Entonces, el ARN viral aislados de dichas muestras y se utilizó para realizar una RT PCR. Para la extracción del ARN viral se utilizó el reactivo comercial Trizol (Sigma). En 900µl de Trizol Reagent se agregó 300µl de los clarificados de macerados de epitelio realizados en MEM-D. Se siguieron los pasos indicados por el fabricante. Brevemente, luego de incubar la suspensión durante 15 minutos a temperatura ambiente, se agregó 200ml de cloroformo se agito vigorosamente por 15 segundos, se dejó reposar por 3 minutos y se centrifugó la mezcla

a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se resuspendió en una solución con 1ml de isopropanol y 1µl de glicógeno de concentración 20µg/ml (GE Healthcare). La mezcla se dejó precipitar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C. El pellet se lavó en etanol 75% se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C, se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se dejó secar. Luego, el ARN viral se resuspendió en 20µl de H₂O (libre de ADNasa/ARNasa) a 56 °C durante 10 minutos. Conjunto con las muestras a analizar, se sumó la extracción de una muestra control negativo (H₂O), y una muestra control positiva VFA amplificado en BHK-21. A partir del ARN viral obtenido, se sintetizó el ADN copia (ADNc) mediante una reacción de RT. La mezcla de reacción se realizó con 2µl de ARN viral, 2.5 µl de Buffer RT 5x (Promega), 1 µl de una solución 10mM de dNTPs (Promega), 0.25 µl de RNAsin 40U/µl (Promega), 0.5 µl de Random Primers 2µg/µl (Alfa DNA), 0.35ul de Retro-Transcriptasa Reversa M-MLV RT ("Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase") 200U/µl (Promega) y se completó con 3,4 µl de H₂O (destilada, libre de ADNasa/ARNasa –Invitrogen-) para obtener un volumen final de 10ul. La reacción se realizó en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 de Perkin Elmer o en el Thrio Termoblock TB1 de Biometra con el siguiente ciclado: 45 minutos a 42 °C, 10 minutos a 94 °C, infinito a 4°C. Con el ADNc obtenido se realizó una reacción de PCR utilizando 10 µl de la reacción de Retro- transcripción. Se realizó la mezcla de reacción la cual contenía: 1 µl de cada uno de los primers específicos (0.1 mg/ml) (Alfa DNA), 1.5 µl de MgCl₂ 50mg/ml (Invitrogen), 5 µl de Buffer 10X (Invitrogen), 0.25 µl de Taq Polimerasa (500 U/ml) (Invitrogen) y se completó con 31.25 µl de H₂O (destilada, libre de ADNasa/ARNasa –Invitrogen-) para obtener un volumen final de 50 µl. La reacción de PCR se realizó con oligonucleótidos iniciadores (primers) específicos para VFA (región interna de la polimerasa viral 3D) y para un control interno de ARN ribosomal (Smith y col. 2000). Las condiciones de la PCR fueron: 94°C durante 3 min, luego 35 ciclos de 1

minuto a 94°C, 1 minutos a 55°C y 1,5 minutos a 72°C, luego 7 minutos a 72°C y finalmente hold a 4°C.

Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa 1,8% y se observaron las bandas correspondientes al control interno: 480 Kpb y al producto de amplificación del VFA: 380 Kpb (Marcador de peso molecular: "ladder 100kpb" de la UNQ).

Primers utilizados para la amplificación de VFA:

1461: 5'GACCCGAAGTTGAGGCTGCC 3'

1462: 5'GCCGAACTCCGTGCGAAACA 3'

Primers: GK2 -antisense- CTAGACCGTGTGGTGGGTT and GK7 -sense- CCGACCACCACGGTGTTCG

Primers utilizados para la amplificación del control ribosomal:

18SD: 5' GGACATCTAAGGCATCACA 3'

18SU: 5' TCAAGAACGAAAGTCGGAGG 3'

La amplificación de la secuencias de la proteína NS 3D estuvo a cargo del grupo liderado por el Dr. Guido Köing.

3.5.3. Secuenciación de ADNc proveniente de macerados de epitelio de animales infectados

Se realizó una PCR para amplificar la región de la proteína VP1 que contiene el epitope B para luego secuenciarla de los epitelios de los animales que presentaron lesiones dudosas. Para ello se utilizaron los primers ALFA1 5' CTCGTTTCATCATGGACAGATT 3' (sentido) y P12B 5' TTCGAAGTACCAGGGTTTGGC 3' (anti-sentido) que genera un fragmento de 780pb. Este fragmento corresponde a la secuencia codificante para los aminoácidos que comprende las posiciones 22 a 213 de la poliproteína del VFA O1Campos, conteniendo al epitope B de interés. Los pasos para la PCR son los mencionados en la sección anterior utilizando estos primers. Las bandas de los productos de PCR son recuperados del gel de agarosa realizando el protocolo de

purificación de ADN Illustra™ GFX™ (GE-Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenido el eluido con el ADN, las secuenciaciones fueron realizadas en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología a cargo de la Dra. Andrea Puebla a través de electroforesis capilar.

3.6. CARACTERIZACIÓN DE RESPUESTA EN GANAGLIOS LINFÁTICOS

3.6.1. Obtención de órganos linfoides luego del sacrificio

Teniendo en cuenta la potencial implicancia de determinados tejidos en la respuesta inmune frente a la infección por VFA en el bovino, la elección de los órganos se basó en reportes previos mostrando cuales eran los ganglios más reactivos (Pega et al., 2013; Pega et al., 2015) y los principales sitios de replicación del VFA a lo largo del tracto respiratorio (Pacheco et al., 2010). Las muestras obtenidas *post-mortem* se identificaron en base a sus características macroscópicas y localización anatómica distintiva, y corresponden a:

- a) Linfonódulos mandibulares (LM)
- b) Linfonódulos retrofaríngeos mediales (LRM)
- c) Linfonódulo traqueo-bronquiales (TBL)

Los primeros dos constituyen órganos linfoides que drenan estructuras del tracto respiratorio superior, mientras que el linfonódulo traqueo-bronquial drena el tracto respiratorio inferior (Figura 3.3).

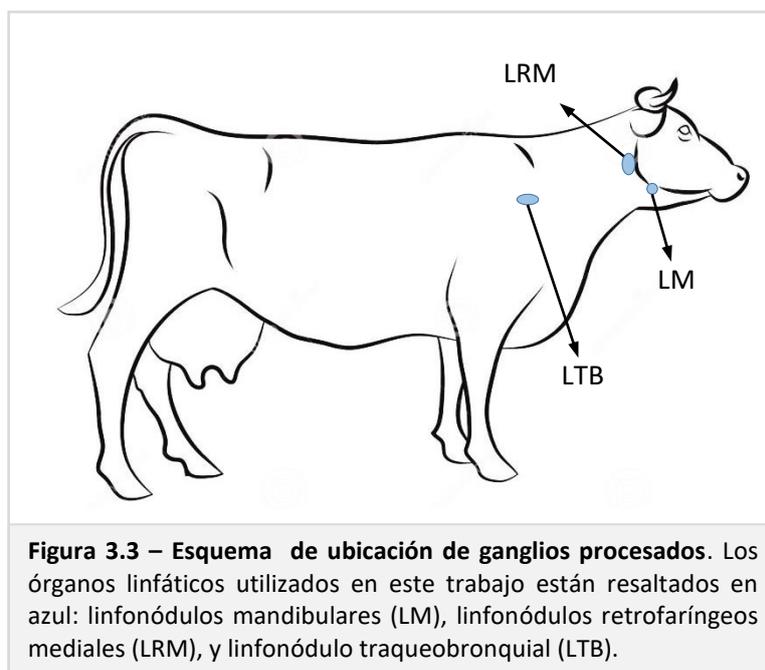


Figura 3.3 – Esquema de ubicación de ganglios procesados. Los órganos linfáticos utilizados en este trabajo están resaltados en azul: linfonódulos mandibulares (LM), linfonódulos retrofaríngeos mediales (LRM), y linfonódulo traqueobronquial (LTB).

Los diferentes órganos fueron extraídos asépticamente y colocados en medio de cultivo (RPMI 1640, HEPES 10mM, 106 UI/mL de penicilina G sódica, 700 mg/mL de estreptomicina y 500 mg/mL de gentamicina), previa remoción del exceso de tejido conectivo utilizando tijeras y bisturí estériles. Los órganos muestreados se mantuvieron en frío y se trasladaron dentro de un triple envase rociado con ácido acético de acuerdo a las normas de bioseguridad, desde el box NSB4-OIE al laboratorio NSB4-OIE del CICVyA, INTA-CNIA, donde fueron procesados.

3.6.2. Aislamiento de CMN a partir de órganos linfoides

Los órganos linfoides obtenidos *post-mortem* fueron desintegrados utilizando cribadores de disociación celular para tejido con malla de acero N°80 (Sigma-Aldrich) para obtener suspensiones celulares aisladas, las cuales fueron resuspendidas en solución de Percoll 90% (GE Healthcare) y centrifugadas a 5000g por 30 minutos a 4°C. Los precipitados celulares fueron resuspendidos en Percoll 43% y luego de ser sembrados sobre Percoll 70%, se centrifugaron a 4000g durante 30 minutos a 4°C. Luego se recolectaron las células de la interface 43-70%, se resuspendieron en medio de cultivo conteniendo 10% de SFB y su viabilidad fue determinada por exclusión con

tinción de Azul de Tripán, debiendo resultar en todos los casos >95%. La densidad de cada solución de Percoll se ajustó previamente por refractometría por medio de un refractómetro de mano (NSG Precision Cells, INC, NY). El número de CMNs aisladas de cada órgano se ajustó a 5×10^6 y $2,5 \times 10^6$ células/ml, siendo ambas diluciones las que se utilizaron en los ensayos de ELISPOT.

3.6.3. ELISPOT de isotipos de células secretoras de anticuerpos específicos para VFA O1Campos en bovino

Con el objeto de estudiar la respuesta de anticuerpos en el tracto respiratorio del bovino, se realizó un ensayo de ELISPOT para analizar y determinar las células productoras de anticuerpos (CSA) específicas para VFA O1Campos presentes en las CMN aisladas de los órganos disecados. Este ensayo no solo permitirá determinar el número de CSA presentes en los órganos, sino también los isotipos de los anticuerpos que producen.

Se sensibilizaron placas con fondo de nitrocelulosa de 96 pocillos con $40 \mu\text{g/mL}$ del antígeno 146S purificado toda la noche. Las mismas se bloquearon con PBS-4% leche descremada durante dos horas a temperatura ambiente. Las CMN purificadas de cada órgano linfóide fueron sembradas en dos diluciones (5×10^6 y $2,5 \times 10^6$ células/ml) por triplicado y se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 durante 16 horas. Se utilizaron anticuerpos de ratón AcMo anti IgG1 e IgG2 bovinas (ambos en dilución 1:500), los cuales se colocaron en los pocillos asignados a estos isotipos. Simultáneamente se agregaron anticuerpos (conjugados con HRP) de oveja anti IgA e IgM bovinas (ambos en dilución 1:5000) en los pocillos correspondientes a cada uno de estos dos tratamientos. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se agregó un anticuerpo de cabra anti ratón conjugado con HRP (dilución 1:1000) donde previamente se habían colocado los anticuerpos sin marca (anti IgG1 e IgG2). Para el revelado se empleó el cromógeno "True Blue" (KPL). Las CSA se contabilizaron

manualmente utilizando una lupa estereoscópica, considerando cada punto de coloración como una CSA.

3.7. USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Todos los procedimientos detallados a lo largo de la tesis que involucran el uso de animales, cuentan con el aval del CICUAE del CICVyA de INTA-CNIA. Los protocolos aprobados son registrados con los N°77/2013 (Experimento 1) y N°14/2011 (Experimento 2).

Toda manipulación de virus vivo para la reproducción experimental de la enfermedad fue realizada bajo estrictas normas de bioseguridad en el Box NSB 4-OIE del INTA. La manipulación de virus vivo para la realización de pruebas y ensayos o material de animales infectados fue realizada bajo estrictas normas de bioseguridad en el laboratorio de Bioseguridad NSB 4-OIE del INTA.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para el estudio estadístico de los datos se utilizó el programa Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc.). Los valores obtenidos para los distintos parámetros evaluado entre los grupos experimentales, se compararon por:

- a) En ensayo t de Student para comparación entre dos grupos.
- b) Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y el método post-ANOVA Dunnett cuando se ensayan más de dos grupos.
- c) ANOVA para mediciones repetidas, cuando se comparan valores en distinto tiempo dentro de un grupo (mediciones pareadas) y el método post-ANOVA Bonferroni.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y CAPACIDAD PROTECTORA DE LAS VACUNAS BASADAS EN EL VFA O/UK 11/01 (Experimento 1)

El primer objetivo de esta Tesis es evaluar la respuesta inmunitaria inducida en bovinos por dos construcciones peptídicas dendriméricas que han resultado exitosas en la protección de cerdos frente al desafío con el virus O/UK 11/01 (Blanco et al., 2016). Los péptidos dendriméricos que fueron evaluados en este primer experimento (Experimento 1) se encuentran detallados en la Tabla 3.1 sección *Materiales y métodos*. Estos péptidos dendriméricos logran desarrollar una eficiente respuesta inmunitaria en los cerdos vacunados, alcanzando una protección del 80% en los animales vacunados con $B_{(OUK)2}T_{3A}$ o del 60% con $B_{(OUK)4}T_{3A}$.

$B_{(OUK)2}T_{3A}$ y $B_{(OUK)4}T_{3A}$ se diseñaron en base a la secuencia de la proteína VP1, aminoácidos en las posiciones [140–158] del VFA cepa O/UK 11/01 para el epítipo de reconocimiento por células B. Este epítipo B, ya sea de manera bivalente ($B_{(OUK)2}T_{3A}$) o tetravalente ($B_{(OUK)4}T_{3A}$) se encuentra unido covalentemente a un puente de lisina que los une al epítipo T (determinado como inmunodominante porcino) (Blanco et al., 2001; Monso et al., 2012) basado en la secuencia de la NSP 3A, posiciones aminoacídicas [21-35] altamente conservadas entre serotipos. La cepa O/UK 11/01 de VFA fue la causante del brote epidémico que sufrió Reino Unido en el año 2001, y que obligó a sacrificar millones de cabezas de ganado provocando una pérdida económica de miles de millones de libras en dicho país. Desde entonces, las investigaciones europeas pertinentes al VFA comenzaron a centrarse en esta cepa en particular.

En este punto es necesario remarcar que en Argentina existe una regulación, por parte del SENASA, que restringe la manipulación del VFA a ciertos laboratorios habilitados que cumplen con estrictas normas seguridad biológica, dado que el VFA es un agente infeccioso de máximo riesgo biológico para el área veterinaria. En la

Resolución N°351/06 del SENASA se establecen las condiciones para el manejo de las siguientes cepas de VFA exclusivamente: O1Campos, AArgentina2001, A24Cruzeiro y C3Indaial. Actualmente, estas cepas son las que se encuentran presentes en las formulaciones vacunales aprobadas y utilizadas en las campañas sistemáticas de vacunación. Por lo tanto, se considera de mayor riesgo la manipulación de cepas no presentes en la formulación vacunal, debido a que los animales no tendrían una protección inmunitaria frente a estas cepas exóticas. En consecuencia, está prohibida la manipulación de cepas tales como O/UK 11/01 dentro del territorio argentino, y por ende se ha utilizado, para el desarrollo del presente trabajo de tesis, el VFA O1Campos, cepa de manejo autorizado del serotipo O en nuestro país.

Con el fin de evaluar la posibilidad de que los péptidos dendriméricos diseñados para O/UK 11/01 puedan ser de utilidad frente a O1Campos, se realizó una comparación de secuencias correspondientes al epítipo B de las dos cepas de interés (O/UK 11/01 y O1Campos). Se observó una homología del 84% (Figura 4.1) y que las posiciones aminoacídicas importantes para el ingreso de virus en la célula, y que son blanco de anticuerpos neutralizantes (Burman et al., 2006; Verdaguer et al., 1997), están conservadas en ambas secuencias.

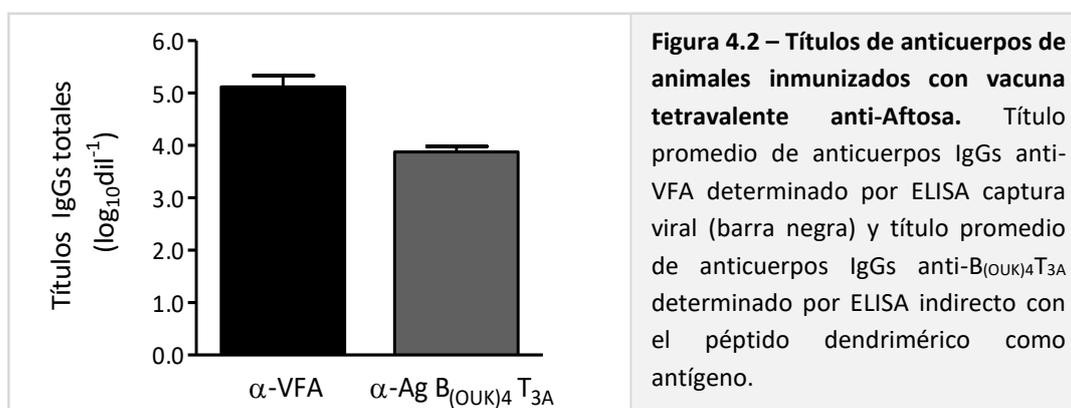
	140		145		150		155													
O1campos	A	V	P	P	N	V	R	G	D	L	Q	V	L	A	Q	K	V	A	R	T
O/UK 11/01	P	V	T	P	N	V	R	G	D	L	Q	V	L	A	Q	K	A	A	R	T

Figura 4.1 – Comparación de secuencias entre cepas. Se compara la secuencias de la cepa O/UK 11/01 en la cual está basado el diseño de los péptidos dendriméricos para el epítipo B y la secuencia homóloga correspondiente a la cepa O1Campos. Cuadros celestes: posiciones aminoacídicas importantes para el ingreso del virus a la célula por vía de integrinas.

4.1.1. Evaluación de reactividad cruzada de sueros de animales vacunados con vacuna comercial que contiene VFA O1Campos

Previamente a la inmunización experimental de los animales con el péptido dendrimérico, se realizaron algunos ensayos con el objetivo de corroborar si la respuesta humoral generada por la vacuna que contiene al VFA O1Campos inactivado era capaz de reconocer de manera cruzada al VFA O/UK 11/01. Específicamente, se evaluó la capacidad de los anticuerpos generados por la vacuna contra la cápside viral de O1Campos, de reconocer el péptido dendrimérico que posee la secuencia de VP1 del VFA O/UK 11/01 correspondiente al epítotope B.

Un grupo de 5 animales inmunizados con vacuna comercial (tetraivalente, A24Cruzeiro, AArgentina2001, C3Indaial y O1Campos) fueron sangrados a los 30 dpv; se evaluó la capacidad de las IgGs de reconocer al VFA O1Campos por un ELISA captura viral y un EFL, y de reconocer el dendrímero tetraivalente B_{(OUK)₄T_{3A}} con la secuencia del epítotope B del VFA O/UK 11/ 01 (Figura 4.2).



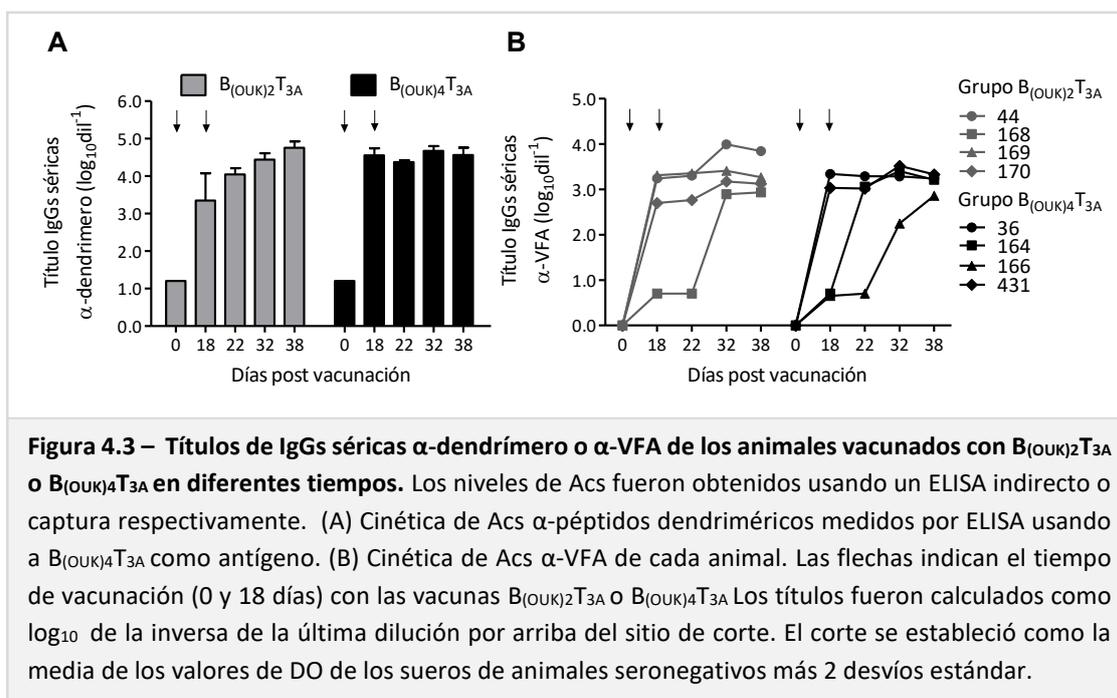
Como se puede observar, la vacuna comercial induce anticuerpos capaces de reconocer al VFA O1Campos con títulos altos de IgGs (título promedio: 5,1±0,5) , y con un título promedio positivo alto de Igs medido por EFL (3,0±0,2; dato no mostrado). Asimismo, estos anticuerpos son capaces de reconocer la secuencia homóloga del VFA O/UK 11/01 presentada en el péptido dendrimérico, confirmado por un título de IgGs promedio de 3,9±0,2 contra el péptido. Esto indica que el epítotope B presente en el

péptido dendrimérico comparte epitopes con la secuencia presentada por el VFA O1Campos. Es decir, que la inmunización con los péptidos dendriméricos basados en secuencias de VFA O/UK 11/01 podrían generar anticuerpos capaces de reconocer a la cápside del VFA O1Campos. Adicionalmente, sueros de bovinos inmunizados con vacuna contra VFA OUK 11/01 inactivado mostraron títulos de Igs mayores a 2,1 por EFL (títulos positivos; OIE, 2017).

Por lo tanto, se investigó si las estas construcciones dendriméricas $B_{(OUK)_2}T_{3A}$ y $B_{(OUK)_4}T_{3A}$ eran capaces de montar una respuesta inmunitaria suficiente para proteger a los bovinos vacunados frente al desafío con el VFA serotipo O, determinando su potencial como candidatos vacunales.

4.1.2. Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral inducida por los péptidos dendriméricos.

Está ampliamente reportado que la respuesta inmunitaria humoral tiene un papel central en el control de la infección por VFA. Por ello se estudiaron los anticuerpos séricos de los animales vacunados con los péptidos $B_{(OUK)_2}T_{3A}$ y $B_{(OUK)_4}T_{3A}$ por ELISA. El análisis de anti- $B_{(OUK)_4}T_{3A}$ reveló que todos los animales desarrollaron una respuesta de IgGs pronunciada y específica (Figura 4.3A). Más aún, estos anticuerpos fueron capaces de reconocer específicamente a la cápside del VFA O1Campos inactivada, como se puede observar en la cinética de Acs IgGs contra la cápside viral (Figura 4.3B). Sin embargo, los animales n°168 ($B_{(OUK)_2}T_{3A}$), n°164 y n°166 ($B_{(OUK)_4}T_{3A}$) desarrollaron anticuerpos capaces de reconocer al VFA O1Campos sólo después de la revacunación a los 18 dpv. A los 38 dpv, los animales de ambos grupos mostraron altos títulos de IgGs α -VFA con valores de entre 2,9 y 3,8.

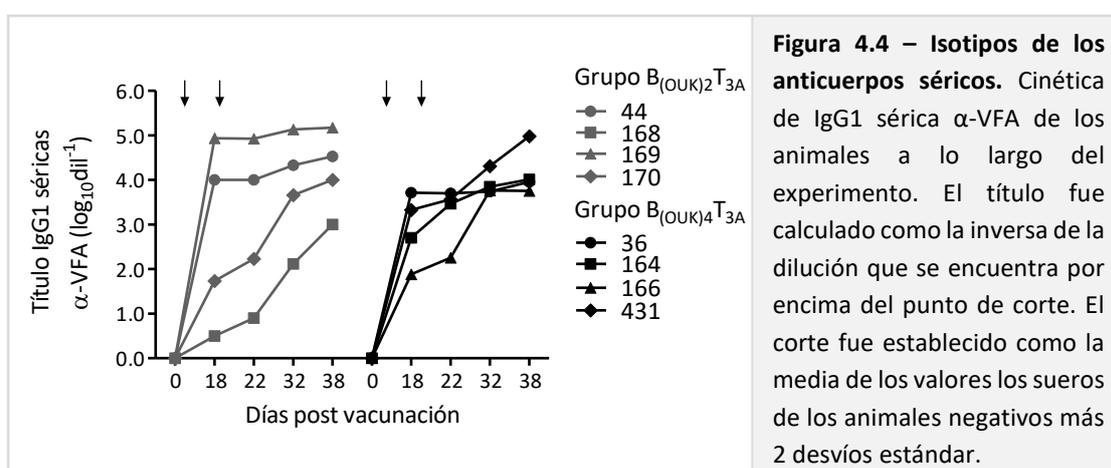


En conclusión, podemos afirmar que no solo los sueros de los animales inmunizados con vacuna comercial (que contiene al VFA O1Campos entre los serotipos) reconoce a la secuencia homologa de la cepa O/UK 11/01 presente en el péptido dendrimérico (Figura 4.2), sino que también la inmunización con los péptidos dendriméricos basados en secuencias de VFA O/UK 11/01 generaron, anticuerpos capaces de reconocer a la cápside del VFA O1Campos (Figura 4.3).

4.1.2.1. Evaluación de los isotipos de anticuerpos inducidos

Las IgGs de diferentes isotipos pueden tener diferentes funciones efectoras. A pesar de que aún no ha sido totalmente dilucidado el papel funcional de los isotipos en la especie bovina, si se relaciona a la regulación positiva de IgG2 con un perfil Th1 (aumenta su producción en presencia de IFN-γ) mientras que al IgG1 se asocia a un perfil Th2 (producción aumentada en presencia de IL-4). Por lo tanto, se determinó el perfil de IgGs séricas de cada animal tras la vacunación con dendrímeros. Para ello los sueros de los animales fueron evaluados mediante un ELISA captura viral para los isotipos IgG1 e IgG2 específico contra VFA O1Campos, desarrollado en el laboratorio.

En ambos grupos, el isotipo detectado predominantemente durante todo el experimento en el suero de los animales fue IgG1 (Figura 4.4). Asimismo, los animales n°168 ($B_{(OUK)2}T_{3A}$) y n°166 ($B_{(OUK)4}T_{3A}$) desarrollaron niveles de IgG1 bajos luego de la primera inmunización y aumentaron luego de la segunda dosis de vacuna. Por otra parte, los niveles de IgG2 fueron bajos con valores promedios de $1,1 \pm 0,3$ y $1,9 \pm 0,7$ para los grupos $B_{(OUK)2}T_{3A}$ y $B_{(OUK)4}T_{3A}$, respectivamente, a los 38 dpv. Mientras, el grupo de animales inmunizados con vacuna comercial mostró un título promedio de $2,80 \pm 0,05$ para IgG2 y de $4,6 \pm 0,3$ para IgG1 específicos contra VFA O1Campos (dato no mostrado).



4.1.2.2 Evaluación de la inmunidad humoral en mucosa

Las IgA son anticuerpos esenciales en las mucosas para la defensa del organismo a agentes infecciosos. Sin embargo, una particularidad del sistema de mucosas de los bovinos es la presencia o, en el caso de las secreciones de algunas glándulas, la predominancia del isotipo IgG1. Debido a que la transmisión por aerosol es el mecanismo de dispersión más común para la FA en animales susceptibles, se estudiaron los anticuerpos IgA e IgG1 específicas contra VFA O1Campos, presentes en las secreciones nasales en los animales vacunados (Figura 4.5).

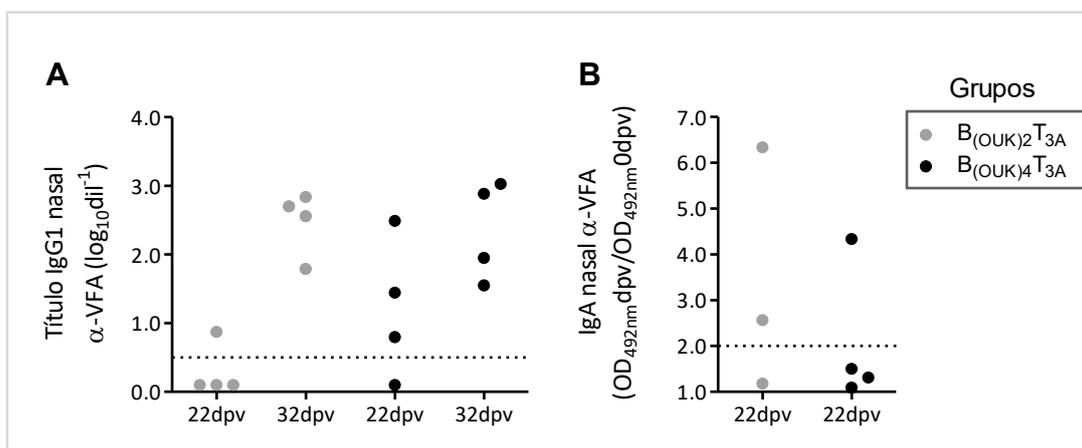


Figura 4.5 – Isotipos de los anticuerpos de mucosa nasal. Respuesta de mucosa de anticuerpos IgG1 e IgA α-VFA. Los hisopados nasales fueron colectados a los 22dpv y 32dpv. Cada punto representa el título de IgG1 (A) o nivel de IgA (B) nasal de cada animal. El corte fue establecido como la media de los títulos (IgG1) o valores (IgA) obtenidos en las secreciones de los animales negativos más 2 desvíos estándar (línea punteada).

A los 22 dpv, se observaron títulos positivos (título >0,5) de IgG1 en la secreciones nasales de los animales del grupo B(OUK)₄T_{3A} con excepción del animal n°166. En este tiempo los animales del grupo B(OUK)₂T_{3A} no presentan altos títulos de dicho serotipo a excepción del bovino n°170. Sin embargo, a los 32 dpv, todos los animales logran alcanzar títulos positivos y altos para IgG1 en las secreciones nasales. En cuanto a la IgA nasal, se observa que los animales n°44 y n°170 del grupo B(OUK)₂T_{3A} y el animal n°36 del grupo B(OUK)₄T_{3A} tienen altos niveles de IgA

Esto indica que las construcciones peptídicas serían capaces de inducir, no solo inmunidad sistémica, sino también de mucosa, detectable en fechas próximas al desafío.

4.1.2.3. Capacidad neutralizante de los anticuerpos séricos

Para evaluar la capacidad neutralizantes de los sueros de los animales vacunados, se utilizaron dos técnicas de detección: a) Ensayo clásico: seroneutralización de virus en dilución fija y suero variable y b) Ensayo alternativo: seroneutralización de virus variable y suero en dilución fija.

Como se observa en la Tabla 4.1, se determinaron los TNV de los sueros de los animales a los 32 dpv contra el virus homólogo O/UK 11/01. Se detectó, por medio del ensayo clásico de seroneutralización, un TNV promedio de $1,2 \pm 0,3$ y $1,3 \pm 0,3$ para $B_{(OUK)2}T_{3A}$ y $B_{(OUK)4}T_{3A}$ respectivamente. Sin embargo, no fue posible determinar un TNV para las 100 DICT₅₀ de la cepa viral heteróloga O1Campos, al ser posiblemente menor al umbral de detección de la técnica (TNV<0.9).

TABLA 4.1 – Títulos e índices de seroneutralización viral de los sueros de los animales vacunados con los péptidos $B_{(OUK)2}T_{3A}$ o $B_{(OUK)4}T_{3A}$ o vacuna comercial, a los 32 dpv y de los sueros de los animales negativos

Grupo	Animal	TNV ^a O/UK 11/01		TNV	IN ^b O1Campos	
		Individuales	Promedio	O1Campos Individuales	Individuales	Promedio
$B_{(OUK)2}T_{3A}$	n°44	1,65	1,2±0,3	<0,9	2,0	1,3±0,5
	n°170	1,20		<0,9	1,3	
	n°168	1,10		<0,9	0,8	
	n°169	0,90		<0,9	1,0	
$B_{(OUK)4}T_{3A}$	n°36	1,20	1,3±0,3	<0,9	1,3	1,8±0,7
	n°431	1,75		<0,9	2,7	
	n°164	1,10		<0,9	2,0	
	n°166	1,20		<0,9	1,3	
Vacuna comercial	n°692	NR	-	1,8	2,4	2,8±0,6
	n°700	NR		2,1	3,2	
	n°709	NR		1,6	3,2	
	n°710	NR		2,3	2,0	
	n°722	NR		2,8	3,4	
Negativo	n°167	<0,9	<0,9	<0,9	0	-
	n°997	<0,9		<0,9	0,3	

a) TNV: título de neutralización viral para VFA O/UK 11/01 o O1Campos a los 32dpv
b) IN: índice de neutralización viral (log₁₀) para VFA O1Campos

No obstante, se realizó un ensayo de neutralización que permite evidenciar si los anticuerpos tienen la capacidad de neutralizar unidades virales; es decir, si la presencia de una cierta dilución de suero interfiere en la infección del VFA *in vitro*, bajando de este modo la cantidad de virus presente en el ensayo. Con este ensayo alternativo de seroneutralización fue posible determinar un IN con valores promedios de $1,3 \pm 0,5$ para los animales del grupo $B_{(OUK)2}T_{3A}$ y $1,8 \pm 0,7$ para $B_{(OUK)4}T_{3A}$. Naturalmente, los sueros obtenidos previo a la inmunización con los péptidos (T=0) no mostraron un IN positivo.

Finalmente, se detectó un IN promedio de $2,8 \pm 0,6$ para el grupo de animales inmunizados con vacuna comercial.

Por otro lado, cuando los resultados fueron expresados en porcentaje de virus neutralizado por una dilución fija de suero (1/16) y ensayado en un rango de 1 DICT₅₀ a 1000 DICT₅₀ de VFA O1Campos, se obtuvieron valores promedios de $17 \pm 9\%$ de virus neutralizado en los animales del grupo B_{(OUK)2}T_{3A} y $27 \pm 11\%$ para los sueros de los animales del grupo B_{(OUK)4}T_{3A} (Figura 4.6). Estos porcentajes son significativamente más altos que los detectados con los sueros negativos. Para los animales inmunizados con la vacuna comercial, el promedio del porcentaje de neutralización viral de sus sueros fue de $43 \pm 10\%$.

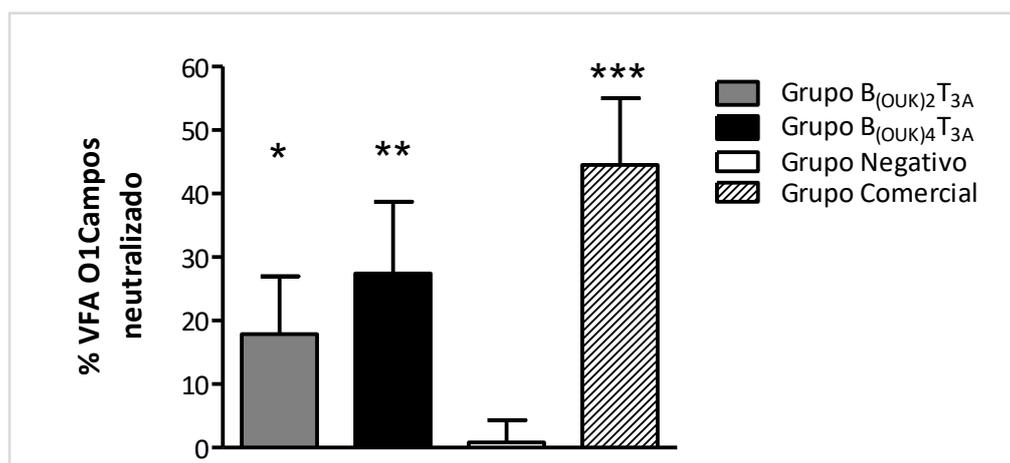


Figura 4.6 – Neutralización de VFA O1Campos por sueros de animales vacunados. Porcentaje de neutralización viral por sueros de animales vacunados con los péptidos B_{(OUK)2}T_{3A}, B_{(OUK)4}T_{3A} o una dosis de vacuna comercial a los 38dpv. Una dilución de suero (1/8) fue incubada con diferentes diluciones de VFA O1Campos, y el virus remanente se tituló por el método de punto final 50%. Los títulos se expresan como % de virus neutralizado con respecto a la titulación viral sin suero. Diferencias significativas con respecto al grupo negativo se indican como ***($p < 0.001$), **($p < 0.01$) y *($p < 0.05$)

4.1.2.4 Evaluación de presencia de anticuerpos contra proteínas no estructurales

La detección de anticuerpos contra las NSP del VFA es utilizada para identificar animales infectados con algunos de los siete serotipos del virus, independientemente de que el animal haya sido inmunizado, ya que la vacuna está libre de dichas proteínas. Por lo tanto, se realizó el ensayo de ELISA comercial *PrioCHECK® FMDV NS Antibody*, con el fin de corroborar que los animales podían ser diferenciados de animales infectados al carecer de anticuerpos frente a la proteína 3ABC, antígeno presente en el kit de ELISA.

Efectivamente, los sueros de los animales a los 38 dpv, tuvieron una IP menor al 50%; por ello se consideran negativos de infección, pudiendo ser diferenciados de animales infectados con el VFA.

4.1.3. Evaluación de la respuesta inmunitaria celular inducida por los péptidos dendriméricos

Con el fin de estudiar la respuesta inmunitaria celular específica inducida por las vacunas, se extrajeron CMNs y se re estimularon *in vitro* con antígeno viral inactivado y purificado (VFAi O1Campos), con los péptidos tanto lineales como dendriméricos y luego se midió la respuesta linfoproliferativa y la producción de IFN- γ .

4.1.3.1 Evaluación de la proliferación de linfocitos de memoria a los 38 dpv

Para el ensayo de linfoproliferación, se midió la incorporación de timidina tritiada (^3H -timidina) luego de la estimulación antígeno específica (Tabla 4.2). La respuesta linfoproliferativa en general fue poco homogénea entre los animales ya que no todos fueron capaces de responder frente a los diferentes estímulos.

TABLA 4.2 – Respuesta linfoproliferativa de las CMNs provenientes de animales vacunados

Grupo	Animal	IE (cpm Ag / cpm medio)				
		Antígenos				
		B _{(OUK)2} T _{3A}	B _{(OUK)4} T _{3A}	Epitope T _{3A}	Epitope B _(OUK)	VFAi
B _{(OUK)2} T _{3A}	n°44	<u>56,0</u>	<u>39,6</u>	<u>4,0</u>	0,8	1,1
	n°170	<u>3,0</u>	<u>5,2</u>	1,0	<u>3,3</u>	1,2
	n°168	1,4	1,8	1,1	1,3	1,1
	n°169	2,0	1,9	0,9	1,8	1,5
B _{(OUK)4} T _{3A}	n°36	<u>2,5</u>	<u>3,6</u>	<u>2,3</u>	17	1,4
	n°431	<u>3,5</u>	1,6	1,0	1,4	1,2
	n°164	<u>4,2</u>	<u>7,3</u>	1,4	1,3	1,8
	n°166	<u>4,0</u>	<u>5,7</u>	0,8	1,3	1,3
Vacuna comercial	n°692	<u>2,9</u>	<u>2,5</u>	2,0	0,6	<u>3,2</u>
	n°700	1,4	2,0	1,2	0,3	1,6
	n°709	1,5	1,9	1,2	1,2	<u>4,1</u>
	n°710	1,2	1,4	0,9	0,9	0,9
	n°722	0,7	0,7	0,7	0,5	<u>2,8</u>
Negativo	n°167	1,0	0,7	1,0	1,0	1,0
	n°997	1,0	1,4	0,9	1,2	0,9

Linfoproliferación de CMNs de animales vacunados (38 dpv) determinado por incorporación de ³H-timidina. Los resultados son expresados en Índice de Estimulación (IE). Las CMNs son estimuladas *in vitro* con péptidos dendriméricos Ag-B_{(OUK)2}T_{3A}, Ag-B_{(OUK)4}T_{3A}, los péptidos lineales Ag-epitope T_{3A}, Ag-epitope B_(OUK) y iVFA O1Campos. Control de proliferación basal = medio, control positivo = Concanavalina A. La radiactividad se midió con un contador de centelleo. El IE fue calculado como: cpm de cada antígeno/ cpm proliferación basal. Valores de IE >2 son considerados positivos

Antes del desafío, a los 38 dpv, se detectaron valores significativos de linfoproliferación (IE>2) tanto frente a los péptidos usados en la inmunización para cada grupo experimental, como para el otro péptido dendrimérico de distinta valencia. En el grupo B_{(OUK)2}T_{3A}, 2 animales de 4 mostraron linfoproliferación positiva al enfrentar a las CMNs con los péptidos dendriméricos (B_{(OUK)2}T_{3A} o B_{(OUK)4}T_{3A}). Para el grupo B_{(OUK)4}T_{3A}, 4 de 4 animales mostraron valores significativos de IE frente dichos péptidos dendriméricos. Por lo tanto, no se vió diferencia en el número de animales respondedores según el péptido dendrimérico utilizado como antígeno; sin embargo, si se observó un menor número de animales respondedores a los péptidos lineales. En el grupo B_{(OUK)2}T_{3A}, las CMNs del animal n°44 proliferaron significativamente frente al Ag-epitope T_{3A}, mientras que para el Ag-epitope B_(OUK), sólo lo hicieron las CMNs del animal n°170. Por otra parte, los animales n°168 y n°169 no mostraron respuesta positiva frente a ningún estímulo, a excepción del mitógeno. En el grupo B_{(OUK)4}T_{3A}, sólo el animal

n°36 mostró proliferación en sus CMNs cuando fueron estimuladas con Ag-epitopeT_{3A}. Bajo estas condiciones experimentales, ningún animal mostró respuesta positiva frente al re estímulo con VFAi (IE<2). Las CMNs de los animales controles (Tabla 4.2) y de todos los animales a los 0 dpv no mostraron respuesta a ningún estímulo peptídico (data no mostrada). En el grupo inmunizado con vacuna comercial, 3 de 5 animales mostraron proliferación positiva frente a VFAi O1Campos y solo 1 frente al Ag-B_{(OUK)2}T_{3A}.

4.1.3.2 Evaluación de la secreción de IFN- γ por parte de las CMNs de los animales vacunados

Como ha sido reportado, el IFN- γ estimula la expresión de las moléculas del CMH de clase I y II en las CPA e inhibe eficientemente la replicación del VFA (Zhang et al., 2002). Por lo tanto, se midió la secreción IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo de las CMNs estimuladas, por un ELISA captura para dicha citoquina (Tabla 4.3).

TABLA 4.3 – Secreción de IFN- γ de las CMNs aisladas de sangre periférica de animales vacunados a los 38 dpv

Grupo	Animal	IFN- γ (ng/ml)					
		Medio	Antígenos				
			B _{(OUK)2} T _{3A}	B _{(OUK)4} T _{3A}	Epitope T _{3A}	Epitope B _(OUK)	VFAi
B _{(OUK)2} T _{3A}	n°44	0,78	<u>5,78</u>	<u>7,62</u>	<u>6,14</u>	<u>3,57</u>	0,71
	n°170	1,40	<u>3,21</u>	<u>3,02</u>	1,24	<u>3,67</u>	1,13
	n°168	<u>1,93</u>	<u>1,73</u>	1,32	1,18	1,32	1,33
	n°169	1,23	1,40	1,46	1,50	<u>1,63</u>	<u>1,79</u>
B _{(OUK)4} T _{3A}	n°36	<u>28,7</u>	<u>36,0</u>	<u>16,0</u>	<u>27,9</u>	<u>3,98</u>	<u>2,81</u>
	n°431	<u>32,8</u>	<u>15,7</u>	<u>54,0</u>	<u>34,0</u>	<u>5,46</u>	<u>3,50</u>
	n°164	<u>33,9</u>	<u>24,2</u>	<u>40,0</u>	<u>31,2</u>	<u>4,60</u>	<u>3,78</u>
	n°166	7,9	6,0	6,5	6,8	0,98	0,68
Vacuna comercial	n°692	<u>5,16</u>	<u>3,04</u>	<u>1,98</u>	1,16	<u>3,45</u>	<u>36,1</u>
	n°700	0,74	0,76	0,74	0,71	0,83	7,5
	n°709	<u>2,43</u>	<u>4,42</u>	<u>3,61</u>	<u>2,58</u>	<u>5,12</u>	<u>44,2</u>
	n°710	<u>1,69</u>	1,43	1,37	<u>1,80</u>	1,45	<u>15,9</u>
	n°722	0,73	0,73	0,65	0,94	<u>2,06</u>	6,9
Negativo	n°167	0,84	0,52	0,65	0,72	1,34	0,61
	n°997	0,96	1,20	1,40	1,33	1,54	1,48

Secreción de IFN- γ por las CMNs de los animales vacunados luego de la estimulación *in vitro*. Los sobrenadantes de 72hs de incubación fueron testeados por ELISA captura para la citoquina mencionada. Los resultados fueron expresados en ng/ml, interpolando DO de los sobrenadantes en una curva estándar realizada con la citoquina recombinante. El sitio de corte fue calculado como el promedio de la secreción de IFN- γ por las CMNs de los animales a los 0 dpv más 2 desvíos estándar. La secreción de IFN- γ considerado positivo se encuentra subrayado (≥ 1.5 ng/ml)

A los 38 dpv, los animales n°44 y n°170 ($B_{(OUK)2}T_{3A}$) y los bovinos n°36, n°164 y n°431 ($B_{(OUK)4}T_{3A}$) mostraron altos niveles de IFN- γ comparado con sus niveles pre-immunización (0 dpv, datos no mostrados) cuando las CMNs fueron estimuladas con los péptidos dendriméricos. Sin embargo, las células de los animales del grupo $B_{(OUK)4}T_{3A}$ también secretaron IFN- γ incluso sin estimulación con antígenos; mientras que, los animales n°44 y n°170 del grupo $B_{(OUK)2}T_{3A}$ mostraron una secreción específica frente a la re estimulación con los péptidos dendriméricos; más aún, el animal n°44 también mostro secreción específica en presencia del Ag-epitope T_{3A} y Ag-epitope $B_{(OUK)}$, al igual que el animal n°170 para este último péptido lineal. Por otro lado, los bovinos n°169 ($B_{(OUK)2}T_{3A}$) y n°166 ($B_{(OUK)4}T_{3A}$) no mostraron secreción de IFN- γ por arriba del nivel basal y fueron considerados no respondedores. El animal n°168 ($B_{(OUK)2}T_{3A}$) sólo mostró secreción, aunque baja, con Ag- $B_{(OUK)2}T_{3A}$ pero se observaron niveles similares en el sobrenadante con medio. Con respecto al grupo vacuna comercial, se observó que todos los animales mostraron niveles de secreción IFN- γ específicos contra VFA, al comparar con sus respectivos niveles de IFN- γ sin antígeno.

Finalmente, todos los animales mostraron altos niveles tanto para linfoproliferación (valor promedio de IE: 275) como para secreción de IFN- γ (valor promedio: 75 ng/ml) al enfrentar sus células con el mitogéno, concanavalina A, utilizado como control positivo.

4.1.4. Evaluación de protección frente al desafío con VFA O1Campos en bovinos vacunados con los péptidos dendriméricos $B_{(OUK)2}T_{3A}$ o $B_{(OUK)4}T_{3A}$

Si bien la capacidad neutralizante de los sueros de los animales vacunados no fue muy elevada, esta reportado que animales con respuestas humorales bajas resultan protegidos al desafío viral (McCullough et al., 1992a) Por lo tanto, se decidió realizar el desafío viral. Por ello, a los 42 dpv los animales fueron infectados experimentalmente por instilación nasal con VFA infeccioso O1Campos con una dosis de 10000 DL50. Luego,

los animales fueron monitoreados a partir del segundo día post-infección (2dpi) hasta el final del experimento, 7dpi, con el propósito de registrar la aparición de síntomas y signos de la enfermedad (Tabla 4.4). El registro de los síntomas se realizó en base de un puntaje clínico, otorgándole la clasificación de PGP, protegido a la generalización podal, a todo animal que no presentase lesión en sus patas a lo largo del monitoreo; PP, protegido parcial, si la aparición de síntomas se encontraba retrasada con respecto a la correspondiente aparición en los animales controles; y NP, no protegidos, si la sintomatología era equivalente a la presentada por el grupo no vacunado (grupo negativo).

TABLA 4.4 –Puntaje clínico y protección de los animales vacunados con los péptidos dendriméricos $B_{(OUK)2}T_{3A}$ o $B_{(OUK)4}T_{3A}$ luego del desafío viral.

Grupo	Animal	Puntaje clínico ^a /Protección ^b												
		2dpi			3dpi			4dpi			7dpi			CP
		F(°C)	L	P	F(°C)	L	P	F(°C)	L	P	F(°C)	L	P	
$B_{(OUK)2}T_{3A}$	n°44	38.1	0	0	37.9	0	0	38.3	0	0	39.4	1	0	PGP
	n°170	37.6	0	0	37.8	0	0	37.9	0	0	38.9	1	4	PP
	n°168	38.3	0	0	40.3	0	0	39.6	1	3	39.5	1	4	NP
	n°169	39.4	0	0	38.5	0	0	41.1	0	2	39.5	1	4	NP
$B_{(OUK)4}T_{3A}$	n°36	38.1	0	0	38.8	0	0	39.4	0	0	40.2	1	0	PGP
	n°431	40.6	0	0	39.8	0	0	39.5	0	0	39.0	1	3	PP
	n°164	39.3	0	0	39.3	0	0	40.8	1	1	39.2	1	3	NP
	n°166	38.1	0	0	40.3	0	4	39.1	1	4	39.1	1	4	NP
Negativo	n°167	39.0	0	0	40.0	0	0	39.8	1	2	39.2	1	4	NP
	n°997	39.5	0	0	40.7	1	3	39.3	1	3	39.8	1	4	NP

a) Puntaje clínico luego del desafío (dpi; días post infección) determinado como número de patas con lesiones y la presencia de vesícula en lengua o cavidad oral

(F) Detección de temperatura rectal, fiebre mayor a 39,5°C

(L) Lesión en lengua y/o oronasal (presencia de lesión=1 ausencia=0)

(P) Lesión en patas (1 punto por cada pata afectada)

b) (CP) Clasificación de protección luego de revisión exhaustiva el día de la necropsia (7dpi)

(PGP) Animales con ninguna lesión en las patas se consideran protegidos a la generalización podal.

(PP) Animales con un retraso en la aparición de signos de la enfermedad se consideran parcialmente protegidos

(NP) Animales con lesiones en las patas antes de los 7dpi se consideran no protegidos. Curso de la enfermedad equivalente al animal control negativo

Los animales n°44 ($B_{(OUK)2}T_{3A}$) y n°36 ($B_{(OUK)4}T_{3A}$) no mostraron lesiones en sus patas a lo largo de la observación clínica, y por ello son considerados PGP; sin embargo, si presentaron lesiones en la cavidad oral a los 7dpi. Conjuntamente, los animales n°170 ($B_{(OUK)2}T_{3A}$) y n°431 ($B_{(OUK)4}T_{3A}$) retrasaron la aparición de signos de la enfermedad en comparación con el curso normal de la misma establecido por las observaciones en los animales controles negativos. Estos animales fueron considerados protegidos parcialmente (PP), ya que las lesiones en las patas de los animales controles aparecen a los 3 y 4 dpi mientras que en estos animales no se les observan lesiones en esas fechas. Finalmente, los dos animales del grupo $B_{(OUK)2}T_{3A}$: n°168 y n°169, y los del grupo $B_{(OUK)4}T_{3A}$: n°164 y n°166, no estuvieron protegidos a la enfermedad ya que todos presentaron lesiones en las patas a los 4dpi al igual que los animales controles negativo.

4.1.5. Evaluación de secreción de IFN- γ post-desafío con VFA O1Campos

A fin de determinar la respuesta inmunitaria de memoria inducida en los animales vacunados luego del desafío, se evaluó la secreción de IFN- γ *in vitro* por las CMNs (Figura 4.7).

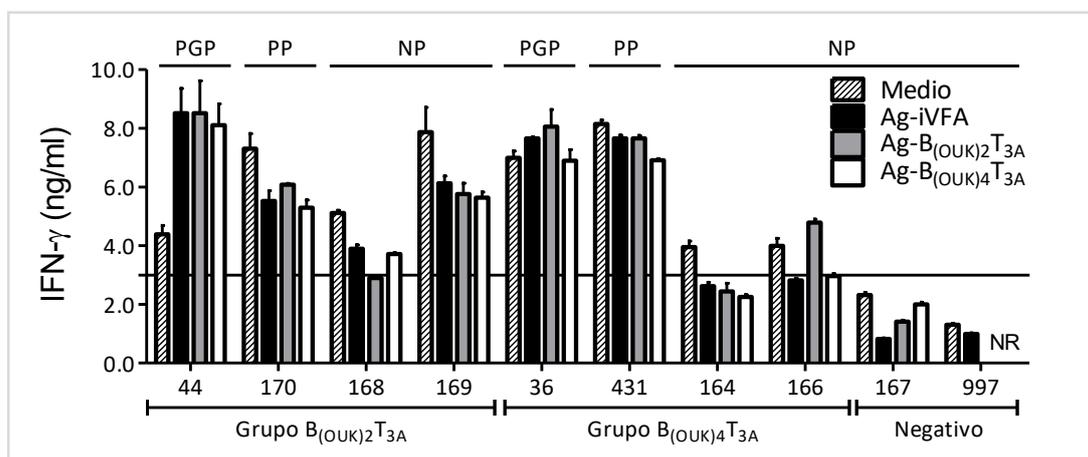


Figura 4.6 – Secreción de IFN- γ de las CMNs de los animales vacunados con los péptidos dendriméricos luego del desafío con VFA O1Campos (3dpi). Las CMNs se aislaron a los 3dpi, se reestimularon por 72h con el Ag- iVFA y los péptidos, Ag- $B_{(OUK)2}T_{3A}$ y Ag- $B_{(OUK)4}T_{3A}$. Los sobrenadantes se analizaron en un ELISA captura para detectar IFN- γ . Los resultados se expresaron en ng/ml por interpolación de curva estándar de la citoquina. (PGP) Protegidos a la generalización podal, (PP) Parcialmente protegidos y (NP) No protegidos. (Línea sólida) sitio de corte: valor promedio de IFN- γ de los sobrenadantes de las CMNs de los animales controles negativos más 2 desvíos estándar

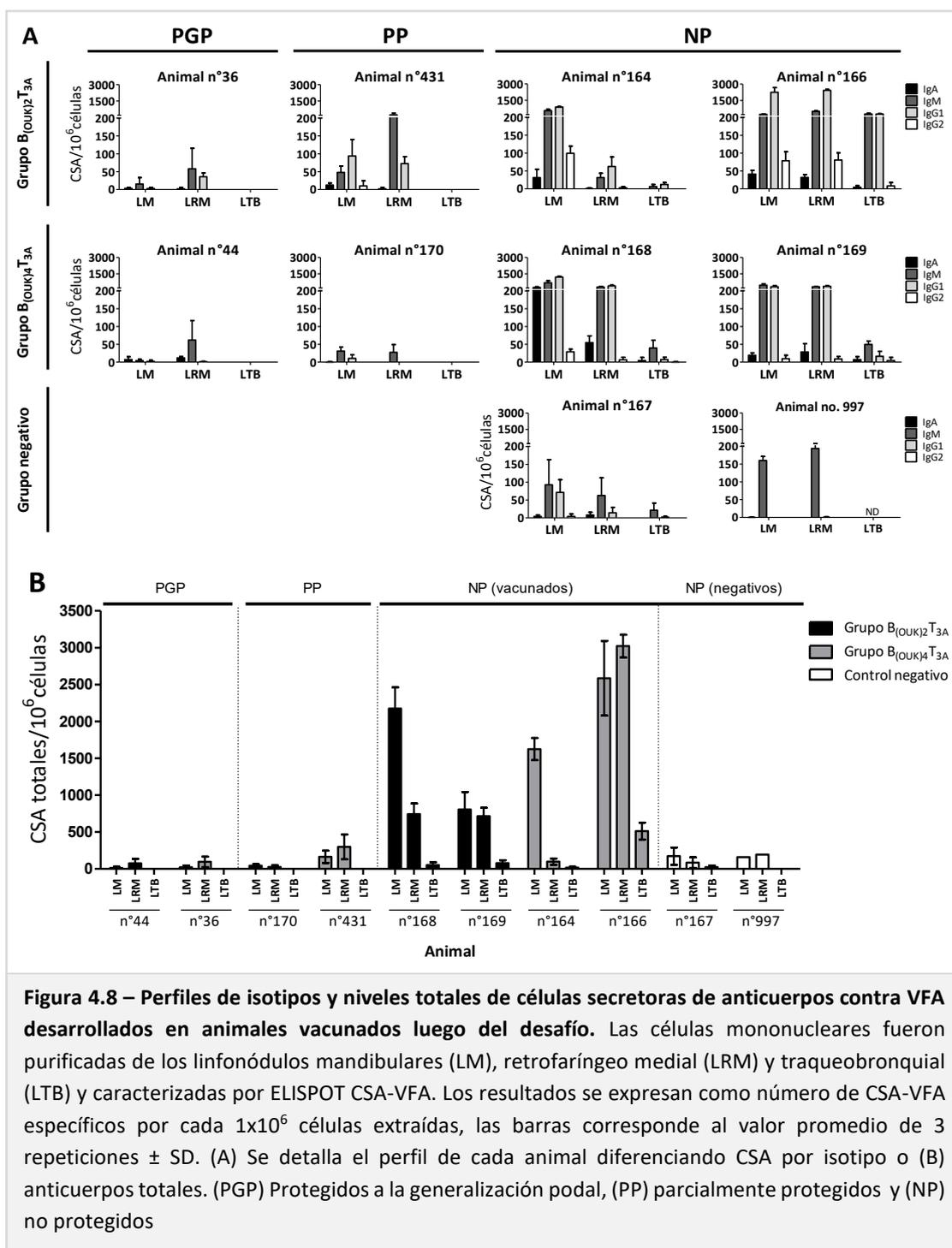
A los 3dpi, los animales PGP (nº44 y nº36) presentaron niveles de 7 a 9.3 ng/ml en los sobrenadante de las CMNs estimuladas con VFAi O1Campos, péptidos: B_{(OUK)2}T_{3A} y B_{(OUK)4}T_{3A}. Por otro lado, los animales PP (nº170 y nº431) mostraron altos niveles de IFN- γ aun sin antígeno. Finalmente los animales del grupo control negativo no mostraron altos niveles de IFN- γ , al igual que los animales vacunados NP (nº168, nº164 y nº166). Sorprendentemente el animal nº169 (NP) presentó altos niveles de la citoquina.

4.1.6. Presencia de células secretoras de anticuerpos (CSA) en órganos linfáticos

Con el propósito de estudiar más a fondo el estado inmunitario de los animales y evaluar si existían otras diferencias entre los animales luego del desafío, se decidió estudiar el perfil de células secretoras de anticuerpos (CSA) en diferentes órganos linfáticos de los bovinos. El VFA naturalmente suele ingresar por la vía respiratoria de los bovinos y en la infección experimental elegida se simula dicha entrada; por lo tanto, el VFA replicará preferentemente en el paladar blando y tejido de la faringe. Por lo tanto, se estudió si existía diferencia en la magnitud de la respuesta humoral entre los animales vacunados a lo largo de diferentes sitios de la vía respiratoria.

A los 7dpi, finalizado el monitoreo clínico, se realizó la eutanasia y necropsia de los animales. Entonces, para estudiar la respuesta inmunitaria a lo largo del tracto respiratorio, se disecaron distintos ganglios basándonos en reportes previos, donde se destacan los linfonódulos mandibular (LM), retrofaríngeo medial (LRM) y traqueobronquial (LTB) como los órganos más reactivos (Pega et al., 2013) y drenantes de las principales zonas de replicación del VFA (Pacheco et al., 2010).

Se aislaron células mononucleares de los macerados de los ganglios de cada animal y se le realizó el ensayo de ELISPOT CSA-VFA. Los resultados mostraron tres perfiles distintos de respuesta que ajustan con el estado de protección establecido para cada animal (Figura 4.8).



En general, los animales PGP y PP presentaron bajos niveles de CSA en LM y LRM, con excepción del animal n°431, aunque en esta respuesta predomina una respuesta primaria (IgM). El órgano linfoide del tracto respiratorio inferior (LTB), es decir el que se encuentra más profundo en la vía de entrada del virus, no mostró CSA específicas contra el VFA en ninguno de los animales PGP o PP (Figura 4.8A).

Cuando se estudiaron las CSA-VFA de los animales vacunados y NP, se observó una respuesta elevada tanto primaria (IgM) como secundaria de anticuerpos, siendo el isotipo predominante de esta última IgG1 en los LMs y LRMs, con excepción del animal n°164, que tiene una respuesta baja en LRM. Asimismo, estos animales mostraron una respuesta, aunque baja, en sus LTBs tanto de IgM como IgG1. Cabe destacar, que el animal n°166, que presento signos de la enfermedad antes que uno de los animales controles, mostró altos niveles de CSA-VFA IgM e IgG1 en todos los linfonódulos tanto del tracto superior como inferior. En cuanto a la CSA-VFA IgA, estos animales (NP) mostraron niveles detectables de este isotipo en alguno de los ganglios; especialmente el animal n°168 mostró altos niveles (CSA-VFA IgA>200) en LM, mientras que en los animales restantes los niveles fueron más bajos (CSA-VFA IgA<50). Finalmente, CSA-VFA IgG2 fueron detectadas a este tiempo en los LMs, pero con valores entre 10 y 80 veces menores que los alcanzados por CSA-VFA IgG1.

En los animal negativo n°167 y n°997, se detectaron CSA-VFA en todos los ganglios, aunque los niveles alcanzados fueron entre 10 y 30 veces menores que los encontrados en los animales vacunados NP; y el isotipo predominante fue el IgM, seguido por el isotipo IgG1.

Cuando se calculó las CSA-VFA totales (Figura 4.8B), se destacó que los animales vacunados pero NP son aquellos con las respuestas más pronunciadas de CSA-VFA y detectables a lo largo de todo el tracto respiratorio. Por su lado, los animal controles n°167 y n°997 también mostraron respuesta en todos los ganglios procesados, pero el nivel de respuesta fue menor. Mientras que los animales con un estado protector favorecido no mostraron respuesta en el órgano del tracto respiratorio inferior y las respuestas detectadas en los ganglios del tracto superior mostraron bajos niveles (CSA-VFA<500).

4.2. NUEVOS PÉPTIDOS DENDRIMÉRICOS

4.2.1. Alternativas para mejoramiento de un nuevo péptido dendrimérico

Los resultados anteriores mostraron que los péptidos $B_{(OUK)_2}T_{3A}$ y $B_{(OUK)_4}T_{3A}$ fueron capaces de inducir una respuesta inmunitaria específica contra VFA O1Campos, aunque la protección lograda fue solo parcial. Para mejorar esta estrategia vacunal, se generaron nuevos péptidos con epitopes B específicos de O1Campos, se seleccionó un epitope T descrito anteriormente para bovino y se llevó a cabo una tercer dosis de vacuna para (Experimento 2).

En primer lugar, los nuevos péptidos dendrímeros $B_{(O1C)_2}T_{VP1}$ y $B_{(O1C)_4}T_{VP1}$ se diseñaron exhibiendo un epitope T previamente reportado como inmunodominante en bovino (Collen et al., 1991) unido a dos o cuatro epitopes B, respectivamente, basados en la secuencia de la proteína VP1 de VFA O1 Campos. Y en segundo lugar, se evaluó antes del desafío de los animales si era necesaria una tercera inmunización.

4.2.2. Diseño y síntesis de los nuevos péptidos dendriméricos

Estudios realizados con anterioridad en nuestro grupo de investigación permitieron confirmar que la secuencia 135-160 de la proteína VP1 inducía anticuerpos neutralizantes y respuesta celular en los animales vacunados con el péptido (Zamorano et al., 1994; Zamorano et al., 1998). Sin embargo, estas respuestas no logran ser protectoras al momento del desafío viral. Por lo tanto, este trabajo se basa en modificar la estrategia de presentación de este péptido al sistema inmunitario, a través de la inclusión de este epitope B en un péptido dendrimérico, y que contenga a su vez un epitope T capaz de inducir una respuesta colaboradora eficiente en la especie bovina.

La estructura general de los péptidos dendriméricos sintetizados y utilizados como inmunógenos en este Experimento 2, se detallan en la Tabla 3.2. Estas construcciones se diseñaron para presentar en una sola molécula, dos o cuatro copias del epitope B

que abarca los residuos 135-160 de la VP1 de O1Campos, unidas al extremo N-terminal del epítopo T colaborador descrito como inmunodominante en bovinos que comprende los residuos 21-40 de la VP1 (Collen et al., 1991).

La formulación de las vacunas del Experimento 2 se realizó bajo el mismo procedimiento que en el Experimento 1.

4.3. EVALUACIÓN DE INMUNIDAD INDUCIDA EN BOVINOS CON NUEVOS PÉPTIDOS DENDRIMÉRICOS (Experimento 2)

4.3.1 Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral inducida por los nuevos péptidos dendriméricos

Al igual que en el apartado 4.1.2 se estudiaron los niveles de los anticuerpos séricos de los animales vacunados (Figura 4.9). Por un lado, se empleó un ELISA indirecto utilizando a $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ como antígeno, el que reveló que todos los animales desarrollaron una respuesta pronunciada y específica de IgGs α -dendrímico capaz de reconocer a la cápside del VFA.

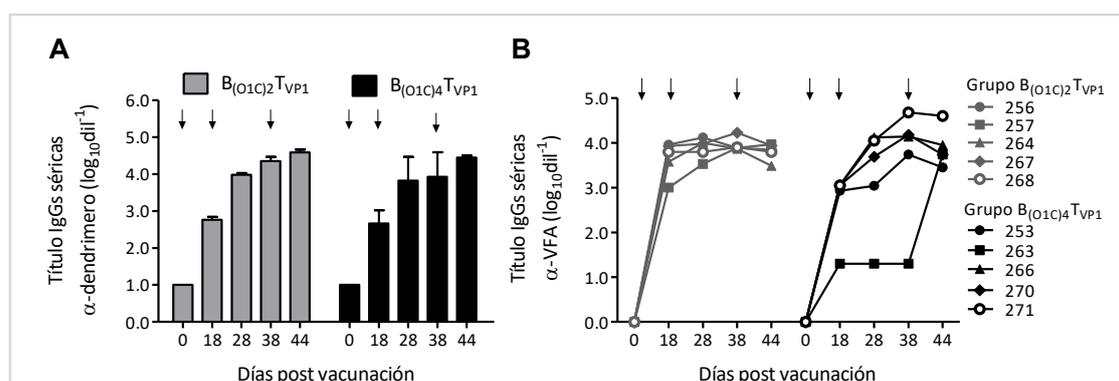
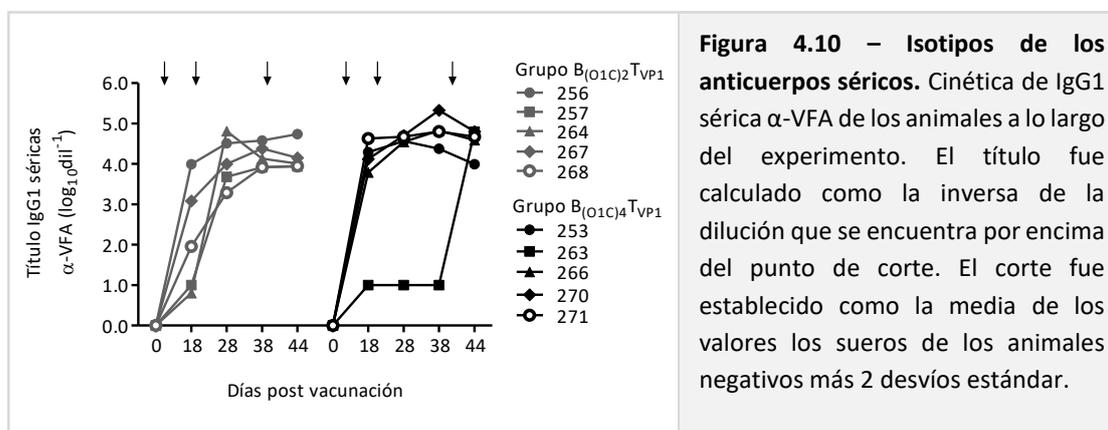


Figura 4.9 – Títulos de IgGs séricas α -dendrímico o α -VFA de los animales vacunados con los nuevos péptidos en diferentes tiempos del experimento. Los títulos fueron obtenidos usando un ELISA indirecto o captura respectivamente. (A) Título promedio de IgGs α -dendrímico medidos por ELISA usando a $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ como antígeno. (B) Cinética de títulos de IgGs séricas α -VFA de cada animal. Las flechas indican el tiempo de vacunación (0, 18 y 38 días) con las vacunas $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ o $B_{(O1C)4}T_{VP1}$. Los títulos fueron calculados como \log_{10} de la inversa de la última dilución por arriba del corte. El corte se estableció como la media de los valores de DO de los animales seronegativos más 2 desvíos estándar.

A partir de la primer inmunización, se detectan en todos los animales altos títulos de anticuerpos contra VFA, a excepción del animal nº263 que recién a partir de la tercer vacunación se detectan anticuerpos contra el péptido dendrimérico y que son capaces de reconocer a O1Campos (Figura 4.9B). A los 44 dpv, se detectaron altos títulos de IgGs α -VFA siendo, 3.9 ± 0.1 en el grupo $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ y 4.0 ± 0.2 en el grupo $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ los títulos promedios.

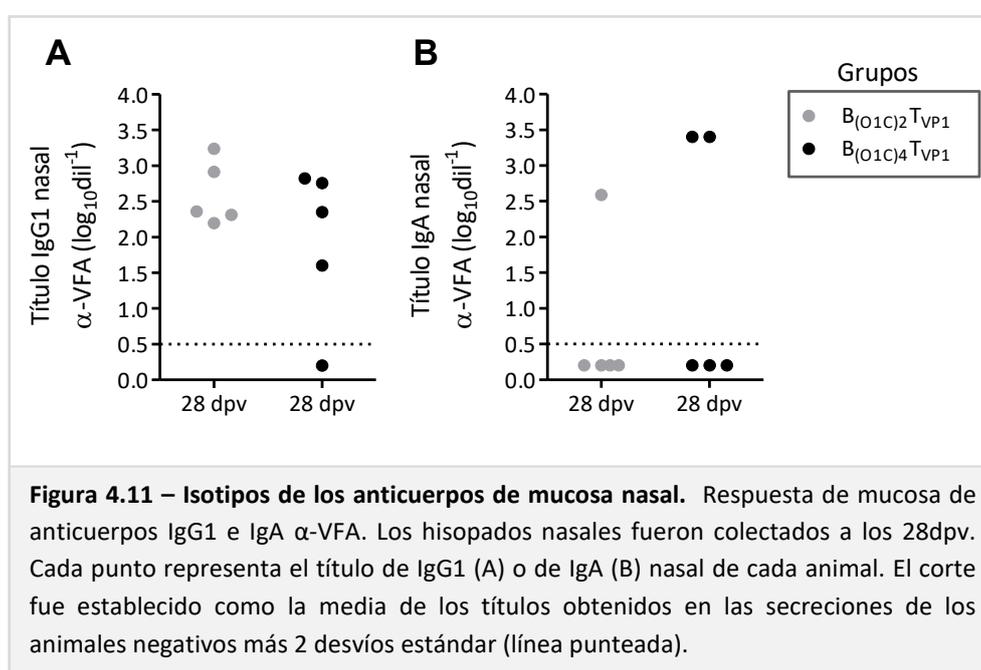
4.3.1.1. Evaluación de los isotipos de anticuerpos inducidos

En cuanto al perfil de isotipos de anticuerpos séricos, nuevamente fue detectado predominantemente el isotipo IgG1 a lo largo del experimento, con niveles bajos de IgG2 siendo el valor promedio de este último isotipo a los 44 dpv, de $1,4 \pm 0,3$ y de $1,5 \pm 0,4$ para los grupos $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ y $B_{(O1C)4}T_{VP1}$, respectivamente. Todos los animales desarrollaron niveles altos de IgG1 luego de la segunda inmunización con excepción del animal nº263. En este caso puntual, una tercera dosis fue suficiente para incrementar los niveles de IgG1 a valores similares a los de los otros animales (Figura 4.10).



4.3.1.2. Evaluación de la inmunidad humoral en mucosa

Por otro lado, en las secreciones nasales de los animales vacunados de ambos grupos, fueron detectados altos niveles del isotipo IgG1 a los 28 dpv (Figura 4.11), y al igual que en el caso de los anticuerpos séricos, el animal n°263 sólo logra alcanzar niveles altos de este isotipo en la secreción luego de la tercer dosis de vacuna (44 dpv, dato no graficado). Cuando se midió el nivel de IgA en las secreciones, 1 de 5 animales en el grupo $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ y 2 de 5 en el grupo $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ mostraron títulos de anticuerpos de este isotipo contra la cápside viral.



4.3.1.3. Capacidad neutralizante de los anticuerpos séricos

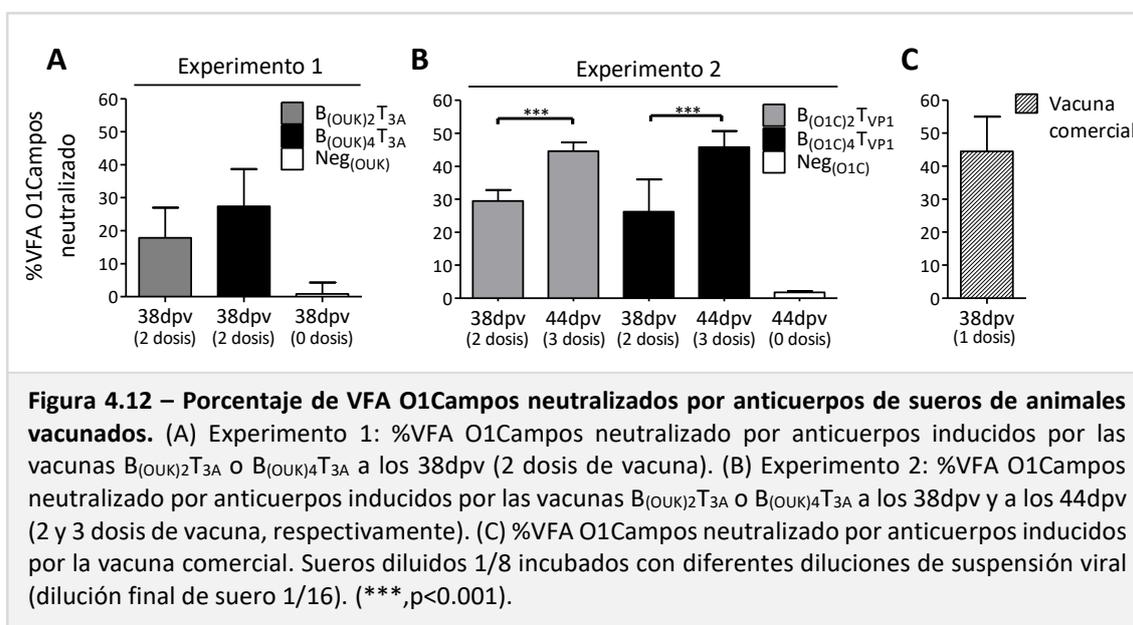
Cabe remarcar que los TNV de los sueros de todos los animales vacunados a los 38 dpv, es decir antes de la tercera inmunización, eran negativos ($TNV < 0.9$). Los anticuerpos generados por las dos inmunizaciones de las vacunas no eran capaces de generar anticuerpos de calidad para neutralizar $100DICT_{50}$ de VFA O1Campos. Por ello, y con el propósito de evaluar si es necesaria una tercera dosis, es que se realiza una evaluación comparativa entre los dos experimentos.

4.3.1.4. Evaluación comparativa de calidad de anticuerpos entre Experimento 1 y Experimento 2

En ambos experimentos, a los 38 dpv, los anticuerpos séricos α -VFA generados por las vacunas no lograban neutralizar 100DICT₅₀ del VFA O1Campos. Por lo tanto, se realizó el ensayo alternativo para detectar la capacidad de neutralizar unidades virales de los sueros de los animales del Experimento 2.

Como se puede observar, en el Experimento 1 el porcentaje promedio de neutralización del VFA fue 17 ± 9 % para los sueros de los animales del grupo B_{(OUK)2}T_{3A} y 27 ± 11 % en sueros de los animales pertenecientes al grupo B_{(OUK)4}T_{3A} luego de dos inmunizaciones a los 38 dpv, y sin diferencia significativas entre dichos grupos (Figura 4.10A), pero sí las hay con respecto a los sueros controles negativos.

En el Experimento 2, análogamente se observa que luego de dos inmunizaciones, a los 38 dpv, los porcentajes de neutralización promedios son similares al Experimento 1, siendo 29 ± 3 % de VFA neutralizado para los sueros del grupo B_{(O1C)2}T_{VP1} y 26 ± 10 % en los sueros del grupo B_{(O1C)4}T_{VP1} (Figura 4.12).



Por lo tanto, la falta de TNV y los bajos porcentajes de neutralización viral en los animales, comparables en ambos experimentos, sugirieron la aplicación de una tercera

dosis de vacuna en el Experimento 2, con el objetivo de mejorar la capacidad neutralizante de los anticuerpos de los animales inmunizados.

Exitosamente, la capacidad neutralizante de los sueros aumentó significativamente a los 44 dpv luego de la tercer vacunación (Figura 4.10B), porcentajes comparables con los obtenidos cuando el ensayo se realizó con sueros de animales que recibieron vacuna comercial (Figura 4.10C). Adicionalmente, antes del desafío se realizó un ensayo para calcular los TNVs de cada animal y evaluar si estos sueros eran capaces de neutralizar las 100DICT₅₀ luego de la tercera vacunación.

Como se observa en la Tabla 4.5, a los 32 dpv los sueros de los animales presentaron un IN promedio de $1,5 \pm 0,2$ para el grupo B_{(O1C)2}T_{VP1} y $1,3 \pm 0,3$ para B_{(O1C)2}T_{VP1}, pero los TNV fueron negativos. Sin embargo, a los 44 dpv, todos los animales mostraron TNV distintos pero positivos (>1.2) (OIE, 2017) contra VFA O1Campos (Tabla 4.8), y a su vez el título promedio del grupo B_{(O1C)4}T_{VP1}, $1,7 \pm 0,3$, fue significativamente mayor que el título promedio de los animales del grupo B_{(O1C)2}T_{VP1}, $1,38 \pm 0,05$.

TABLA 4.5 – Títulos e índices de seroneutralización viral de los animales vacunados con los péptidos B_{(O1C)2}T_{VP1} o B_{(O1C)4}T_{VP1}

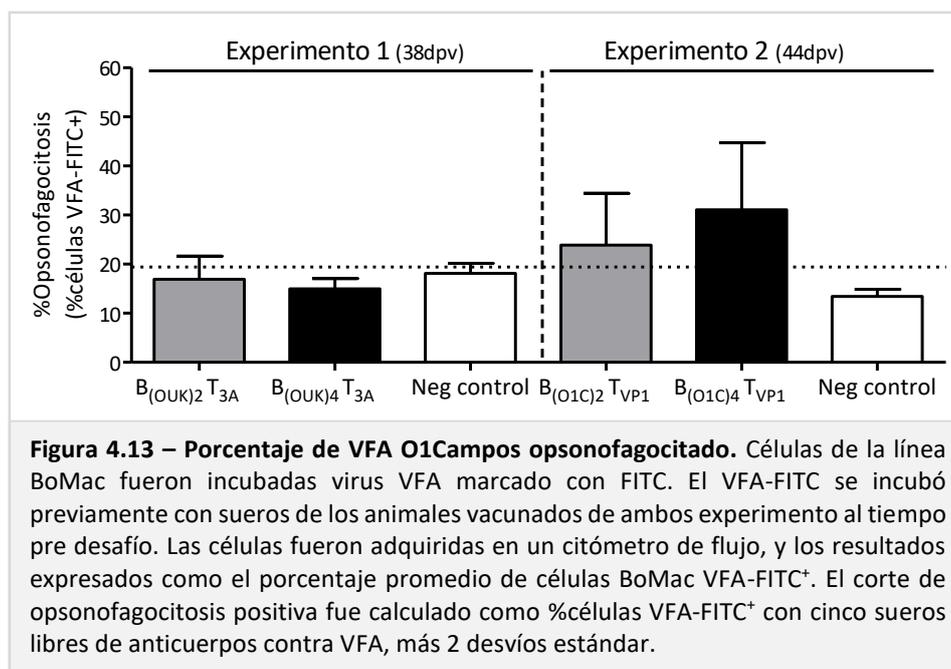
Grupo	Animal	IN ^a (32 dpv) O1Campos		TVN ^b (32 dpv) O1Campos	TVN (44 dpv) O1Campos	
		Individuales	Promedio	Individuales	Individuales	Promedio
B _{(O1C)2} T _{VP1}	n°256	1,50	1,5±0,2	<0,9	1,35	1,38±0,05
	n°257	1,33		<0,9	1,40	
	n°264	1,33		<0,9	1,30	
	n°267	1,67		<0,9	1,40	
	n°268	1,77		<0,9	1,43	
B _{(O1C)4} T _{VP1}	n°253	1,50	1,3±0,5	<0,9	1,20	1,7±0,3
	n°263	0,30		<0,9	1,65	
	n°266	1,67		<0,9	1,80	
	n°270	1,50		<0,9	2,00	
	n°271	1,67		<0,9	1,97	
Negativos	n°254	0,00	-	<0,9	<0,9	<0,9
	n°261	0,30		<0,9	<0,9	

a) IN: índice de neutralización viral (log₁₀) para VFA O1Campos
b) TNV: título de neutralización viral para O1Campos a los 32 dpv o 44 dpv

4.3.1.5. Capacidad opsonizante de los anticuerpos inducidos por los péptidos dendriméricos

Existen otras características, además de la capacidad neutralizante, que son importantes al momento de evaluar la competencia de eliminar el VFA en los animales vacunados. A pesar de ser los anticuerpos neutralizantes claves para resolver la infección, existen reportes que indican que la importancia de los anticuerpos tal vez radica en la habilidad de opsonizar más que de neutralizar las cápsides. Los macrófagos poseen una alta capacidad fagocítica y se ha reportado que pueden fagocitar y destruir al VFA, especialmente cuando está opsonizado por anticuerpos específicos (Quattrocchi et al., 2011; Quattrocchi et al., 2014). Entonces, para evaluar la capacidad de opsonizar la cápside del VFA se realizó un estudio de opsonofagocitosis al tiempo pre-desafío de ambos experimentos.

En el Experimento 1, al tiempo predesafío (38 dpv), el porcentaje promedio de opsonofagocitosis fue de $17 \pm 5\%$ en muestras de animales del grupo $B_{(OUK)2}T_{3A}$ y $15 \pm 2\%$ para los animales del grupo $B_{(OUK)4}T_{3A}$. Los niveles de opsonofagocitosis hallados fueron similares a los encontrados cuando se utilizó para el ensayo los sueros de los animales controles negativos ($18 \pm 2\%$). Sin embargo, en el Experimento 2, a los 44 dpv, los niveles promedios de opsonofagocitosis fueron mayores que en el experimento anterior con valores de $24 \pm 11\%$ para los animales del grupo $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ y $31 \pm 14\%$ para los del grupo $B_{(O1C)4}T_{VP1}$. Estos valores si fueron mayores a los encontrados en los animales controles ($13 \pm 1\%$). Concluyentemente, se calculó un corte de opsonofagocitosis (valor medio del nivel de opsonofagocitosis más 2 desvíos estándar con 5 sueros libres de anticuerpos contra VFA) y sólo los valores de los sueros del Experimento 2 fueron mayores que dicho sitio corte de fagocitosis basal (Figura 4. 13).



Notablemente, cuando los sueros fueron analizados de manera individual, 40% (2/5) de los animales del grupo B(O1C)2 T VP1 y 80% (4/5) de los animales del grupo B(O1C)4 T VP1 mostraron opsonofagocitosis positiva, mientras que en el Experimento 1 solo 25% (1/4) animales en el grupo B(OUK)2 T3A y ninguno del B(OUK)4 T3A presentó opsonofagocitosis positiva.

4.3.1.6. Evaluación de presencia de anticuerpos contra proteínas no estructurales

Por otro lado, se evaluó al igual que las vacunas anteriores si eran vacunas DIVA, capaces de diferenciar entre animales vacunados e infectados. Se analizaron los sueros de los animales a los 44 dpv, en el ELISA comercial PrioCHECK® FMDV NS.

No se detectaron anticuerpos contra la poliproteína no estructural 3ABC en los sueros de los animales vacunados, por lo que se confirma que estas vacunas son DIVA, y de infectarse con el virus podrán diferenciarse.

4.3.2. Evaluación de la respuesta inmunitaria celular inducida por los nuevos péptidos dendriméricos

Con el fin de estudiar la respuesta inmunitaria celular específica inducida por las vacunas al tiempo pre-desafío (44 dpv) se realizó el aislamiento de CMNs con el método de aislamiento por gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus®. Luego de ser re estimuladas "*in vitro*" con antígeno viral inactivado y purificado (VFAi), con los péptidos tanto lineales como dendriméricos, se midió la respuesta linfoproliferativa y la producción de la citoquina proinflamatoria IFN- γ .

4.3.2.1 Evaluación de la linfoproliferación de linfocitos de memoria a los 44 dpv

Para el ensayo de linfoproliferación, se midió la marca intracelular de CFSE de las células proliferantes (Tabla 4.6). A los 44 dpv, cuando las CMNs de los animales pertenecientes al grupo $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ se estimularon con $Ag-B_{(O1C)2}T_{VP1}$ o $Ag-B_{(O1C)4}T_{VP1}$, 80% de los animales mostraron proliferación específica positiva (%proliferación CFSE específica >4). Solo CMN de los bovinos n°256 y n°257 presenta proliferación positiva con Ag-epitope T_{VP1} y Ag-epitope $B_{(O1C)}$, al igual que el animal n°264 para este último antígeno. En estas condiciones experimentales, las células del animal n°268 mostraron una respuesta proliferativa positiva contra VFAi. Por otro lado, el animal n°267 no mostró respuesta a ningún estímulo. Entre el 100% y el 80% de los animales pertenecientes al grupo $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ mostró proliferación específica cuando las células se estimularon *in vitro* con $Ag-B_{(O1C)2}T_{VP1}$ o $Ag-B_{(O1C)4}T_{VP1}$ respectivamente; sólo las células de los bovinos n°263 y n°271 proliferaron frente al re estímulo con Ag-epitope T_{VP1} y Ag-epitope $B_{(O1C)}$, al igual que el animal n°270 para este último antígeno. En este grupo, ninguno de los animales respondió contra VFAi. Por otro lado, las CMNs de los animales de controles negativos no respondieron a ninguno de los antígenos peptídico.

TABLA 4.6 – Respuesta linfoproliferativa de animales vacunados

Grupo	Animal	% proliferación CFSE positiva				
		Antígenos				
		B _{(01C)2} T _{VP1}	B _{(01C)4} T _{VP1}	Epitope T _{VP1}	Epitope B _(01C)	VFAi
B _{(01C)2} T _{VP1}	nº256	<u>11,6</u>	<u>8,7</u>	<u>5,3</u>	<u>7,1</u>	1,0
	nº 257	<u>15,1</u>	<u>15,7</u>	<u>20,2</u>	<u>13,4</u>	1,0
	nº 264	<u>4,2</u>	<u>5,2</u>	2,9	<u>6,7</u>	3,7
	nº 267	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0
	nº 268	<u>6,6</u>	1,5	1,0	3,8	<u>4,3</u>
B _{(01C)4} T _{VP1}	nº 253	<u>5,6</u>	3,1	1,9	2,2	1,0
	nº 263	<u>10,8</u>	<u>12,2</u>	<u>11,6</u>	<u>10,9</u>	1,0
	nº 266	<u>7,7</u>	<u>6,7</u>	1,0	2,4	1,1
	nº 270	<u>9,2</u>	<u>3,9</u>	1,4	<u>8,7</u>	<u>9,7</u>
	nº 271	<u>3,8</u>	<u>9,5</u>	<u>5,8</u>	<u>13,7</u>	3,3
Negativo	nº 254	2,9	1,5	3,0	3,0	2,8
	nº261	1,1	1,0	1,4	1,2	1,0

Proliferación específica de CMNs de animales vacunados medida por marcación con CFSE. Los resultados se expresaron como % de proliferación CFSE positiva. Las CMNs se estimularon con medio solo, con los péptidos dendriméricos B_{(01C)2}T_{VP1} o B_{(01C)4}T_{VP1}, o con los péptidos lineales T_{VP1} o B_(01C). El sitio de corte se calculó como el promedio del porcentaje de células CFSE positivas a los 0 dpv para todos los antígenos más 2 desvío estándar. Los valores de % proliferación CFSE positivas se encuentran subrayados (≥ 4)

4.3.2.2. Evaluación de la secreción de IFN- γ por parte de las CMNs de los animales vacunados

En cuanto a la secreción de IFN- γ , luego que las CMN de los animales sangrados a los 44 dpv fueran estimuladas con los antígenos por 72hs, se realizó un ELISA captura para detectar dicha citoquina. Los resultados, detallados en la Tabla 4.7, mostraron que el 80% de los animales pertenecientes al grupo B_{(01C)2}T_{VP1} o el 100% de los animales del grupo B_{(01C)4}T_{VP1} presentaban niveles positivos de IFN- γ secretado comparando con sus estados pre-inmunización, al re estimular las células con alguno de los péptidos dendriméricos. Notablemente, las células de los animales nº256, nº264 (B_{(01C)2}T_{VP1}) y nº263 (B_{(01C)4}T_{VP1}) secretaron altos niveles de IFN- γ aún en ausencia de un antígeno específico. Los animales nº256 y nº264 del grupo B_{(01C)2}T_{VP1} y nº263 y nº271 del grupo B_{(01C)4}T_{VP1} mostraron secreción específica (mayor a la secreción sin antígeno) de IFN- γ frente al re estímulo con Ag-VFAi. En cuanto a los péptidos lineales se observó secreción

de IFN- γ en los sobrenadantes de las CMNs de los animales n°256, n°257 ($B_{(O1C)2}T_{VP1}$) y n°270 ($B_{(O1C)4}T_{VP1}$) al enfrenarlas con el Ag-epitope T_{VP1} , y frente al Ag-epitope $B_{(O1C)}$ los animales n°256, n°257, n°264 ($B_{(O1C)2}T_{VP1}$) y los animales n°253, n°270, n°271 ($B_{(O1C)4}T_{VP1}$). Por último, los animales controles negativos presentaron bajos niveles de IFN- γ frente a todos los antígenos, considerado como nivel basal.

TABLA 4.7 – Secreción de IFN- γ de la CMNs aisladas de sangre periférica de animales vacunados a los 44 dpv

Grupo	Animal	IFN- γ (ng/ml)				
		Antígenos				
		$B_{(O1C)2}T_{VP1}$	$B_{(O1C)4}T_{VP1}$	Epitope T_{VP1}	Epitope $B_{(O1C)}$	VFAi
$B_{(O1C)2}T_{VP1}$	n°256	<u>23,6</u>	<u>16,2</u>	<u>11,7</u>	<u>17,6</u>	<u>2,2</u>
	n° 257	<u>13,8</u>	<u>14,9</u>	<u>8,8</u>	<u>11,7</u>	0,1
	n° 264	<u>2,1</u>	<u>1,6</u>	0,1	<u>3,3</u>	<u>3,1</u>
	n° 267	0,7	0,4	0,3	0,7	0,1
	n° 268	<u>1,3</u>	1,1	0,7	0,6	0,7
$B_{(O1C)4}T_{VP1}$	n° 253	<u>1,5</u>	<u>1,4</u>	0,1	<u>2,6</u>	0,1
	n° 263	<u>8,8</u>	<u>6,6</u>	0,1	0,1	<u>11,0</u>
	n° 266	<u>2,1</u>	<u>4,6</u>	0,6	0,8	0,6
	n° 270	<u>2,4</u>	1,1	<u>1,2</u>	<u>1,4</u>	0,1
	n° 271	<u>4,6</u>	<u>3,5</u>	0,3	<u>2,7</u>	<u>2,6</u>
Negativo	n° 254	0,1	0,5	0,2	0,3	0,1
	n°261	0,3	0,4	0,1	0,2	0,1

Secreción de IFN- γ por las CMNs de los animales vacunados luego de la estimulación *in vitro*. Los sobrenadante de 72hs de incubación fueron testeado por ELISA captura para la citoquina mencionada. Los resultados fueron expresados en ng/ml, interpolando DO de los sobrenadantes en una curva estándar lograda con la citoquina recombinante. El sitio de corte fue calculado como el promedio de la secreción de IFN- γ por las CMNs de los animales a los 0 dpv más 2 desvíos estándar. La secreción de IFN- γ considerado positivo se encuentra subrayado (>1.1 ng/ml)

Finalmente, todos los animales mostraron altos niveles tanto para linfoproliferación (valor promedio: 83% proliferación CFSE positiva) como para secreción de IFN- γ (valor promedio: 32 ng/ml) al enfrentar sus células con el mitogéno, concanavalina A, utilizado como control positivo.

4.3.3. Evaluación de protección frente al desafío con VFA O1Campos en bovinos vacunados con los nuevos péptidos dendriméricos $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ o $B_{(O1C)4}T_{VP1}$

A los 46 dpv, los animales fueron desafiados por instilación nasal con 10000DL₅₀ de VFA O1Campos; y por un período de 7 días se les realizó un seguimiento clínico para registrar el tiempo de aparición de lesiones. A los 7dpi, ningún animal vacunado presentó lesiones en ninguna de sus patas; es decir todos los animales del Experimento 2 estaban protegidos a la generalización podal (Tabla 4.7).

TABLA 4.8 – Puntaje clínico y protección de los animales vacunados con los péptidos dendriméricos $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ o $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ luego del desafío viral

Grupo	Animal	Puntaje clínico ^a												Protección ^b			
		3dpi			4dpi			5dpi			6dpi			7dpi			
		F(°C)	L	P	F(°C)	L	P	F(°C)	L	P	F(°C)	L	P	C			
$B_{(O1C)2}T_{VP1}$	n°256	39.2	0	0	39.2	0	0	39.0	0	0	39.0	0	0	NR	–	–	PGP
	n°257	37.7	0	0	38.9	0	0	39.2	0	0	40.0	0	0	NR	1 ^c	–	PGP
	n°264	38.7	0	0	39.2	0	0	39.2	0	0	39.2	0	0	NR	1	–	PGP
	n°267	39.0	0	0	39.3	0	0	38.9	0	0	38.7	0	0	NR	–	–	PGP
	n°268	38.7	0	0	39.2	0	0	38.7	0	0	38.7	0	0	NR	–	–	PGP
$B_{(O1C)4}T_{VP1}$	n°253	38.0	0	0	38.4	0	0	38.5	0	0	38.6	0	0	NR	–	–	PGP
	n°263	39.2	0	0	39.2	0	0	39.1	0	0	39.0	0	0	NR	–	–	PGP
	n°266	38.9	0	0	39.5	0	0	39.4	0	0	39.4	0	0	NR	–	–	PGP
	n°270	38.2	0	0	39.5	0	0	39.0	0	0	38.5	0	0	NR	–	–	PGP
	n°271	38.8	0	0	39.3	0	0	39.2	0	0	38.7	0	0	NR	–	–	PGP
Negativo	n°254	40.1	0	1	39.9	1	4	39.5	1	4	38.9	1	4	NR	1	4	NP
	n°261	40.9	1	2	40.5	1	4	40.4	1	4	39.5	1	4	NR	1	4	NP

a) Puntaje clínico luego del desafío (dpi; días post infección) determinado como número de patas con lesiones y la presencia de vesícula en lengua o cavidad oral

(F) Detección de temperatura rectal, fiebre mayor a 39.5°C

(L) Lesión en lengua y/o cavidad oronasal (presencia de lesión=1 ausencia=0)

(P) Lesión en patas (1 punto por cada pata afectada)

b) (C) Clasificación de protección luego de revisión exhaustiva el día de la necropsia (7dpi)

(PGP) Animales con ninguna lesión en las patas se consideran protegidos a la generalización podal.

(PP) Animales con un retraso en la aparición de signos de la enfermedad se consideran parcialmente protegidos

(NP) Animales con lesiones en las patas antes de los 7dpi se consideran no protegidos. Curso de la enfermedad equivalente al animal control negativo

c) Confirmación por RT-PCR de la presencia de virus en epitelio de lesiones dudosas de lengua (proteína no estructural 3D)

NR = no registrada

Como se puede observar, sólo a dos animales del grupo B_{(O1C)2}T_{VP1} (animales n°257 y n°264) se les detectó una vesícula en sus lenguas como signo de la enfermedad al día de la necropsia (7dpi). Para confirmar la presencia del virus en dichas lesiones, que resultaron dudosas al momento del registro, se realizó una RT-PCR de la proteína no estructural 3D. Ambas lesiones resultaron positivas para el VFA (dato no mostrado) a los 7dpi; sin embargo, es válido remarcar que la protección a la generalización podal fue alcanzada en este grupo, y más aún en el grupo B_{(O1C)4}T_{VP1} no se registró en ningún momento del monitoreo signos de la enfermedad.

Adicionalmente, se observó una diferencia en el aspecto de las lesiones de los animales vacunados con péptidos con respecto a las lesiones observadas en los animales controles (Figura 4.14).

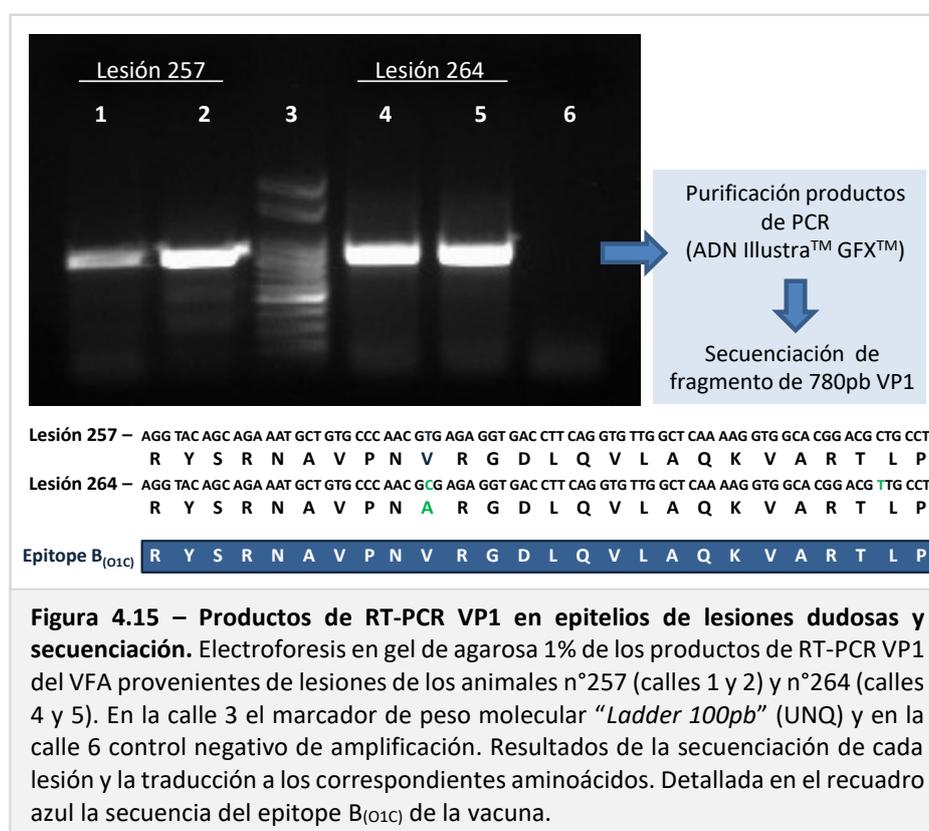


Los animales controles negativos, a los 7dpi, presentaban un proceso de regeneración del epitelio avanzado, mientras que en los animales vacunados las lesiones eran características de etapas tempranas de infección.

Finalmente, los controles negativos presentaron lesiones típicas de la enfermedad en la lengua y/o patas a los 3dpi, alcanzando a los 7dpi el puntaje de signos clínico máximo.

4.3.3.1. Evaluación del VFA provenientes de las lesiones de los animales vacunados

Con el fin de dilucidar si existió una presión de selección por los anticuerpos y un posterior escape viral en los animales que presentaron una lesión en la lengua a los 7dpi, se realizó un RT-PCR a partir de los macerados de los epitelios. Posteriormente, se secuenció un fragmento de aproximadamente 780pb de la proteína VP1 que contenía la secuencia correspondiente al epítipo B_(01C) (Figura 4.15).



La secuencia amplificada y secuenciada proveniente del VFA en la lesión del animal nº257, no mostró cambio en la secuencia de nucleótidos y por lo tanto la secuencia de aminoácidos se mantuvo igual a la secuencia de residuos del epítopo B_(O1C) presente en la vacuna. Por otro lado, la secuencia del VFA de la lesión del animal nº264, mostró 2 cambios nucleotídicos que produjeron dos mutaciones por sustitución de base; la primera mutación transicional (T→C) sustituyó una valina por una alanina en la posición -1 del RGD, y la segunda también una mutación transicional (C→T) pero que dio como resultado una mutación silenciosa.

Discusión

5. DISCUSIÓN

En los países ganaderos, la FA es una de las enfermedades de mayor preocupación y vigilancia, por sus graves consecuencias económicas en caso de aparición de brotes. Esta enfermedad es endémica en casi todos los países en desarrollo, grandes áreas de África, Asia y Sudamérica, y por su alta transmisibilidad es capaz de cruzar fronteras internacionales y causar epidemias. Las características del virus, como su amplio rango de hospedadores, la capacidad de infectar en bajas dosis, rápida tasa de replicación, altos niveles de excreción y sus múltiples formas de transmitirse, hacen de la FA una enfermedad difícil y costosa de erradicar. Los países libres de FA toman grandes precauciones para evitar la entrada del virus y en consecuencia, esta es una de las enfermedades que impone mayores restricciones al comercio internacional de animales y sus productos.

Actualmente, las estrategias de prevención de la FA en la Argentina se centra en la vacunación sistemática compuesta por 2 campañas anuales para los animales de las categorías etarias menores o 1 campaña anual para las vacas y toros; mientras que las estrategias de control para limitar la dispersión de la enfermedad en caso de un brote incluyen, la restricción del movimiento de los animales, el sacrificio (rifle sanitario) de animales infectados o expuestos y luego desinfección del área, y la vacunación en anillo de animales circundantes al brote con virus inactivado químicamente (implementado luego del brote de Europa en 2001).

Las vacunas inactivadas han resultado muy eficaces en la lucha contra la enfermedad. Sin embargo, con el objetivo de suspender el uso de virus vivo durante el proceso de producción de la vacuna, se busca desde hace varios años inmunógenos alternativos para reemplazar al VFA en dicha formulación. Entonces, el principal motivo que alienta el desarrollo de vacunas alternativa 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. 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, pero también en países libres altamente susceptibles a brotes. Por ejemplo, durante el brote de Reino Unido del 2001, se consideró la utilización de una vacuna de “emergencia” para la vacunación en anillo de los animales; sin embargo, no se implementó por miedo de encubrir animales infectados y prolongar el período en que las exportaciones de ese país se restringieron. Para ese entonces, las condiciones que debían cumplir los países para recuperar el estatus “libre de FA sin vacunación” luego de una vacunación de emergencia no eran precisas, ya que esta práctica no estaba incluida en el Manual Terrestre de la OIE. En particular, los países que había utilizado esta estrategia para controlar la enfermedad debían esperar entre 12 meses, 2 años o más, para recuperar su estatus, dependiendo de cómo se interpretara el Código Sanitario de Animales Terrestres de la OIE. En consecuencia, en mayo del 2002, el Código fue revisado y modificado en la Sesión General de la OIE, resultando ahora más explícitos en las condiciones para recuperar el estatus luego de un brote y con la incorporación del test DIVA. Los países que utilizan la vacunación de emergencia pueden recuperar su estado libre de enfermedad después de seis meses, siempre que se realice de manera continua la prueba de proteínas no estructurales en la vigilancia serológica. Esta reducción en el tiempo de espera para la recuperación del estatus, disminuye el impacto sobre las exportaciones, haciendo el uso de la vacunación más aceptable.

Los péptidos sintéticos representan candidatos seguros y eficaces para ser usados como vacuna contra la FA. Entre las ventajas se destacan su fácil almacenamiento, transporte y distribución, purificación, análisis y caracterización, y la posibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados de manera simple. En el caso de la vacuna convencional, para lograr la diferenciación de animales, es condición absoluta la purificación máxima de la cápside viral, sin contaminación de las proteínas no

estructurales; mientras que las vacunas a péptido sintético son ideales para alcanzar fácilmente este propósito. Los péptidos dendriméricos de ambas experiencias mostraron inducir una eficiente respuesta serológica con altos niveles de anticuerpos contra los epitopes presentes en la vacuna, y presumiblemente no inducen anticuerpos contra la proteína NS 3ABC, permitiendo diferenciar a los animales vacunados de infectados. Esta determinación podría optimizarse si se utilizará como método de diagnóstico diferencial un ELISA que se basará en alguna secuencia peptídica o proteína perteneciente a la cápside viral, y que no esté presente en la formulación de las vacuna dendriméricas. Las vacunas evaluadas soportan esta estrategia, ya que se podría utilizar para el diagnóstico, cualquier proteína estructural del virus (por ejemplo, la proteína VP2 o VP3) más inmunogénicas que las proteínas no estructurales y cuyas respuestas humorales se detectan entre 5 y 10 días antes que la respuesta de anticuerpos contra las proteínas NS (Bruderer et al., 2004).

Otra importante ventaja de estas vacunas peptídicas completamente sintéticas, es la posibilidad de modificar rápidamente la formulación o secuencia de los péptidos vacunales. Estas vacunas están diseñadas racionalmente, de modo que permiten la rápida adaptación a los cambios antigénicos detectados en aislamientos virales causantes de brotes en países libres de la enfermedad o la inclusión de determinantes antigénicos de serotipos no presentes en la vacuna y que comienza a circular por la población susceptible. Esto es una ventaja tanto para los países libres de la enfermedad como para los países endémicos; en estos últimos, se suele utilizar vacunas polivalentes para controlar la enfermedad, y esta estrategia de mejoramiento permitiría tener disponible en poco tiempo una vacuna que logre adecuarse a los requerimientos específicos de la zona. Por procedimientos convencionales este proceso requeriría el crecimiento del virus para obtener un stock de semillas y su ampliación en cultivos celulares para obtener suficiente cantidad de virus para las dosis de vacuna requeridas. Sin embargo, la síntesis de los péptidos dendriméricos es sencilla y está automatizada,

obteniendo una vacuna optimizada de manera rápida y fácil. Adicionalmente, un aspecto importante de las vacunas peptídicas es que no necesitan una cadena de frío para el transporte y almacenamiento al estar liofilizadas, como si la requiere la vacuna convencional actual. Esta es una ventaja significativa ya que simplifica la logística de vacunación.

Sin embargo, el éxito en el desarrollo de vacunas peptídicas se ha limitado principalmente por las dificultades asociadas con la estabilidad *in vivo*, pobre inmunogenicidad de péptidos lineales, y por el polimorfismo del CMH de la especie huésped (Leclerc, 2003; Rowlands, 2004). Sin embargo, se ha demostrado fehacientemente que la presentación ramificada y de múltiples epitopes B unido a un epítope T, es ventajoso sobre simple yuxtaposición lineal de estos epitopes (Cubillos et al., 2012; Cubillos et al., 2008)) alcanzando respuestas inmunitarias humorales y celulares efectivas contra diversos patógenos de importancia sanitaria (Cubillos et al., 2008; (Tarradas et al., 2011).

Para aquellos sistemas virales, como el VFA, de los que se dispone de información precisa sobre la localización de los sitios antigénicos, es posible abordar la construcción de vacunas basadas en la utilización de péptidos sintéticos correspondientes a dichos sitios. El grupo de investigación liderado por la Dra. Blanco, reportó protección completa en cerdos, contra el desafío viral con VFA luego de la vacunación con péptidos dendriméricos. En una primer etapa, se alcanza la protección cerdos vacunados con un péptido dendrimérico conformado por 4 copias de un epítope B (sitio A, VP1) perteneciente al serotipo C-S8c1 y el epítope T (3A, residuos 21-40) (Cubillos et al., 2008), y en una segunda etapa, con un péptido dendrimérico conformado por 2 copias de un epítope B (sitio A, VP1) perteneciente al serotipo O/UK 11/01 y el mismo epítope T (Blanco et al., 2016). Por lo tanto, esta elección de multimerización de epitopes B, que están unidos a un epítope T, ha mostrado aumentar la eficiencia de activación del sistema inmunitario. Por ende, se ha decidido probar estos péptidos dendriméricos en

bovinos con el objetivo de lograr una respuesta inmunitaria ampliamente reactiva contra el VFA, similares a las observadas en los cerdos exocriados.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo de tesis fue en un primer experimento evaluar la protección frente a VFA O1Campos de una vacuna peptídica dendrímica diseñada a partir de las secuencias de VFA O/UK 11/01 que había resultado exitosa en cerdo; y en un segundo experimento emplear estrategias capaces de incrementar la inmunogenicidad y protección inducida por nuevos péptidos dendrímicos para ser utilizados como vacuna y alcanzar la protección de los animales.

5.1. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y CAPACIDAD PROTECTORA DE LAS VACUNAS BASADAS EN EL VFA O/UK 11/01 (Experimento 1)

En esta sección de la tesis se reportó por primera vez la utilización de péptidos dendrímicos como vacunas candidatas en la inmunización experimental de bovinos. Se ha demostrado que tanto $B_{(OUK)4T_{3A}}$ como su versión reducida $B_{(OUK)2T_{3A}}$ inducen respuestas similares. Se observó una alta respuesta humoral contra los péptidos y cuyos anticuerpos eran capaces de reconocer a la cápside viral. Sin embargo, la capacidad neutralizantes de los mismo frente a VFA O1Campos fue baja y solo fueron capaces de neutralizar cantidades menores de $100DICT_{50}$ del virus; por lo tanto no fue posible calcular un título neutralizante para ninguno de los animales contra esta cepa viral. Igualmente, varios estudios han revelado que no existe correlación entre inmunoprotección y el título de neutralización viral que alcanzan los animales. En este punto, McCullough y colaboradores (1992a) han demostrado que algunos animales con un TNV insuficiente se encuentran protegidos luego del desafío, mientras que otros con altos TNV desarrollaron lesiones en sus patas luego de la exposición con el virus. Específicamente, un 65% de los animales inmunizados con vacuna comercial resultaron protegidos al desafío experimental y mostraban un TNV entre 0,6 y 1,2, es decir un TNV negativo. Esto indica que existen otros mecanismos además de la neutralización de VFA

que juega un papel importante en la protección y eliminación del virus *"in vivo"*, considerando preciso continuar el experimento hasta el desafío. Por otro lado, cuando se analizó la capacidad neutralizante frente a O/UK se logró detectar TNV aunque estos eran bajos. No obstante, esto indicaría que los péptidos fueron capaces de generar anticuerpos neutralizantes contra el virus en el cual está basada la secuencia antigénica del epítipo B_(OUK).

A pesar de detectar presencia de anticuerpos con actividad anti-VFA en los sueros de los animales vacunados, ninguno de ellos consiguió protección completa frente al desafío con VFA O1Campos. Sin embargo, si se observó una protección parcial en algunos de los animales (sin distinción entre grupos) ya sea por la severidad de la enfermedad o el retraso en la aparición de lesiones. Entonces, tanto B_{(OUK)₂T_{3A}} como B_{(OUK)₄T_{3A}}, mostraron diferentes respuestas inmunitarias y protección en los animales vacunados. Por un lado, los animales n°44 (B_{(OUK)₂T_{3A}}) y n°36 (B_{(OUK)₄T_{3A}}) estuvieron protegidos frente a la generalización podal; y por el otro los animales n°170 (B_{(OUK)₂T_{3A}}) y n°431 (B_{(OUK)₄T_{3A}}) mostraron un retraso en el comienzo de la enfermedad. Estos animales parcialmente protegidos, mostraron respuestas positivas humorales y celulares tanto contra los péptidos como al VFA. Estos animales tenían altos títulos de anticuerpos anti-VFA O1Campos medido por ELISA con una baja capacidad neutralizante y TNV positivos contra O/UK (TNV>1.2). Los animales que estaban protegidos frente a la generalización podal, mostraron linfoproliferación positiva no solo frente a los péptidos dendriméricos sino también frente al epítipo T_{3A}. Otro parámetro a destacar de estos 2 animales, sin lesiones en las patas, es la detección de IgA anti-VFA en la mucosa nasal. Esto sugiere que los animales que manifestaron parámetros inmunológicos más reactivos tanto contra los péptidos dendriméricos como contra VFA contaban con un mejor estado inmunológico para enfrentar la infección. Todos aquellos animales que mostraron una respuesta celular o humoral moderada no lograron alcanzar la protección. Los animales n°168 (B_{(OUK)₄T_{3A}}), n°164 y n°166 (B_{(OUK)₂T_{3A}})

mostraron una respuesta de anticuerpos contra VFA solo después de la segunda vacunación y sus TNV contra O/UK fueron menores a 1.2 (excepto el animal n°166). Las respuestas celulares contra los péptidos también fueron bajas, y no se observó respuesta frente al epítipo T_{3A}. Por lo tanto, la falta de coexistencia de respuestas positivas en estos animales fundamenta la ausencia de una respuesta inmunitaria protectora contra el desafío viral.

Claramente, el epítipo T_{3A}, inmunodominante para cerdos presente en B_{(OUK)₂T_{3A}} y B_{(OUK)₄T_{3A}}, no es una secuencia reconocida de manera promiscua por los linfocitos T bovinos, por lo que la respuesta inmunitaria fue heterogénea entre los animales. En consecuencia, solo unos animales respondieron de manera eficiente tras la vacunación con los péptidos dendriméricos. En las últimas dos décadas se ha investigado intensamente para identificar epítopos de células T bovinas en el VFA, sin embargo, el conocimiento de la restricción de CMH y los residuos de anclaje de estos epítopos aún es escaso (Gerner et al., 2009; Glass, 2004).

La ruta de entrada del VFA, los sitios de replicación, los síntomas asociados y respuestas inducidas difieren entre especies. Los bovinos son altamente susceptibles al VFA, y el virus casi siempre entra a través de la vía respiratoria. Más aun, los tejidos de las vías respiratorias superiores, el paladar blando y faringe, han sido identificadas como sitio de replicación y persistencia del VFA en estos animales (Zhang y Alexandersen, 2004; Zhang y Kitching, 2001). Entonces, luego del desafío viral por instilación nasal, se estudió la respuesta humoral en los ganglios de la vía respiratoria para poder evidenciar el avance del virus en el animal y caracterizar su respuesta. Se seleccionaron aquellos linfonódulos que habían sido reportados como más reactivos y que drenan los sitios donde se focaliza la replicación del VFA, para poder así determinar los diferentes perfiles de respuesta en el desparejo repertorio de protección. Se analizó la inducción de CSA-VFA a los 7dpi, y se detectó una respuesta diferencial en los distintos

linfonódulos estudiados en los animales vacunados. Los animales parcialmente protegidos y protegidos a la generalización podal no presentaron CSA-VFA en el TBL, linfonódulo de la vía respiratoria inferior, y en general el número de CSA-VFA totales presente era escaso. Este resultado plantea la posibilidad de una restricción para la entrada del virus lograda por el sistema inmunitario en la vía respiratoria superior, impidiendo de esta manera la llegada del virus a dicho ganglio. Por el contrario, los animales vacunados y no protegidos mostraron una fuerte estimulación de las CSA-VFA y producción de anticuerpos (mayormente IgG1 e IgM) a lo largo de toda la vía respiratoria, indicando la falta de detención del avance viral. La respuesta de anticuerpos detectada en los ganglios de estos animales es comparable con una respuesta de memoria luego del contacto con el VFA replicativo. Esto sugiere que la inmunización con los péptidos generan linfocitos B de memoria específicos contra VFA, que circulan en el sistema linfático y que se diferencian rápidamente a CSA tras el contacto con el VFA en los ganglios que drenan el sitio de infección. Por lo tanto, estos animales muestran una fuerte respuesta de CSA-VFA, a lo largo de todo el tracto respiratorio (incluyendo el TBL) con frecuencias de CSA aún mayores que las observadas para los animales controles; pero que no logran frenar el avance del virus. En cuanto a los animales controles negativos, se detectan cantidades moderadas de CSA-VFA en los tres linfonódulos estudiados, siendo el isotipo IgM el detectado predominantemente, seguido por IgG1 para el animal nº167. Se ha propuesto que la cápside del VFA, por sus características estructurales, puede producir una estimulación de los linfocitos B de manera T independientes (Carr et al., 2013; Juleff et al., 2009) y que una infección viral aguda puede resultar también en la inducción precipitada de anticuerpos de manera T independiente. En esta respuesta extrafolicular los linfocitos B se diferencian a CSA de manera rápida en respuesta al VFA del desafío (Pega et al., 2013), produciendo anticuerpos de isotipos IgG o IgA de baja afinidad. Por lo tanto la respuesta de los animales controles negativos, es consistente con un respuesta primaria frente al VFA.

Basándonos en estos resultados, se puede concluir que la baja eficiencia de los péptidos dendriméricos se debe, en parte, a la amplia variación de respuesta de animal en animal, como se muestra en los parámetros analizados en esta tesis. Estas variaciones serán más pronunciadas cuanto más sencillo sea la composición de epitopes, ya que las células T poseen restricción de CMH, moléculas altamente polimórficas en una población exocriada y por lo tanto el reconocimiento de epitopes puede ser muy variable. Esto causa variaciones en las respuestas celulares y de anticuerpos entre los individuos experimentales. Por el contrario, en los ensayos con vacunas con virus entero inactivado estas variaciones se encuentran reducidas como resultado del gran repertorio de epitopes antigénicos que contiene la cápside viral. Los resultados de la primera sección de la tesis indican que la presencia del epitope T_{3A} no fue suficiente para incrementar la inmunogenicidad del sitio antigénico A ($B_{(OUK)}$) y conseguir una consistente protección. Sólo el 20% de los animales presentó proliferación positiva cuando sus PBMCs se incubaron con T_{3A} , por lo tanto, se requiere un diseño mejorado de la vacuna para conseguir la protección esperada que alcanza la vacuna convencional.

En resumen, se concluye que la baja eficiencia de los péptidos dendriméricos puede ser originada por la diferencia de secuencia del VFA O/UK y O1Campos fracasando en la generación de anticuerpos neutralizantes contra el último subtipo mencionado; la variación de respuesta entre animales; y en la posibilidad de la falta de un epitope T bovino apropiado. En consecuencia, se propone ensayar dos péptidos dendriméricos nuevos con epitope B derivado de la secuencia de VP1(135-160) O1Campos ($B_{(O1C)}$) y un nuevo epitope T que había sido reportado como inmunodominante para bovinos (aminoácidos 21-40 de la proteína VP1, T_{VP1}). Es decir, que se espera que un alto porcentaje de animales sea capaz de reconocer el epitope T_{VP1} a través de las CPA y cargarlo en su CMH para ser presentados a las células T, reduciendo las variaciones de respuesta entre animales.

5.2 EVALUACIÓN DE INMUNIDAD PROTECTORA EN BOVINOS CON NUEVOS PEPTIDOS DENDRIMÉRICOS

En el Experimento 2, los nuevos péptidos dendriméricos, $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ y $B_{(O1C)4}T_{VP1}$, en general inducen respuestas similares a las observadas con los péptidos del Experimento 1. Se observó una alta respuesta humoral contra los péptidos y cuyos anticuerpos eran capaces de reconocer a la cápside viral. Al igual que en el Experimento 1, el isotipo predominante con acción anti-VFA encontrado en el suero fue IgG1. Se ha reportado que en los bovinos, los niveles de IgG1 séricos y no las IgG2 están relacionados con la respuestas inmunes protectoras en animales vacunados con bajos títulos de anticuerpos anti-VFA (Capozzo et al., 1997).

En los últimos años se ha logrado una mayor comprensión de la respuesta inmune protectora contra el VFA. El brazo principal de la respuesta inmunitaria humoral efectora contra el virus requiere tantos anticuerpos específicos que neutralicen la partícula viral, como anticuerpos que participen en la eliminación del VFA por opsonización y conjunta acción de los macrófago (Quattrocchi et al., 2014). Además, como se mencionó anteriormente, la inducción de altos niveles de IgG1 anti-VFA está relacionado con la protección aun cuando los títulos de IgGs totales sean bajos. Esta relación diferencial IgG1/IgG2 (alta para animales protegidos a la generalización podal) estaba asociada a la protección en aquellos animales que no presentaban TNV positivos (Lavoria et al., 2012).

Las vacunas $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ y $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ lograron alcanzar todos estos parámetros inmunológicos necesarios para conseguir la protección, altos niveles de IgG1 específicos de O1Campos, TNV positivos (mayores o iguales a 1,2) y niveles detectables de anticuerpos opsonizantes que asisten a los macrófagos en la eliminación del virus; a diferencia de lo que sucedió para el Experimento 1, donde sólo se detectó predominancia de IgG1 anti-VFA pero no eran capaces de neutralizar y opsonizar al VFA. Sin embargo,

inicialmente la capacidad neutralizante de los mismos frente a VFA O1Campos fue baja y solo luego de la tercera vacunación los anticuerpos fueron capaces de neutralizar 100DICT₅₀ del VFA O1Campos. Esta optimización en la capacidad neutralizante puede ser efecto de la maduración de la afinidad de los anticuerpos. Se ha reportado que bajas dosis de antígeno favorece la selección de mutaciones somáticas de los anticuerpos características de maduración de afinidad (Gonzalez-Fernandez y Milstein, 1998). Luego de la tercera inmunización con baja dosis de péptido dendrimérico, no se observó un aumento en el título de anticuerpos contra el VFA, sino un incremento en la capacidad neutralizante. Esta inmunización podría haber resultado en una selección más estricta de linfocitos B en los centros germinales, al aumentar la competencia de estos linfocitos por los antígenos asociados a las células dendríticas foliculares, prevaleciendo aquellos con mayor afinidad al antígeno; resultando en una respuesta humoral más ávida alcanzando la neutralización del VFA.

Todos los animales de este segundo experimento, con ambas vacunas, estuvieron protegidos frente a la generalización sistémica del virus. No obstante, cuando se analizaron los parámetros inmunológicos mencionados, se detectaron diferencias entre los grupos. Asimismo, se observó una diferencia en cuanto a la protección general del grupo B_{(O1C)2}TV_{VP1}, ya que dos de los animales presentaron una lesión en la lengua en tiempos post-desafío inusuales (7dpi). Cuando se analizó la secuencia de la región de codificante del "loop" GH de la VP1 correspondiente al epítipo B_(O1C) a partir del ARN del VFA recuperado directamente de las lesiones, se observó que uno de estos animales (nº264) mostró una sustitución aminoacídica en posición -1 del RGD. Esto podría reflejar la selección de una variante viral resistente a la neutralización de los anticuerpos dirigidos a ese motivo. Sin embargo, el otro animal que presentó lesión en la lengua (nº257) no evidenció cambio aminoacídico, por lo tanto no podemos concluir fehacientemente que esta falta en la protección total es debido a la emergencia de mutantes resistente a la neutralización, posiblemente se debió a deficiencias en

respuestas inmunitarias protectoras; se deben realizar más experimentos para entender el fenómeno. Los animales n°257 y n°264, ($B_{(O1C)2}T_{VP1}$, PGP pero con lesión en sus lenguas) desarrollaron TNV positivos contra VFA O1Campos pero relativamente bajos, similares a otros animales del mismo grupo; sin embargo, ambos animales desarrollaron niveles altos de IgG1 sólo luego de la segunda vacunación. En comparación, el animal n°253 ($B_{(O1C)4}T_{VP1}$, PGP sin lesiones) presentó un TNV bajo (1.2) pero a partir de la primera vacunación presentó altos niveles de IgG1 séricas. Por lo tanto, estos resultados de protección pueden estar asociados a la presencia de IgG1 en concordancia con resultados ya publicados (Capozzo et al., 1997). Es posible que la inmunogenicidad optimizada por la construcción tetravalente frente a la bivalente, se base en la posición y mayor número de antígenos repetitivos que pueden inducir un entrecruzamiento en la superficie de las células inmaduras B a través de la interacción con las Igs de membrana (Bachmann et al., 1993); o que la multimerización de epitopes promueve la internalización del antígeno por las CPA (Zinkernagel, 2003). Los niveles de opsonofagocitosis del grupo $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ fueron menores que los detectados para el grupo $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ no fueron significativamente diferentes. Sin embargo, los títulos de anticuerpos neutralizantes fueron significativamente superiores en el grupo $B_{(O1C)4}T_{VP1}$. Esto podría explicar la diferencia observada en la protección.

El epitope bovino T_{VP1} fue reconocido solo por el 40% de los animales vacunados cuando las PBMCs fueron re estimuladas *in vitro*. Por lo tanto, en las condiciones metodológicas utilizadas, el epitope T_{VP1} no logra inducir una respuesta celular total en las células mononucleares aisladas. No se detectó correlación entre la respuesta celular observada y la protección. Sin embargo, el número de animales utilizado no es poblacionalmente representativo y no es suficiente para una validación estadística, a pesar de ser equivalente a aquellos ensayos introductorios para candidatos vacunales (Moraes et.al, 2002; Porta et.al 2013). No obstante, estos resultados indican fuertemente que la inmunización de bovinos con estos nuevos péptidos dendriméricos,

principalmente B_{(O1C)4}T_{VP1}, pueden inducir no solo una respuesta humoral similar a la inducida por la vacuna convencional sino también una respuesta protectora. Esta respuesta previene la aparición de la enfermedad en animales inmunizados, convirtiendo a esta en la segunda vacuna peptídica exitosa en proteger a bovinos (primer reporte de vacuna peptídica exitosa (DiMarchi et al., 1986)).

En conclusión, la utilización de péptidos dendriméricos como candidatos vacunales es un enfoque altamente interesante y exitoso que debe seguir siendo explorado para mejorar la efectividad; ya sea, seleccionando distintos y/o más epitopes B y T; optimizando la dosis y esquema de vacunación para poder alcanzar los parámetros inmunológico protectores de manera más rápida; seleccionando adyuvantes que polaricen a respuesta de linfocitos T colaboradores hacia un perfil Th2, entre otras posibilidades.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Las vacunas peptídicas dendriméricas evaluadas en este trabajo de tesis:

- Inducen una eficiente respuesta serológica específica contra el VFA, principalmente desde la primera vacunación sin necesidad de estar acoplada a una proteína portadora.
- Son vacunas DIVA; permiten la diferenciación de los animales infectados de vacunados a través del ELISA de NSP 3ABC utilizado en la serovigilancia oficial.

Vacunas formuladas con péptidos B_{(OUK)₂T_{3A}} Y B_{(OUK)₄T_{3A}}:

- Inducen respuestas inmunitarias específicas contra los péptidos tanto humoral como celular similares .
- Inducen AcSN contra VFA O/UK aunque con títulos bajos. No inducen niveles de anticuerpos neutralizantes capaces de neutralizar 100DICT₅₀ de VFA O1Campos (TNV<0.9). Tampoco inducen niveles positivos de anticuerpos opsonizantes contra el VFA.
- Confieren protección parcial de los animales (sin distinción entre grupos); dos animales estuvieron protegidos a la generalización podal y dos animales mostraron un retraso en la sintomatología
- Mostraron una respuesta diferencial en los linfonódulos estudiados en los animales vacunados luego del desafío, que se correlaciona con el estado de protección frente a la enfermedad.
- *La baja eficiencia de las vacunas se debió a la variación de respuesta entre animales por falta de un epítoto T inmunodominante bovino y a la diferencia de secuencia entre VFA O/UK y O1Campos en el epítoto B fracasando en la generación de anticuerpos neutralizantes y/u opsonizantes contra VFA O1Campos (virus utilizado en el desafío experimental).*

Vacunas formuladas con péptidos $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ y $B_{(O1C)4}T_{VP1}$:

- Logran inducir respuestas inmunitarias eficientes contra el VFA O1Campos, alcanzando todos los parámetros inmunológicos necesarios para conseguir la protección a la FA
- Inducen altos niveles de IgG1 específicos anti-VFA tanto séricos como en mucosa
- Inducen TNV positivos luego de la tercera inmunización con una dosis baja de péptidos, detectando un título promedio significativamente mayor para el grupo vacunado con $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ con respecto al grupo $B_{(O1C)2}T_{VP1}$
- Inducen niveles de anticuerpos opsonizantes positivos en la mayoría de los animales
- Confieren protección a los animales frente a la infección con VFA, con una distinción entre grupos. Todos los animales del grupo $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ y $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ alcanzan la protección a la generalización podal. Ningún animal del grupo $B_{(O1C)4}T_{VP1}$ mostró signos de la enfermedad, y solo dos animales del grupo $B_{(O1C)2}T_{VP1}$ presentaron una vesícula en la lengua a los 7dpi.
- *Constituyen el primer reporte científico que evalúa a vacunas peptídicas dendriméricas en bovinos logrando resultados exitosos en el desafío experimental contra el VFA.*

La utilización de péptidos dendriméricos como vacunas contra la Fiebre Aftosa es una estrategia altamente prometedora para el control del VFA. Sin embargo, es preciso evaluar modificaciones en el esquema de vacunación, dosis de antígeno y selección de adyuvantes que mejoren la efectividad y velocidad de respuesta de la vacuna.

Referencias

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H.,** (2004). Basic Immunology: functions and disorders of the immune system, Second Edition. Saunders, Philadelphia, PA.
- 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.
- Abu Elzein, E.M., Crowther, J.R.,** (1981). Detection and quantification of IgM, IgA, IgG1 and IgG2 antibodies against foot-and-mouth disease virus from bovine sera using an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Hyg (Lond)* 86, 79-85.
- 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 Å resolution. *Nature* 337, 709-716.
- Alexandersen, S., Donaldson, A.I.,** (2002). Further studies to quantify the dose of natural aerosols of foot-and-mouth disease virus for pigs. *Epidemiol Infect* 128, 313-323.
- Alexandersen, S., Oleksiewicz, M.B., Donaldson, A.I.,** (2001). The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR. *J Gen Virol* 82, 747-755.
- Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A.I., Garland, A.J.,** (2003). The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol* 129, 1-36.
- Ali, R., Kumar, S., Naqvi, R.A., Sheikh, I.A., Rao, D.N.,** (2013). Multiple antigen peptide consisting of B- and T-cell epitopes of F1 antigen of *Y. pestis* showed enhanced humoral and mucosal immune response in different strains of mice. *Int Immunopharmacol* 15, 97-105.
- Almeida, M.R., Rieder, E., Chinsangaram, J., Ward, G., Beard, C., Grubman, M.J., Mason, P.W.,** (1998). Construction and evaluation of an attenuated vaccine for foot-and-mouth disease: difficulty adapting the leader proteinase-deleted strategy to the serotype O1 virus. *Virus Res* 55, 49-60.
- Ambros, V., Baltimore, D.,** (1980). Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem* 255, 6739-6744.
- 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.
- Ansardi, D.C., Porter, D.C., Morrow, C.D.,** (1992). Myristylation of poliovirus capsid precursor P1 is required for assembly of subviral particles. *J Virol* 66, 4556-4563.
- Auge de Mello, P., Astudillo, V., Gomes, I., Campos Garcia, J.T.,** (1977). Respuesta inmunitaria de bovinos adultos vacunados contra la fiebre aftosa con vacuna oleosa. *Bol. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 26, 23-25.
- Auge de Mello, P., Gomes, I.,** (1977). Respuesta anamnésica en bovinos a la revacunación con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. *Bol. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 27-28, 49-54.
- Bachmann, M.F., Rohrer, U.H., Kundig, T.M., Burki, K., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M.,** (1993). The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262, 1448-1451.
- Bachrach, H.L., Moore, D.M., McKercher, P.D., Polatnick, J.,** (1975). Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. *J Immunol* 115, 1636-1641.
- 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.
- Bahnemann, H.G.,** (1990). Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine* 8, 299-303.
- Bahnemann, H.G., Mesquita, J.,** (1987). Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. *Bol. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 53, 19-24.

- 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.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Sevilla, N., Andreu, D., Beck, E., Domingo, E.,** (2000). Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol* 74, 1641-1647.
- Barker, B.R., Gladstone, M.N., Gillard, G.O., Panas, M.W., Letvin, N.L.,** (2010). Critical role for IL-21 in both primary and memory anti-viral CD8+ T-cell responses. *Eur J Immunol* 40, 3085-3096.
- Barnett, P.V., Cox, S.J., Aggarwal, N., Gerber, H., McCullough, K.C.,** (2002). Further studies on the early protective responses of pigs following immunisation with high potency foot and mouth disease vaccine. *Vaccine* 20, 3197-3208.
- Barnett, P.V., Ouldrige, E.J., Rowlands, D.J., Brown, F., Parry, N.R.,** (1989). Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. I. Identification and characterization of three functionally independent, conformational sites. *J Gen Virol* 70 (Pt 6), 1483-1491.
- Barteling, S.J., Vreeswijk, J.,** (1991). Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 9, 75-88.
- Beard, C., Ward, G., Rieder, E., Chinsangaram, J., Grubman, M.J., Mason, P.W.,** (1999). Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *J Biotechnol* 73, 243-249.
- Becker, 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.
- Belsham, G.J., Abrams, C.C., King, A.M., Roosien, J., Vlak, J.M.,** (1991). Myristoylation of foot-and-mouth disease virus capsid protein precursors is independent of other viral proteins and occurs in both mammalian and insect cells. *J Gen Virol* 72 (Pt 3), 747-751.
- Belz, G.T., Wodarz, D., Diaz, G., Nowak, M.A., Doherty, P.C.,** (2002). Compromised influenza virus-specific CD8(+)-T-cell memory in CD4(+)-T-cell-deficient mice. *J Virol* 76, 12388-12393.
- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F., Heath, W.R.,** (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480.
- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Miller, J.F., Heath, W.R.,** (1997). Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* 186, 65-70.
- Bennink, J.R., Palmore, T.N.,** (2004). The promise of siRNAs for the treatment of influenza. *Trends Mol Med* 10, 571-574.
- 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.
- Bertram, E.M., Tafuri, A., Shahinian, A., Chan, V.S., Hunziker, L., Recher, M., Ohashi, P.S., Mak, T.W., Watts, T.H.,** (2002). Role of ICOS versus CD28 in antiviral immunity. *Eur J Immunol* 32, 3376-3385.
- Bienz, K., Egger, D., Pfister, T., Troxler, M.,** (1992). Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J Virol* 66, 2740-2747.
- Bienz, K., Egger, D., Troxler, M., Pasamontes, L.,** (1990). Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol* 64, 1156-1163.

- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., Barik, S.,** (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11, 50-55.
- 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.
- Blanco, E., Garcia-Briones, M., Sanz-Parra, A., Gomes, P., De Oliveira, E., Valero, M.L., Andreu, D., Ley, V., Sobrino, F.,** (2001). Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 75, 3164-3174.
- Blanco, E., Guerra, B., de la Torre, B.G., Defaus, S., Dekker, A., Andreu, D., Sobrino, F.,** (2016). Full protection of swine against foot-and-mouth disease by a bivalent B-cell epitope dendrimer peptide. *Antiviral Res* 129, 74-80.
- Blanco, E., McCullough, K., Summerfield, A., Fiorini, J., Andreu, D., Chiva, C., Borrás, E., Barnett, P., Sobrino, F.,** (2000). Interspecies major histocompatibility complex-restricted Th cell epitope on foot-and-mouth disease virus capsid protein VP4. *J Virol* 74, 4902-4907.
- Borca, M.V., Fernandez, F.M., Sadir, A.M., Braun, M., Schudel, A.A.,** (1986). Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology* 59, 261-267.
- Borrego, B., Argilagué, J.M., Perez-Martin, E., Dominguez, J., Perez-Filgueira, M., Escribano, J.M., Sobrino, F., Rodriguez, F.,** (2011). A DNA vaccine encoding foot-and-mouth disease virus B and T-cell epitopes targeted to class II swine leukocyte antigens protects pigs against viral challenge. *Antiviral Res* 92, 359-363.
- Brown, C.C., Chinsangaram, J., Grubman, M.J.,** (2000). Type I interferon production in cattle infected with 2 strains of foot-and-mouth disease virus, as determined by in situ hybridization. *Can J Vet Res* 64, 130-133.
- Brown, F.,** (1993). Review of accidents caused by incomplete inactivation of viruses. *Dev Biol Stand* 81, 103-107.
- Bruderer, U., Swam, H., Haas, B., Visser, N., Brocchi, E., Grazioli, S., Esterhuysen, J.J., Vosloo, W., Forsyth, M., Aggarwal, N., Cox, S., Armstrong, R., Anderson, J.,** (2004). Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth-disease: evaluation of an ELISA based on recombinant 3ABC. *Vet Microbiol* 101, 187-197.
- Burman, A., Clark, S., Abrescia, N.G., Fry, E.E., Stuart, D.I., Jackson, T.,** (2006). Specificity of the VP1 GH loop of Foot-and-Mouth Disease virus for alphav integrins. *J Virol* 80, 9798-9810.
- 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.
- Burrows, R., Mann, J.A., Garland, A.J., Greig, A., Goodridge, D.,** (1981). The pathogenesis of natural and simulated natural foot-and-mouth disease infection in cattle. *J Comp Pathol* 91, 599-609.
- Butcher, S.,** (1994). *Cell-mediated Immunity: Recognition of Foreign Peptides Plus Self*. Blackwell Science Ltd.
- Butler, J.E.,** (1998). Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. *Rev Sci Tech* 17, 43-70.
- Butler, J.E., Heyermann, H., Frenyo, L.V., Kiernan, J.,** (1987). The heterogeneity of bovine IgG2. II. The identification of IgG2b. *Immunol Lett* 16, 31-38.
- Callis, J.J.,** (1979). Foot-and-mouth disease--a world problem. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*, 261-269.
- Cao, X., Bergmann, I.E., Fullkrug, R., Beck, E.,** (1995). Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 69, 560-563.
- Capozzo, A.V., Periolo, O.H., Robiolo, B., Seki, C., La Torre, J.L., Grigera, P.R.,** (1997). Total and isotype humoral responses in cattle vaccinated with foot and mouth disease virus

- (FMDV) immunogen produced either in bovine tongue tissue or in BHK-21 cell suspension cultures. *Vaccine* 15, 624-630.
- Carr, B.V., Lefevre, E.A., Windsor, M.A., Inghese, C., Gubbins, S., Prentice, H., Juleff, N.D., Charleston, B.,** (2013). CD4+ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus in vaccinated cattle. *J Gen Virol* 94, 97-107.
- 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., Brown, A.L., Currey, K.M., Newton, S.E., Rowlands, D.J., Carroll, A.R.,** (1987). Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Res* 15, 7067-7079.
- Collen, T.** (1994). Foot-and-mouth disease (aphthovirus): viral T cell epitopes, In: Morrison, M.B.L.G.a.I. (Ed.) *Cell mediated immunity in ruminants*. CRC Press Inc., Boca Raton.
- Collen, T., Dimarchi, R., Doel, T.R.,** (1991). A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *J Immunol* 146, 749-755.
- Cong, W., Jin, H., Jiang, C., Yan, W., Liu, M., Chen, J., Zuo, X., Zheng, Z.,** (2010). Attenuated *Salmonella choleraesuis*-mediated RNAi targeted to conserved regions against foot-and-mouth disease virus in guinea pigs and swine. *Vet Res* 41, 30.
- Cottral, G.E., Bachrach, H.L.,** (1968). Food-and-mouth disease viremia. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc* 72, 383-399.
- Cowan, K.M.,** (1973). Antibody response to viral antigens. *Adv Immunol* 17, 195-253.
- Crotty, S.,** (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29, 621-663.
- Crotty, S., Kersh, E.N., Cannons, J., Schwartzberg, P.L., Ahmed, R.,** (2003). SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 421, 282-287.
- Cubillos, C., de la Torre, B.G., Barcena, J., Andreu, D., Sobrino, F., Blanco, E.,** (2012). Inclusion of a specific T cell epitope increases the protection conferred against foot-and-mouth disease virus in pigs by a linear peptide containing an immunodominant B cell site. *Virology* 9, 66.
- Cubillos, C., de la Torre, B.G., Jakab, A., Clementi, G., Borrás, E., Barcena, J., Andreu, D., Sobrino, F., Blanco, E.,** (2008). Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. *J Virol* 82, 7223-7230.
- 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., Rowlands, D., Stuart, D.,** (1996). Perturbations in the surface structure of A22 Iraq foot-and-mouth disease virus accompanying coupled changes in host cell specificity and antigenicity. *Structure* 4, 135-145.
- 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.
- Chen, J., Lau, Y.F., Lamirande, E.W., Paddock, C.D., Bartlett, J.H., Zaki, S.R., Subbarao, K.,** (2010). Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: CD4+ T cells are important in control of SARS-CoV infection. *J Virol* 84, 1289-1301.
- Chen, W., Yan, W., Du, Q., Fei, L., Liu, M., Ni, Z., Sheng, Z., Zheng, Z.,** (2004). RNA interference targeting VP1 inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice. *J Virol* 78, 6900-6907.

- Chen, Y., Chen, H., Hoffmann, A., Cool, D.R., Diz, D.I., Chappell, M.C., Chen, A.F., Morris, M.,** (2006). Adenovirus-mediated small-interference RNA for in vivo silencing of angiotensin AT1a receptors in mouse brain. *Hypertension* 47, 230-237.
- 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.,** (1998a). Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J Virol* 72, 4454-4457.
- Chinsangaram, J., Koster, M., Grubman, M.J.,** (2001). Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Virol* 75, 5498-5503.
- Chinsangaram, J., Mason, P.W., Grubman, M.J.,** (1998b). Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 16, 1516-1522.
- 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.
- Chinsangaram, J., Piccone, M.E., Grubman, M.J.,** (1999). Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon. *J Virol* 73, 9891-9898.
- Dar, P.A., Suryanaryana, V.S., Nagarajan, G., Reddy, G.R., Dechamma, H.J., Kondabattula, G.,** (2013). DNA prime-protein boost strategy with replicase-based DNA vaccine against foot-and-mouth disease in bovine calves. *Vet Microbiol* 163, 62-70.
- 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.
- 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.
- DiMarchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T., Mowat, N.,** (1986). Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science* 232, 639-641.
- Doedens, J.R., Kirkegaard, K.,** (1995). Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J* 14, 894-907.
- 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.
- Doel, T.R., Gale, C., Brooke, G., DiMarchi, R.,** (1988). Immunization against foot-and-mouth disease with synthetic peptides representing the C-terminal region of VP1. *J Gen Virol* 69 (Pt 9), 2403-2406.
- Doel, T.R., Gale, C., Do Amaral, C.M., Mulcahy, G., Dimarchi, R.,** (1990). Heterotypic protection induced by synthetic peptides corresponding to three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 64, 2260-2264.
- 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.
- Donaldson, A.I., Ferris, N.P.,** (1980). Sites of release of airborne foot-and-mouth disease virus from infected pigs. *Res Vet Sci* 29, 315-319.
- Donaldson, A.I., Gibson, C.F., Oliver, R., Hamblin, C., Kitching, R.P.,** (1987). Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O1 and SAT 2 strains. *Res Vet Sci* 43, 339-346.
- 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.
- Estes, D.M., Brown, W.C.,** (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 90, 1-10.
- Fernandez, N., Festenstein, H., Alonzo, A., Biro, P.A., Labeta, M., Carolan, E., Houlihan, J., Mellor, A., Flavell, R.,** (1986). The expression of murine Qa region gene product(s) in L cell transformants. *Journal of immunogenetics* 13, 425-435.
- Fowler, V., Robinson, L., Bankowski, B., Cox, S., Parida, S., Lawlor, C., Gibson, D., O'Brien, F., Ellefsen, B., Hannaman, D., Takamatsu, H.H., Barnett, P.V.,** (2012). A DNA vaccination regime including protein boost and electroporation protects cattle against foot-and-mouth disease. *Antiviral Res* 94, 25-34.
- Francis, M.J., Fry, C.M., Rowlands, D.J., Bittle, J.L., Houghten, R.A., Lerner, R.A., Brown, F.,** (1987a). Immune response to uncoupled peptides of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* 61, 1-6.
- Francis, M.J., Hastings, G.Z., Brown, F., McDermed, J., Lu, Y.A., Tam, J.P.,** (1991). Immunological evaluation of the multiple antigen peptide (MAP) system using the major immunogenic site of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* 73, 249-254.
- Francis, M.J., Hastings, G.Z., Syred, A.D., McGinn, B., Brown, F., Rowlands, D.J.,** (1987b). Non-responsiveness to a foot-and-mouth disease virus peptide overcome by addition of foreign helper T-cell determinants. *Nature* 330, 168-170.
- Francis, M.J., Ouldrige, E.J., Black, L.,** (1983). Antibody response in bovine pharyngeal fluid following foot-and-mouth disease vaccination and, or, exposure to live virus. *Res Vet Sci* 35, 206-210.
- Frenkel, H.S.,** (1947). The culture of foot and mouth disease on the epithelium of the tongue of bovines. La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'épithelium de la langue des bovidés. *Bull. O.I.E.*, 28 p.
- 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-Briones, M.M., Russell, G.C., Oliver, R.A., Tami, C., Taboga, O., Carrillo, E., Palma, E.L., Sobrino, F., Glass, E.J.,** (2000). Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine* 19, 1167-1171.
- 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.
- Gerber, K., Wimmer, E., Paul, A.V.,** (2001). Biochemical and genetic studies of the initiation of human rhinovirus 2 RNA replication: identification of a cis-replicating element in the coding sequence of 2A(pro). *J Virol* 75, 10979-10990.
- Gerner, W., Hammer, S.E., Wiesmuller, K.H., Saalmuller, A.,** (2009). Identification of major histocompatibility complex restriction and anchor residues of foot-and-mouth disease virus-derived bovine T-cell epitopes. *J Virol* 83, 4039-4050.
- Glass, E.J.,** (2004). Genetic variation and responses to vaccines. *Animal health research reviews* 5, 197-208.
- Glass, E.J., Oliver, R.A., Collen, T., Doel, T.R., Dimarchi, R., Spooner, R.L.,** (1991). MHC class II restricted recognition of FMDV peptides by bovine T cells. *Immunology* 74, 594-599.
- 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.
- Gonzalez-Fernandez, A., Milstein, C.,** (1998). Low antigen dose favours selection of somatic mutants with hallmarks of antibody affinity maturation. *Immunology* 93, 149-153.
- Grubman, M.J., Baxt, B.,** (2004). Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* 17, 465-493.
- Grubman, M.J., Morgan, D.O., Kendall, J., Baxt, B.,** (1985). Capsid intermediates assembled in a foot-and-mouth disease virus genome RNA-programmed cell-free translation system and in infected cells. *J Virol* 56, 120-126.
- Grubman, M.J., Robertson, B.H., Morgan, D.O., Moore, D.M., Dowbenko, D.,** (1984). Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 50, 579-586.
- Gu, Y.X., Gao, Z.L., Zhou, J.H., Zhang, J., Liu, Y.S.,** (2014). Establishment and evaluation of stable cell lines inhibiting foot-and-mouth disease virus by RNA interference. *Biomed Res Int* 2014, 109428.
- Guzman, E., Taylor, G., Charleston, B., Skinner, M.A., Ellis, S.A.,** (2008). An MHC-restricted CD8+ T-cell response is induced in cattle by foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection and also following vaccination with inactivated FMDV. *J Gen Virol* 89, 667-675.
- Haasnoot, P.C., Cupac, D., Berkhout, B.,** (2003). Inhibition of virus replication by RNA interference. *J Biomed Sci* 10, 607-616.
- Hamblin, C., Barnett, I.T., Crowther, J.R.,** (1986). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. II. Application. *J Immunol Methods* 93, 123-129.
- Hamilton-Williams, E.E., Lang, A., Benke, D., Davey, G.M., Wiesmuller, K.H., Kurts, C.,** (2005). Cutting edge: TLR ligands are not sufficient to break cross-tolerance to self-antigens. *J Immunol* 174, 1159-1163.
- 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.
- Hartshorn, K.L., Reid, K.B., White, M.R., Jensenius, J.C., Morris, S.M., Tauber, A.I., Crouch, E.,** (1996). Neutrophil deactivation by influenza A viruses: mechanisms of protection after viral opsonization with collectins and hemagglutination-inhibiting antibodies. *Blood* 87, 3450-3461.
- Haydon, D.T., Samuel, A.R., Knowles, N.J.,** (2001). The generation and persistence of genetic variation in foot-and-mouth disease virus. *Prev Vet Med* 51, 111-124.
- Hedger, R.S., Condy, J.B.,** (1985). Transmission of foot-and-mouth disease from African buffalo virus carriers to bovines. *Vet Rec* 117, 205.
- Hilleman, M.R.,** (2004). Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2, 14560-14566.
- 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.
- Holling, T.M., Schooten, E., van Den Elsen, P.J.,** (2004). Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol* 65, 282-290.
- House, J., Mebus, C.A.,** (1998). Foot-and-mouth disease, Vol United States Animal Health Association. Richmond, 213-224 pp.
- Huber, V.C., Lynch, J.M., Bucher, D.J., Le, J., Metzger, D.W.,** (2001). Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections. *J Immunol* 166, 7381-7388.
- 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.
- Jamal, S.M., Belsham, G.J.,** (2013). Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res* 44, 116.
- Janssen, E.M., Droin, N.M., Lemmens, E.E., Pinkoski, M.J., Bensinger, S.J., Ehst, B.D., Griffith, T.S., Green, D.R., Schoenberger, S.P.,** (2005). CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434, 88-93.
- Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G., Schoenberger, S.P.,** (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.
- Johnson, S., Zhan, Y., Sutherland, R.M., Mount, A.M., Bedoui, S., Brady, J.L., Carrington, E.M., Brown, L.E., Belz, G.T., Heath, W.R., Lew, A.M.,** (2009). Selected Toll-like receptor ligands and viruses promote helper-independent cytotoxic T cell priming by upregulating CD40L on dendritic cells. *Immunity* 30, 218-227.
- Juleff, N., Windsor, M., Lefevre, E.A., Gubbins, S., Hamblin, P., Reid, E., McLaughlin, K., Beverley, P.C., Morrison, I.W., Charleston, B.,** (2009). Foot-and-mouth disease virus can induce a specific and rapid CD4+ T-cell-independent neutralizing and isotype class-switched antibody response in naive cattle. *J Virol* 83, 3626-3636.
- Kahana, R., Kuznetzova, L., Rogel, A., Shemesh, M., Hai, D., Yadin, H., Stram, Y.,** (2004). Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication by small interfering RNA. *J Gen Virol* 85, 3213-3217.
- Kamperschroer, C., Dibble, J.P., Meents, D.L., Schwartzberg, P.L., Swain, S.L.,** (2006). SAP is required for Th cell function and for immunity to influenza. *J Immunol* 177, 5317-5327.
- Karapinar, T., Dabak, D.O., Kuloglu, T., Bulut, H.,** (2010). High cardiac troponin I plasma concentration in a calf with myocarditis. *Can Vet J* 51, 397-399.
- Kim, S.M., Lee, K.N., Park, J.Y., Ko, Y.J., Joo, Y.S., Kim, H.S., Park, J.H.,** (2008). Therapeutic application of RNA interference against foot-and-mouth disease virus in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 80, 178-184.
- Kitching, R.P.,** (1999). Foot-and-mouth disease: current world situation. *Vaccine* 17, 1772-1774.
- 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.
- Kleid, D.G., Yansura, D., Small, B., Dowbenko, D., Moore, D.M., Grubman, M.J., McKercher, P.D., Morgan, D.O., Robertson, B.H., Bachrach, H.L.,** (1981). Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science* 214, 1125-1129.
- 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.
- Knowles, N.J., Samuel, A.R., Davies, P.R., Kitching, R.P., Donaldson, A.I.,** (2001). Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain. *Vet Rec* 148, 258-259.
- Knudsen, R.C., Grocock, C.M., Andersen, A.A.,** (1979). Immunity to foot-and-mouth disease virus in guinea pigs: clinical and immune responses. *Infect Immun* 24, 787-792.
- Kotla, S., Sanghratna Vishanath, B., H, J.D., K, G., V, V.S.S., Reddy, G.R.,** (2016). DNA vaccine (P1-2A-3C-pCDNA) co-administered with Bovine IL-18 gives protective immune response against Foot and Mouth Disease in cattle. *Vet Microbiol* 193, 106-115.
- Kowalczyk, W., Monso, M., de la Torre, B.G., Andreu, D.,** (2011). Synthesis of multiple antigenic peptides (MAPs)-strategies and limitations. *J Pept Sci* 17, 247-251.

- Kupper, H., Keller, W., Kurz, C., Forss, S., Schaller, H., Franze, R., Strohmaier, K., Marquardt, O., Zaslavsky, V.G., Hofschneider, P.H.,** (1981). Cloning of cDNA of major antigen of foot and mouth disease virus and expression in *E. coli*. *Nature* 289, 555-559.
- Lavoria, M.A., Di-Giacomo, S., Bucafusco, D., Franco-Mahecha, O.L., Perez-Filgueira, D.M., Capozzo, A.V.,** (2012). Avidity and subtyping of specific antibodies applied to the indirect assessment of heterologous protection against Foot-and-Mouth Disease Virus in cattle. *Vaccine* 30, 6845-6850.
- Law, M., Hangartner, L.,** (2008). Antibodies against viruses: passive and active immunization. *Current opinion in immunology* 20, 486-492.
- Lea, S., Hernandez, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., et al.,** (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* 2, 123-139.
- Leclerc, C.,** (2003). New approaches in vaccine development. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 26, 329-341.
- Lee, B.O., Hartson, L., Randall, T.D.,** (2003). CD40-deficient, influenza-specific CD8 memory T cells develop and function normally in a CD40-sufficient environment. *J Exp Med* 198, 1759-1764.
- Leippert, M., Beck, E., Weiland, F., Pfaff, E.,** (1997). Point mutations within the betaG-betaH loop of foot-and-mouth disease virus O1K affect virus attachment to target cells. *J Virol* 71, 1046-1051.
- 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.
- Liu, M., Chen, W., Ni, Z., Yan, W., Fei, L., Jiao, Y., Zhang, J., Du, Q., Wei, X., Chen, J., Liu, Y., Zheng, Z.,** (2005). Cross-inhibition to heterologous foot-and-mouth disease virus infection induced by RNA interference targeting the conserved regions of viral genome. *Virology* 336, 51-59.
- Liu, T., Chambers, T.J.,** (2001). Yellow fever virus encephalitis: properties of the brain-associated T-cell response during virus clearance in normal and gamma interferon-deficient mice and requirement for CD4+ lymphocytes. *J Virol* 75, 2107-2118.
- 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.
- Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R., Newman, J., Parry, N., et al.,** (1993). Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature* 362, 566-568.
- Lopez de Quinto, S., Saiz, M., de la Morena, D., Sobrino, F., Martinez-Salas, E.,** (2002). IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res* 30, 4398-4405.
- Mach, J.P., Pahud, J.J.,** (1971). Secretory IgA, a major immunoglobulin in most bovine external secretions. *J Immunol* 106, 552-563.
- Mahapatra, M., Hamblin, P., Paton, D.J.,** (2012). Foot-and-mouth disease virus epitope dominance in the antibody response of vaccinated animals. *J Gen Virol* 93, 488-493.
- Marc, D., Girard, M., van der Werf, S.,** (1991). A Gly1 to Ala substitution in poliovirus capsid protein VP0 blocks its myristoylation and prevents viral assembly. *J Gen Virol* 72 (Pt 5), 1151-1157.
- 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.
- Mason, P.W., Bezborodova, S.V., Henry, T.M.,** (2002). Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 76, 9686-9694.

- Mason, P.W., Grubman, M.J., Baxt, B.,** (2003). Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* 91, 9-32.
- Mason, P.W., Piccone, M.E., McKenna, T.S., Chinsangaram, J., Grubman, M.J.,** (1997). Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* 227, 96-102.
- Matsumoto, M., McKercher, P.D., Nusbaum, K.E.,** (1978). Secretory antibody responses in cattle infected with foot-and-mouth disease virus. *Am J Vet Res* 39, 1081-1087.
- McCausland, M.M., Yusuf, I., Tran, H., Ono, N., Yanagi, Y., Crotty, S.,** (2007). SAP regulation of follicular helper CD4 T cell development and humoral immunity is independent of SLAM and Fyn kinase. *J Immunol* 178, 817-828.
- McCullough, K.C., Bruckner, L., Schaffner, R., Fraefel, W., Muller, H.K., Kihm, U.,** (1992a). Relationship between the anti-FMD virus antibody reaction as measured by different assays, and protection in vivo against challenge infection. *Vet Microbiol* 30, 99-112.
- McCullough, K.C., Crowther, J.R., Butcher, R.N., Carpenter, W.C., Brocchi, E., Capucci, L., De Simone, F.,** (1986). Immune protection against foot-and-mouth disease virus studied using virus-neutralizing and non-neutralizing concentrations of monoclonal antibodies. *Immunology* 58, 421-428.
- McCullough, K.C., De Simone, F., Brocchi, E., Capucci, L., Crowther, J.R., Kihm, U.,** (1992b). Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J Virol* 66, 1835-1840.
- McCullough, K.C., Parkinson, D., Crowther, J.R.,** (1988). Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* 65, 187-191.
- McGuire, T.C., Musoke, A.J., Kurtti, T.,** (1979). Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology* 38, 249-256.
- McKenna, T.S., Lubroth, J., Rieder, E., Baxt, B., Mason, P.W.,** (1995). Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J Virol* 69, 5787-5790.
- McVicar, J.W., Suttmoller, P.,** (1976). Growth of foot-and-mouth disease virus in the upper respiratory tract of non-immunized, vaccinated, and recovered cattle after intranasal inoculation. *J Hyg (Lond)* 76, 467-481.
- Mena, A., Ioannou, X.P., Van Kessel, A., Van Drunen Little-Van Den Hurk, S., Popowych, Y., Babiuk, L.A., Godson, D.L.,** (2002). Th1/Th2 biasing effects of vaccination in cattle as determined by real-time PCR. *J Immunol Methods* 263, 11-21.
- Mignaqui, A.C., Ruiz, V., Perret, S., St-Laurent, G., Singh Chahal, P., Transfiguracion, J., Sammarruco, A., Gnazzo, V., Durocher, Y., Wigdorovitz, A.,** (2013). Transient gene expression in serum-free suspension-growing mammalian cells for the production of foot-and-mouth disease virus empty capsids. *PLoS One* 8, e72800.
- Mingxiao, M., Ningyi, J., Juan, L.H., Min, Z., Guoshun, S., Guangze, Z., Huijun, L., Xiaowei, H., Minglan, J., Xu, L., Haili, M., Yue, J., Gefen, Y., Kuoshi, J.,** (2007). Immunogenicity of plasmids encoding P12A and 3C of FMDV and swine IL-18. *Antiviral Res* 76, 59-67.
- Monso, M., de la Torre, B.G., Blanco, E., Moreno, N., Andreu, D.,** (2013). Influence of conjugation chemistry and B epitope orientation on the immune response of branched peptide antigens. *Bioconjugate chemistry* 24, 578-585.
- Monso, M., Kowalczyk, W., Andreu, D., de la Torre, B.G.,** (2012). Reverse thioether ligation route to multimeric peptide antigens. *Organic & biomolecular chemistry* 10, 3116-3121.
- 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.
- Moraes, M.P., Mayr, G.A., Mason, P.W., Grubman, M.J.,** (2002). Early protection against homologous challenge after a single dose of replication-defective human adenovirus

- type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24. *Vaccine* 20, 1631-1639.
- Moreno, C.A., Rodriguez, R., Oliveira, G.A., Ferreira, V., Nussenzweig, R.S., Moya Castro, Z.R., Calvo-Calle, J.M., Nardin, E.,** (1999). Preclinical evaluation of a synthetic *Plasmodium falciparum* MAP malaria vaccine in Aotus monkeys and mice. *Vaccine* 18, 89-99.
- Moscufo, N., Simons, J., Chow, M.,** (1991). Myristoylation is important at multiple stages in poliovirus assembly. *J Virol* 65, 2372-2380.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L.,** (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- 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.
- Mueller, S.N., Jones, C.M., Stock, A.T., Suter, M., Heath, W.R., Carbone, F.R.,** (2006). CD4+ T cells can protect APC from CTL-mediated elimination. *J Immunol* 176, 7379-7384.
- Nardin, E.H., Calvo-Calle, J.M., Oliveira, G.A., Nussenzweig, R.S., Schneider, M., Tiercy, J.M., Loutan, L., Hochstrasser, D., Rose, K.,** (2001). A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing *Plasmodium falciparum* B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. *J Immunol* 166, 481-489.
- Nardin, E.H., Oliveira, G.A., Calvo-Calle, J.M., Castro, Z.R., Nussenzweig, R.S., Schmeckpeper, B., Hall, B.F., Diggs, C., Bodison, S., Edelman, R.,** (2000). Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. *The Journal of infectious diseases* 182, 1486-1496.
- Noelle, R.J., Snow, E.C.,** (1990). Cognate interactions between helper T cells and B cells. *Immunol Today* 11, 361-368.
- Nomoto, A., Kitamura, N., Golini, F., Wimmer, E.,** (1977). The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5345-5349.
- Northrop, J.K., Thomas, R.M., Wells, A.D., Shen, H.,** (2006). Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN-gamma loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells. *J Immunol* 177, 1062-1069.
- 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.
- Novy, P., Quigley, M., Huang, X., Yang, Y.,** (2007). CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. *J Immunol* 179, 8243-8251.
- 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.
- Obar, J.J., Molloy, M.J., Jellison, E.R., Stoklasek, T.A., Zhang, W., Usherwood, E.J., Lefrancois, L.,** (2010). CD4+ T cell regulation of CD25 expression controls development of short-lived effector CD8+ T cells in primary and secondary responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 193-198.
- Oh, Y., Fleming, L., Statham, B., Hamblin, P., Barnett, P., Paton, D.J., Park, J.H., Joo, Y.S., Parida, S.,** (2012). Interferon-gamma induced by in vitro re-stimulation of CD4+ T-cells correlates with in vivo FMD vaccine induced protection of cattle against disease and persistent infection. *PLoS One* 7, e44365.
- OIE.** (2017). Foot-and-mouth disease (infection with Foot-and-mouth disease virus), In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*.

- Oleksiewicz, M.B., Donaldson, A.I., Alexandersen, S.,** (2001). Development of a novel real-time RT-PCR assay for quantitation of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues. *J Virol Methods* 92, 23-35.
- OMC,** (2015). DS447: United States — Measures Affecting the Importation of Animals, Meat and Other Animal Products from Argentina. DISPUTE SETTLEMENT https://www.wto.org/english/tratop_e/dispu_e/cases_e/ds447_e.htm.
- Pacheco, J.M., Arzt, J., Rodriguez, L.L.,** (2010). Early events in the pathogenesis of foot-and-mouth disease in cattle after controlled aerosol exposure. *Veterinary journal* 183, 46-53.
- 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.
- PANAFTOSA,** (1978). Dirección de Lucha Contra la Fiebre Aftosa: prueba de potencia para vacunas contra la fiebre aftosa de adyuvante oleoso: ensayos de DP50 en cobayos y bovinos de una vacuna preparada en forma semi-industrial con una emulsión del tipo agua en aceite. *Bol. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 20-30, 55-59.
- Parida, S., Anderson, J., Cox, S.J., Barnett, P.V., Paton, D.J.,** (2006). Secretory IgA as an indicator of oro-pharyngeal foot-and-mouth disease virus replication and as a tool for post vaccination surveillance. *Vaccine* 24, 1107-1116.
- 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.
- Pastoret, P.-P.** (1998). XIII - IMMUNOLOGY OF CATTLE - In: Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (Eds.) *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press, San Diego, 439- 484.
- Paul, A.V., Molla, A., Wimmer, E.,** (1994). Studies of a putative amphipathic helix in the N-terminus of poliovirus protein 2C. *Virology* 199, 188-199.
- Paul, A.V., Rieder, E., Kim, D.W., van Boom, J.H., Wimmer, E.,** (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* 74, 10359-10370.
- 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.
- Pega, J., Bucafusco, D., Di Giacomo, S., Schammas, J.M., Malacari, D., Capozzo, A.V., Arzt, J., Perez-Beascochea, C., Maradei, E., Rodriguez, L.L., Borca, M.V., Perez-Filgueira, M.,** (2013). Early adaptive immune responses in the respiratory tract of foot-and-mouth disease virus-infected cattle. *J Virol* 87, 2489-2495.
- Pega, J., Di Giacomo, S., Bucafusco, D., Schammas, J.M., Malacari, D., Barrionuevo, F., Capozzo, A.V., Rodriguez, L.L., Borca, M.V., Perez-Filgueira, M.,** (2015). Systemic Foot-and-Mouth Disease Vaccination in Cattle Promotes Specific Antibody-Secreting Cells at the Respiratory Tract and Triggers Local Anamnestic Responses upon Aerosol Infection. *J Virol* 89, 9581-9590.
- Pfaff, E., Mussgay, M., Bohm, H.O., Schulz, G.E., Schaller, H.,** (1982). Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot and mouth disease virus. *EMBO J* 1, 869-874.
- 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.
- Piccone, M.E., Rieder, E., Mason, P.W., Grubman, M.J.,** (1995). The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J Virol* 69, 5376-5382.
- Porta, C., Xu, X., Loureiro, S., Paramasivam, S., Ren, J., Al-Khalil, T., Burman, A., Jackson, T., Belsham, G.J., Curry, S., Lomonosoff, G.P., Parida, S., Paton, D., Li, Y., Wilsden, G., Ferris, N., Owens, R., Kotecha, A., Fry, E., Stuart, D.I., Charleston, B., Jones, I.M.,** (2013). Efficient production of foot-and-mouth disease virus empty capsids in insect cells following down regulation of 3C protease activity. *J Virol Methods* 187, 406-412.

- 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.
- Porter, D.C., Ansardi, D.C., Choi, W.S., Morrow, C.D., (1993a). Encapsidation of genetically engineered poliovirus minireplicons which express human immunodeficiency virus type 1 Gag and Pol proteins upon infection. *J Virol* 67, 3712-3719.
- Porter, D.C., Ansardi, D.C., Lentz, M.R., Morrow, C.D., (1993b). Expression of poliovirus P3 proteins using a recombinant vaccinia virus results in proteolytically active 3CD precursor protein without further processing to 3Cpro and 3Dpol. *Virus Res* 29, 241-254.
- 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.
- Quattrocchi, V., Pappalardo, J.S., Langellotti, C., Smitsaart, E., Fondevila, N., Zamorano, P., (2014). Early protection against foot-and-mouth disease virus in cattle using an inactivated vaccine formulated with Montanide ESSAI IMS D 12802 VG PR adjuvant. *Vaccine* 32, 2167-2172.
- Racaniello, V.R. (2001). Picornaviridae: The Virus and Their Replication, In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.) *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins., Philadelphia, PA, USA.
- Rai, R., Das, B., Choudhary, N., Talukdar, A., Rao, D.N., (2015). MAP of F1 and V antigens from *Yersinia pestis* astride innate and adaptive immune response. *Microb Pathog* 87, 13-20.
- Reed, L.J., Muench, H., (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* 27, 493-497.
- Restifo, N.P., Ying, H., Hwang, L., Leitner, W.W., (2000). The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Ther* 7, 89-92.
- Riberdy, J.M., Christensen, J.P., Branum, K., Doherty, P.C., (2000). Diminished primary and secondary influenza virus-specific CD8(+) T-cell responses in CD4-depleted Ig(-/-) mice. *J Virol* 74, 9762-9765.
- Rigden, R.C., Carrasco, C.P., Barnett, P.V., Summerfield, A., McCullough, K.C., (2003). Innate immune responses following emergency vaccination against foot-and-mouth disease virus in pigs. *Vaccine* 21, 1466-1477.
- 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.
- Rodriguez-Carreno, M.P., Lopez-Fuertes, L., Revilla, C., Ezquerro, A., Alonso, F., Dominguez, J., (2002). Phenotypic characterization of porcine IFN-gamma-producing lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* 259, 171-179.
- Rodriguez, L.L., Barrera, J., Kramer, E., Lubroth, J., Brown, F., Golde, W.T., (2003). A synthetic peptide containing the consensus sequence of the G-H loop region of foot-and-mouth disease virus type-O VP1 and a promiscuous T-helper epitope induces peptide-specific antibodies but fails to protect cattle against viral challenge. *Vaccine* 21, 3751-3756.
- 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.
- Rowlands, D., (2004). Foot-and-mouth disease virus peptide vaccines. *Foot-and- Mouth Disease: Current Perspectives*. Norfolk, UK: Horizon Bioscience, 335-354.
- 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.
- Ryan, M.D., Drew, J., (1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J* 13, 928-933.

- Sakamoto, K., Yoshida, K.,** (2002). Recent outbreaks of foot and mouth disease in countries of east Asia. *Rev Sci Tech* 21, 459-463.
- Salt, J.S., Mulcahy, G., Kitching, R.P.,** (1996). Isotype-specific antibody responses to foot-and-mouth disease virus in sera and secretions of "carrier" and "non-carrier" cattle. *Epidemiol Infect* 117, 349-360.
- Samuel, A.R., Knowles, N.J.,** (2001). Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). *J Gen Virol* 82, 609-621.
- Sangar, D.V., Newton, S.E., Rowlands, D.J., Clarke, B.E.,** (1987). All foot and mouth disease virus serotypes initiate protein synthesis at two separate AUGs. *Nucleic Acids Res* 15, 3305-3315.
- Sarnow, P.,** (1989). Role of 3'-end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made in vitro. *J Virol* 63, 467-470.
- Schutta, C., Barrera, J., Pisano, M., Zsak, L., Grubman, M.J., Mayr, G.A., Moraes, M.P., Kamicker, B.J., Brake, D.A., ETTYREDDY, D., Brough, D.E., Butman, B.T., Neilan, J.G.,** (2015). Multiple efficacy studies of an adenovirus-vectored foot-and-mouth disease virus serotype A24 subunit vaccine in cattle using homologous challenge. *Vaccine*.
- Segundo, F.D., Weiss, M., Perez-Martin, E., Dias, C.C., Grubman, M.J., Santos Tde, L.,** (2012). Inoculation of swine with foot-and-mouth disease SAP-mutant virus induces early protection against disease. *J Virol* 86, 1316-1327.
- Sellers, R.F.,** (1963). Multiplication, interferon production and sensitivity of virulent and attenuated strains of the virus of foot-and-mouth disease. *Nature* 198, 1228-1229.
- Sellers, R.F., Herniman, K.A., Donaldson, A.I.,** (1971). The effects of killing or removal of animals affected with foot-and-mouth disease on the amounts of airborne virus present in looseboxes. *Br Vet J* 127, 358-365.
- Sellers, R.F., Parker, J.,** (1969). Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *J Hyg (Lond)* 67, 671-677.
- Sette, A., Moutaftsi, M., Moyron-Quiroz, J., McCausland, M.M., Davies, D.H., Johnston, R.J., Peters, B., Ráfii-El-Idrissi Benhnia, M., Hoffmann, J., Su, H.P., Singh, K., Garboczi, D.N., Head, S., Grey, H., Felgner, P.L., Crotty, S.,** (2008). Selective CD4+ T cell help for antibody responses to a large viral pathogen: deterministic linkage of specificities. *Immunity* 28, 847-858.
- Shah, S.M., Ravi Kumar, G.V., Brah, G.S., Santra, L., Pawar, H.,** (2012). Differential Expression of Th1- and Th2- Type Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Murrah Buffalo (*Bubalus Bubalis*) on TLR2 Induction by *B. Subtilis* Peptidoglycan. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 25, 1021-1028.
- Shedlock, D.J., Shen, H.,** (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339.
- Smith, C.M., Wilson, N.S., Waithman, J., Villadangos, J.A., Carbone, F.R., Heath, W.R., Belz, G.T.,** (2004). Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* 5, 1143-1148.
- 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.
- Strebel, K., Beck, E.,** (1986). A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 58, 893-899.
- 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.
- Sun, J.C., Bevan, M.J.,** (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-342.

- Surovoi, A., Vol'pina, O.M., Snetkova, E.V., Volkova, T.D., Ivanov, V.T., (1988).** [Antigenic structure of the foot-and-mouth-disease virus. I. Synthesis of protective peptides from the major immunogenic region of VP1 protein of foot-and-mouth virus type O1K]. *Bioorg Khim* 14, 1352-1362.
- Sutmoller, P., Barteling, S.S., Olascoaga, R.C., Sumption, K.J., (2003).** Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res* 91, 101-144.
- Taboga, O., Tami, C., Carrillo, E., Nunez, J.I., Rodriguez, A., Saiz, J.C., Blanco, E., Valero, M.L., Roig, X., Camarero, J.A., Andreu, D., Mateu, M.G., Giralt, E., Domingo, E., Sobrino, F., Palma, E.L., (1997).** A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J Virol* 71, 2606-2614.
- Tarradas, J., Monso, M., Munoz, M., Rosell, R., Fraile, L., Frias, M.T., Domingo, M., Andreu, D., Sobrino, F., Ganges, L., (2011).** Partial protection against classical swine fever virus elicited by dendrimeric vaccine-candidate peptides in domestic pigs. *Vaccine* 29, 4422-4429.
- Thomsen, A.R., Nansen, A., Andersen, C., Johansen, J., Marker, O., Christensen, J.P., (1997).** Cooperation of B cells and T cells is required for survival of mice infected with vesicular stomatitis virus. *Int Immunol* 9, 1757-1766.
- Ulmer, J.B., Deck, R.R., Dewitt, C.M., Donnhly, J.I., Liu, M.A., (1996).** Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 89, 59-67.
- Ulmer, J.B., Fu, T.M., Deck, R.R., Friedman, A., Guan, L., DeWitt, C., Liu, X., Wang, S., Liu, M.A., Donnelly, J.J., Caulfield, M.J., (1998).** Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J Virol* 72, 5648-5653.
- USDA, (2014).** Livestock and Poultry: World Markets and Trade (October 14). <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/fas/livestock-poultry-ma//2010s/2014/livestock-poultry-ma-10-17-2014.pdf>.
- van Kuppeveld, F.J., Hoenderop, J.G., Smeets, R.L., Willems, P.H., Dijkman, H.B., Galama, J.M., Melchers, W.J., (1997).** Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J* 16, 3519-3532.
- Van Lierop, M.J., Nilsson, P.R., Wagenaar, J.P., Van Noort, J.M., Campbell, J.D., Glass, E.J., Joosten, I., Hensen, E.J., (1995a).** The influence of MHC polymorphism on the selection of T-cell determinants of FMDV in cattle. *Immunology* 84, 79-85.
- van Lierop, M.J., van Noort, J.M., Wagenaar, J.P., Rutten, V.P., Langeveld, J., Meloen, R.H., Hensen, E.J., (1994).** T cell-stimulatory fragments of foot-and-mouth disease virus released by mild treatment with cathepsin D. *J Gen Virol* 75 (Pt 11), 2937-2946.
- van Lierop, M.J., Wagenaar, J.P., van Noort, J.M., Hensen, E.J., (1995b).** 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.
- Verdaguer, N., Fita, I., Domingo, E., Mateu, M.G., (1997).** Efficient neutralization of foot-and-mouth disease virus by monovalent antibody binding. *J Virol* 71, 9813-9816.
- Verdaguer, N., Mateu, M.G., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E., Fita, I., (1995).** Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *EMBO J* 14, 1690-1696.

- Vilcek, J.T.**, (1996). Cytokines in 1995. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 103-106.
- Vogel, T., Kurth, R., Norley, S.**, (1994). The majority of neutralizing Abs in HIV-1-infected patients recognize linear V3 loop sequences. Studies using HIV-1MN multiple antigenic peptides. *J Immunol* 153, 1895-1904.
- Vol'pina, O.M., Surovoi, A., Ul'iashin, V.V., Ivanov, V.T., Chepurkin, A.V.**, (1988). [Antigenic structure of the foot-and-mouth disease virus. II. Synthesis of protective peptides from the major immunogenic region of VP1 protein of foot-and-mouth disease virus type A22]. *Bioorg Khim* 14, 1363-1371.
- Walker, M.C., Fast, P.E.**, (1994). Clinical trials of candidate AIDS vaccines. *AIDS* 8, S213-S236.
- Wang, B., Boyer, J., Srikantan, V., Coney, L., Carrano, R., Phan, C., Merva, M., Dang, K., Agadjanian, 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.
- Wang, X., Zhang, X., Kang, Y., Jin, H., Du, X., Zhao, G., Yu, Y., Li, J., Su, B., Huang, C., Wang, B.**, (2008). Interleukin-15 enhance DNA vaccine elicited mucosal and systemic immunity against foot and mouth disease virus. *Vaccine* 26, 5135-5144.
- Ward, G., Rieder, E., Mason, P.W.**, (1997). Plasmid DNA encoding replicating foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine. *J Virol* 71, 7442-7447.
- Wigdorovitz, A., Sadir, A.**, (1996). [Mechanisms involved in the prolonged humoral immune response: behavior of aphthous fever virus]. *Rev Argent Microbiol* 28, 45-54.
- Williams, M.A., Tzysnik, A.J., Bevan, M.J.**, (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 441, 890-893.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P.L.**, (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-1468.
- Wong, H.T., Cheng, S.C., Sin, F.W., Chan, E.W., Sheng, Z.T., Xie, Y.**, (2002). A DNA vaccine against foot-and-mouth disease elicits an immune response in swine which is enhanced by co-administration with interleukin-2. *Vaccine* 20, 2641-2647.
- 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.
- Xu, Y.F., Shen, H.Y., Zhao, M.Q., Chen, L.J., Li, Y.G., Liao, M., Jia, J.T., Lv, Y.R., Yi, L., Chen, J.D.**, (2012). Adenovirus-vectored shRNAs targeted to the highly conserved regions of VP1 and 2B in tandem inhibits replication of foot-and-mouth disease virus both in vitro and in vivo. *J Virol Methods* 181, 51-58.
- Yafal, A.G., Palma, E.L.**, (1979). Morphogenesis of foot-and-mouth disease virus. I. Role of procapsids as virion Precursors. *J Virol* 30, 643-649.
- 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.
- Zamorano, P.I., Wigdorovitz, A., Perez Filgueira, D.M., Escribano, J.M., Sadir, A.M., Borca, M.V.**, (1998). Induction of anti foot and mouth disease virus T and B cell responses in cattle immunized with a peptide representing ten amino acids of VP1. *Vaccine* 16, 558-563.
- 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, L., Miao, L., Gong, X., Zhang, H., Yang, L., Shi, Y., Kong, W., Jiang, C., Shan, Y.,** (2013). Multiple antigen peptide mimetics containing gp41 membrane-proximal external region elicit broad neutralizing antibodies against human immunodeficiency virus type 1 in guinea pigs. *J Pept Sci* 19, 491-498.
- Zhang, Z., Alexandersen, S.,** (2004). Quantitative analysis of foot-and-mouth disease virus RNA loads in bovine tissues: implications for the site of viral persistence. *J Gen Virol* 85, 2567-2575.
- Zhang, Z.D., Hutching, G., Kitching, P., Alexandersen, S.,** (2002). The effects of gamma interferon on replication of foot-and-mouth disease virus in persistently infected bovine cells. *Arch Virol* 147, 2157-2167.
- Zhang, Z.D., Kitching, R.P.,** (2001). The localization of persistent foot and mouth disease virus in the epithelial cells of the soft palate and pharynx. *J Comp Pathol* 124, 89-94.
- Zhao, Q., Pacheco, J.M., Mason, P.W.,** (2003). Evaluation of genetically engineered derivatives of a Chinese strain of foot-and-mouth disease virus reveals a novel cell-binding site which functions in cell culture and in animals. *J Virol* 77, 3269-3280.
- Zinkernagel, R.M.,** (2003). On natural and artificial vaccinations. *Annu Rev Immunol* 21, 515-546.
- Zou, Q., Wu, B., He, X., Zhang, Y., Kang, Y., Jin, J., Xu, H., Liu, H., Wang, B.,** (2010). Increasing a robust antigen-specific cytotoxic T lymphocyte response by FMDV DNA vaccination with IL-9 expressing construct. *J Biomed Biotechnol* 2010, 562356.