

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis presentada para acceder al grado académico de Doctor en Ciencias
Biológicas

**Amplicones y partículas replicantes defectivas derivadas
del virus Herpes simplex tipo 1 como vectores
transgénicos de proteínas de patógenos de humanos y
animales**

Carlos Adolfo Palacios

Directora de Tesis: Dra. Nora Mattion

Co-director de Tesis: Dr. Juan Claus

Lugar de realización: Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein – Centro de Virología
Animal – CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

-2016-

Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos..
Eduardo Galeano

Agradecimientos

A la Dra. Nora Mattion, por haberme dado la posibilidad de desarrollar la tesis de doctorado en el laboratorio, de transmitir sus conocimientos y ayudarme a seguir adelante en este proyecto. Por la paciencia que siempre tuvo conmigo escuchando siempre mis ideas, brindando sus aportes constructivos continuamente, y principalmente en esta última etapa de la tesis.

Al Dr. Juan Claus por permitirme ser parte del Proyecto HEVAR, y por su colaboración junto a la Dra. Verónica Gioria con el trabajo de tesis, además de la valiosa ayuda con los trámites académicos que precisé de la FBCB.

Un agradecimiento especial a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por todos estos años de formación desde la carrera de grado hasta el presente.

Al Dr. José La Torre por las conversaciones y discusiones sobre el trabajo en el laboratorio y de la vida, por haber apoyado siempre, y ser motor de, lo que él llamaba “*caos creador*” dentro del laboratorio, aportando su experiencia y conocimientos.

A todos los integrantes del Proyecto HEVAR, principalmente al Dr. Cornel Fraefel, Dra. Catherine Eichwald del Instituto de Virología de la UZH, Dr. Peggy Marconi de la Universidad de Ferrara, al Dr. Juan Arbiza de Universidad de la República, al Dr. Alberto Epstein y al Proyecto HEVAR por el soporte económico para realizar este trabajo.

Al CONICET por apoyar la formación en el ámbito científico mediante becas doctorales.

Al grupo de investigación del Laboratorio de Virología e Inmunología de la Universidad de Quilmes, especialmente a Dres. Graciela Glikmann, Alejandro Castelo, Laura Esteban, Marcelo Argüelles y especialmente a Dra. Rosana Rota por su colaboración y apoyo durante todos estos años.

A los compañeros del laboratorio, los que siguen en el CEVAN, y los que andan por otros labs, con quienes he compartido varios años de laboratorio: Adri, Ale, Cari, Dani, Euge, Eduardo, Flavia, Gilda, Juan C., Jesica, Lore B, Lore O, Marinator, Maxx, Norita, Paula, Sabri, Seba, Vero. Por su compañerismo, amistad y cariño brindado todos estos años. A todo el personal del CEVAN por su apoyo a los doctorandos e investigadores.

A los integrantes del Laboratorio de Inmunología de la EE-INTA Rafaela, particularmente a Susana, Caro, Euge, Paola, Trichi, y demás colegas, por su colaboración en todo lo que precisé y su cálida recepción en su laboratorio.

A mis compañeros de la Cátedra de Virología, Cari, Caro, Cris, Danilo, Fio, Marcelo, Mike, Nicky, Sabri, por su ayuda continua en la vida académica, y en particular a Leandro, por brindar su experiencia con el trabajo en animales.

A mis compañeros de trabajo en FPC, Ana, Anita, Alejo, Clau, Dai, Eze, Santi, por su continuo apoyo, y también por facilitar el trabajo diario.

A mis amigos de Esperanza, lugar del cual tengo muchas añoranzas. A mis amigos, Diego, Marcelo, Martín, Samuel, que son los provincianos con los que compartimos nuestra amistad aquí en esta jungla de cemento.

Este trabajo es especialmente dedicado a mis padres, y a toda mi familia por el amor y cariño que me brindan siempre, por enseñarme a recorrer la vida en busca de

mis ideales e ir atrás de mis sueños, y siempre promoviendo la superación en todos los aspectos de mi vida.

À família De Borba, pelo carinho e apoio, esse alvo foi atingido também graças a vocês, obrigado por tanto amor.

Por último, el principal agradecimiento es para vos Lu, por tu ayuda y colaboración en todos los aspectos de mi vida por darme tanta felicidad en la vida, por el amor que compartimos y que se plasma hoy en Joaquin.

Índice

Abreviaturas y símbolos	7
Resumen	10
Summary.....	12
Índice de figuras.....	14
1 Introducción	21
1.1 Vectores herpéticos	22
1.2 Rotavirus	31
1.3 Anaplasmosis	40
1.4 Virus de la Fiebre Aftosa	45
2 Hipótesis	50
3 Objetivos	51
3.1 Objetivo general.....	51
3.2 Objetivos específicos	51
4 Materiales y métodos.....	52
4.1 Líneas celulares	52
4.1.1 Vero (ATCC: CCL-81TM)	52
4.1.2 Vero-7b.....	52
4.1.3 Vero 2-2.....	52
4.1.4 Gli36.....	52
4.1.5 MA104 (ATCC:CRL-2378)	52
4.1.6 MDBK (ATCC:CCL-22TM)	53
4.1.7 CV-1 (ATCC: CCL-70TM)	53
4.2 Cultivo de células.....	53
4.3 Rotavirus	54
4.3.1 Propagación de RVs.....	54
4.3.2 Obtención de ARN de RVs.....	54
4.4 Vectores virales.....	55
4.4.1 Virus recombinante T0ZGFP	55
4.4.2 Virus recombinante TORRVVP6.....	55
4.4.3 Virus recombinante TOECVP6	56
4.4.4 HSV-1 LaLAJ.....	56

4.4.5	HSV-BAC1	56
4.4.6	HSV-BAC2	57
4.4.7	HSV-BAC [Δ pac Δ 27/RGD]	57
4.5	Plásmidos	57
4.5.1	pGEM [®] -T Easy	57
4.5.2	pEBHICP27.....	58
4.5.3	pAEUA2	58
4.5.4	pHSV-EGFP.....	58
4.5.5	pHSV-Doble-EGFP	58
4.5.6	pHSV-IRES-EGFP	59
4.5.7	pCI-neo.....	59
4.5.8	pcDNA4 His/Max.....	59
4.5.9	pRSETA.....	59
4.5.10	pMAL-c2X	59
4.5.11	pgalK.....	60
4.6	Técnicas generales de biología molecular	60
4.7	Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas.	60
4.8	Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	61
4.9	Preparación de <i>Escherichia coli</i> competentes	61
4.9.1	Preparación de bacterias químicamente-competentes.....	61
4.9.2	Preparación de electro-competentes	62
4.10	Transformación de <i>Escherichia coli</i>	62
4.10.1	Choque térmico.....	62
4.10.2	Electroporación	62
4.11	Preparación de ADN plasmídico.....	63
4.11.1	Minipreparación	63
4.11.2	Maxipreparación	64
4.12	Anticuerpos utilizados.....	65
4.13	Obtención de los plásmidos amplicón que expresan genes de RVs de humanos ...	67
4.13.1	Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-VP6/EGFP].....	67
4.13.2	Construcción del plásmido amplicón doble [pHSV-VP6/VP2/EGFP]	68
4.13.2.1	Primera etapa: subclonado de Wa-VP6 en plásmido [pHSV-Doble-EGFP].....	68
4.13.2.2	Segunda etapa: subclonado de WaVP2 en plásmido [pHSV-VP6/Doble/GFP] 70	
4.13.3	Construcción del plásmido amplicón doble [pHSV-VP7/VP4/EGFP]	71
4.13.3.1	Primera etapa: subclonado de Wa-VP7 en el plásmido [pHSV-Doble-EGFP]:..	71
4.13.3.2	Segunda etapa: subclonado de Wa-VP4 en el plásmido: [pHSV-Doble/VP7]: .	73

4.13.4	Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-VP2/EGFP].....	74
4.13.5	Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-VP4/EGFP].....	76
4.13.6	Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-NSP4/EGFP].....	77
4.13.7	Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-VP6C-EGFP].....	78
4.14	Construcción de plásmidos para expresión de VP6 de rotavirus del grupo C.....	78
4.14.1	Análisis de colonias [pCI-neo/HA-VP6C] y [pCI-neo/VP6C-HA].....	79
4.14.2	Obtención de una vacuna a ADN para VP6C ([pCI/HA-VP6C]).....	79
4.15	Obtención del plásmido amplicón para la expresión del antígeno MSP5 de A.	
<i>marginale</i>	80
4.15.1	Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-MSP5/EGFP]	80
4.16	Producción de vectores amplicón.....	81
4.16.1	Vector amplicón empaquetado con virus “ <i>helper</i> ”	81
4.16.1.1	Transfección con plásmido amplicón	81
4.16.1.2	Infección con HSV-1 La Δ J, Pasaje 0.....	82
4.16.1.3	Determinación de títulos de vector amplicón, virus <i>helper</i> y revertantes	82
4.16.1.4	Amplificado de stocks de Pasaje 0 a Pasaje 1	83
4.16.2	Vectores amplicón empaquetados por el sistema “ <i>helper free</i> ”	84
4.16.2.1	Co-transfección de células y cosecha de vectores “ <i>helper free</i> ”	84
4.16.2.2	Concentrado de vector amplicón	85
4.16.2.3	Titulación de vectores amplicón “ <i>helper free</i> ”	85
4.17	Generación de virus recombinante para “<i>Display</i>” de epítopes	85
4.17.1	Recombinación BAC con cepa SW102 y selección con galK.....	85
4.17.2	Generación del fragmento de transferencia de galK y de RGD.....	85
4.17.3	Preparación de E. coli SW102 electrocompetentes.....	86
4.17.4	Electroporación de HSV-BAC2 en E. coli SW102.....	87
4.17.5	Electroporación del casete galK ⁺ en el genoma de HSV-BAC2	87
4.17.6	Inserción del casete gC-RGD en el genoma de HSV-BAC2/galK ⁺	88
4.17.7	Aislamiento y caracterización de ADN de clones de HSV-BAC2/RGD.....	89
4.17.8	Preparación de ADN de HSV-BACs control y RGD ⁺	90
4.18	Producción de virus recombinantes	92
4.18.1	Titulación del stock viral por unidades formadoras de placa.....	93
4.18.2	Titulación del stock viral por Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos del 50%.....	93
4.18.3	Purificación de stocks de virus recombinantes	94
4.18.3.1	Preparación del gradiente de Optiprep™	94
4.19	Producción de AmMSP5 recombinante	95
4.20	Detección de proteínas mediante ensayos de inmunofluorescencia	97
4.21	Detección de proteínas mediante ensayos de Western blot.....	97

4.21.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante	98
4.21.2	Electrotransferencia sobre membrana de nitrocelulosa.	98
4.21.3	Detección de proteínas recombinantes sobre membrana de nitrocelulosa.....	98
4.22	Análisis de la respuesta inmune humoral generada con el virus recombinante	
TOZGFP	99
4.22.1	Análisis de la respuesta humoral anti- β -galactosidasa	99
4.22.1.1	ELISA para medición de anticuerpos específicos totales anti- β -gal.....	99
4.23	Análisis de la respuesta inmune generada con el vector HSV_s[VP4]	100
4.23.1	Análisis de la respuesta humoral anti-VP4	101
4.23.1.1	ELISA para medición de anticuerpos específicos anti-VP4 de rotavirus Wa.	101
4.24	Análisis de la respuesta inmune generada con el vector HSV_s[VP6C] y vacuna ADN	
[pCI-VP6C]	101
4.24.1	Análisis de la respuesta humoral anti-VP6C	102
4.24.1.1	ELISA de captura para medición de anticuerpos anti-VP6C de RV grupo C. .	102
4.25	Análisis de la respuesta inmune generada con el vector HSV_s[MSP5] y la proteína	
recombinante MSP5	103
4.25.1	Análisis de la respuesta inmune humoral anti-MSP5.....	104
4.25.1.1	ELISA para medición de anticuerpos anti-MSP5 de A. marginale.	104
4.25.1.2	ELISA de inhibición competitiva para medición de anticuerpos específicos para el epítopo anti-MSP5 de A. marginale.....	105
4.25.2	Análisis de la respuesta celular anti-MSP5	106
4.26	Análisis estadístico de datos	106
5	Resultados	106
5.1	Purificación de stocks de vectores virales	107
5.1.1	Producción, concentración y titulación de Vectores Amplicón.....	107
5.2	Análisis de expresión heteróloga de Vectores Amplicón en células eucariotas ..	108
5.2.1	Expresión de Wa-VP6.....	108
5.2.1.1	Detección de VP6 por medio de inmunofluorescencia	108
5.2.1.2	Detección de VP6 por medio de Western blot.....	110
5.2.2	Expresión de Wa-VP2.....	111
5.2.2.1	Detección de VP2 por medio de inmunofluorescencia	111
5.2.2.2	Detección de VP2 por medio de Western blot.....	112
5.2.3	Expresión de Wa-NSP4.....	113
5.2.3.1	Detección de NSP4 mediante Western blot	113
5.2.4	Expresión de Wa-VP7.....	113
5.2.4.1	Detección de Wa-VP7 por medio de inmunofluorescencia.....	113
5.2.5	Expresión de Wa-VP4.....	114

5.2.5.1	Detección VP4 por medio de inmunofluorescencia	114
5.2.6	Expresión de VP6 de Rotavirus tipo C.....	117
5.2.6.1	Detección de VP6C por medio de inmunofluorescencia	117
5.2.6.2	Detección de VP6C por medio de Western blot:.....	118
5.2.7	Expresión de AmMSP5.....	121
5.2.7.1	Detección de MSP5 por medio de inmunofluorescencia.....	121
5.2.1	Expresión <i>in vivo</i> de EGFP.....	121
5.3	Obtención de un virus HSV-1 recombinante para el “display” de un epítopo heterólogo en su superficie.....	123
5.3.1	Secuencia modificada de la gC de Herpes simplex virus tipo 1, cepa F.....	123
5.3.2	Selección de un clon recombinante HSV[Δ pac Δ 27/RGD].....	124
5.3.3	Producción de ADN de HSV-BAC2 y HSV[Δ pac Δ 27/RGD].....	125
5.3.4	Análisis de expresión de gC en el virus derivado de HSV[Δ pac Δ 27/RGD].....	126
5.3.5	Preparación de partículas HSV-1 empaquetando plásmido [pHSV-EGFP].....	127
5.3.6	Análisis de la morfología de las partículas virales obtenidas.....	128
5.4	Producción de virus HSV-1 recombinantes	129
5.4.1	Purificación de virus HSV-1 recombinantes.....	130
5.5	Análisis de expresión heteróloga de Virus Recombinantes en células eucariotas	130
5.5.1	Detección de la expresión de β -galactosidasa en cultivo de células.....	130
5.5.2	Detección de la expresión de RRV-VP6 en diferentes líneas celulares.....	132
5.5.3	Detección de la expresión de EC-VP6 en diferentes líneas celulares.....	133
5.6	Producción de virus recombinante TORRVVP6	134
5.6.1	Escalado de la producción de TORRVVP6.....	134
5.6.2	Detección y aislamiento de mutantes durante la producción	135
5.7	Análisis de clones de virus aislados a partir de placas de lisis EGFP positivas y negativas de TORRVVP6	137
5.8	Análisis de la presencia del marco abierto de lectura de RRV-VP6 en clones aislados de TORRVVP6.....	138
5.9	Expresión de las proteínas recombinantes rMSP5-H₆ y rMSP5-MBP	139
5.10	Análisis de la respuesta inmune generada con vectores virales.....	140
5.10.1	Respuesta de anticuerpos específicos para β -galactosidasa.....	140
5.10.2	Respuesta de anticuerpos específicos para VP4.....	140
5.10.3	Respuesta de anticuerpos específicos para VP6C.....	141
5.10.4	Respuesta humoral específica para MSP5.....	143
5.10.5	Ensayo de linfoproliferación específica en respuesta a MSP5.....	145

6	Discusión.....	147
6.1	Generación de los vectores virales	148
6.2	Expresión <i>in situ</i> de genes de Rotavirus por medio de amplicones herpéticos ...	150
6.3	Display en membrana del epítopo RGD del Virus de la Fiebre Aftosa.....	151
6.4	Expresión de antígenos de RV animales a través de herpesvirus recombinantes defectivos	152
6.5	Respuesta inmune a antígenos expresados a través de vectores herpéticos	153
7	Conclusiones.....	156
8	Referencias.....	159
9	Anexos.....	188
9.1	Anexo I. Clonado molecular de genes heterólogos para incluir en los vectores herpéticos y oligonucleótidos iniciadores utilizados.	188
9.2	Anexo II. Lista de publicaciones derivadas del trabajo realizado con vectores virales basados en HSV-1.	188

Abreviaturas y símbolos

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylenbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)
Ac: anticuerpo
ADN: ácido desoxirribonucleico
Amp: ampicilina
AmpR: gen de β -lactamasa, resistencia a Amp
ARN: ácido ribonucleico
ARNdc: ácido ribonucleico doble cadena
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ARNsc: ácido ribonucleico simple cadena
BAC: báculo
Buffer: solución tampón de sustancias químicas, que mantienen constante su pH
BSA: seroalbúmina bovina
°C: grados centígrados
Cam: Cloranfenicol
cELISA: "Enzyme-linked immunosorbent assay", Inmunoensayo enzimático, de inhibición competitiva.
cm: centímetro
CMC: Carboximetil celulosa
CMV: Citomegalovirus
CO₂: dióxido de carbono
ConA: Concanavalina A
cpm: cuentas por minuto
DAPI: 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxiamidina
DMEM: medio esencial mínimo de Dulbecco
ADN: ácido desoxirribonucleico
dNTPs: deoxinucleótidos
DO: Densidad óptica
dpi: días post infección
dpv: días post vacunación
EDTA: Ácido etilnamido tetra-acético
EGFP: proteína verde fluorescente
ELISA: "Enzyme-linked immunosorbent assay". Inmunoensayo con revelado enzimático
etc.: etcétera
FA: Fiebre aftosa
gC: glicoproteína C
G418: Antibiótico Geneticina
h: horas
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HA: epitope de la hemaglutinina de influenza
HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etano sulfónico
hpi: horas post infección
hpt: horas post transfección
HSV-1: Herpes Simplex tipo 1
ICP: Proteína de células infectadas
IE: índice de estimulación

IF: inmunofluorescencia
i.g.: intragástrica
IgA: Inmunoglobulina clase A
IgG: Inmunoglobulina clase G
IgM: Inmunoglobulina clase M
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
i.m.: intramuscular
i.p.: intraperitoneal
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IRES: Sigla en inglés para "sitio interno de unión a los ribosomas"
Kpb: kilo pares de bases
kDa: kilo Daltons
l: litro
LB: Lysogeny Broth, medio de cultivo utilizado para el crecimiento de bacterias.
M: Molar
AcM: anticuerpo monoclonal.
 μ l: microlitro
 μ g microgramo
mg: miligramo
ml: mililitro
mM: milimolar
min: minuto
MOI: sigla en inglés para "multiplicidad de infección"
N: Normal
nm: nanómetro
polyA: señal de poliadenilación
pb: pares de bases
PBS: solución buffer de fosfatos
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PFU: Unidades Formadoras de Placa
pH: $-\log[H^+]$
PM: Peso molecular
RGD: motivo constituido por residuos aa arginina (R) - glicina (G) - ácido aspártico (D)
RPM: revoluciones por minuto
s.c.: subcutánea
SD: Desvío estándar
SDS: dodecyl sulfato de sodio
SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SFB: Suero Fetal Bovino
TA: Temperatura Ambiente
UT: Unidades de Transducción
UFP: Unidades formadoras de placas
UV: luz Ultravioleta
Vero: células epiteliales de riñón de mono verde Africano
VFA: Virus de la fiebre aftosa
VLPs: partículas similares a virus
VP16: Proteína de virión 16

Vtf7-3: Virus vaccinia recombinante que expresa la T7 ARNpol
wt: del inglés tipo salvaje

Resumen

Los vectores basados en el virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) se presentan como un sistema de gran potencial tanto en terapia génica, como en vacunas de última generación. Recientemente, se han desarrollado diferentes sistemas de vectores virales basados en HSV-1, los que se han utilizado en ensayos clínicos para el tratamiento de tumores en humanos, y como vacunas contra diferentes patógenos.

En el presente trabajo, se evaluó el uso de distintos tipos de vectores basados en HSV-1, como candidatos para el establecimiento de una plataforma de vacunas de nueva generación contra diferentes patógenos humanos y animales, a través de la expresión de antígenos pertenecientes a Rotavirus (RV) grupo A y grupo C, la rickettsia *Anaplasma marginale*, y el Virus de la Fiebre Aftosa.

Se construyeron vectores herpéticos defectivos y de tipo amplicón para la expresión de las proteínas de RV NSP4, VP2, VP4, VP6 y VP7, de manera individual, o en construcciones dobles, portando los genes VP2 y VP6, o VP4 y VP7 de RV grupo A. Adicionalmente se trabajó con un vector para la expresión de la proteína VP6 de RV grupo C, de una cepa no cultivable. Para la rickettsia *Anaplasma marginale*, se construyó un vector amplicón para la expresión de la proteína de superficie MSP5.

En el caso del Virus de la Fiebre Aftosa, se ensayó un vector viral capaz de presentar en la superficie de la partícula un epítipo inmunodominante de la proteína VP1, denominado RGD, responsable de interactuar con el receptor celular. Para esta estrategia, el vector viral fue modificado para insertar el epítipo RGD en la secuencia que codifica para el gen de la glicoproteína C de HSV-1.

Por medio de transducción o infección de cultivos celulares con estos vectores, se pudo comprobar la expresión de los antígenos heterólogos en los diferentes sistemas.

Se seleccionaron algunos de los vectores obtenidos para realizar una prueba de concepto sobre su uso como agentes vacunales, generando los stocks de cantidad y calidad necesarios, para aplicar los diferentes planes de inmunización en animales de experimentación, y así poder evaluar la respuesta inmune específica generada. De este modo se utilizaron los vectores que expresan la proteína VP6 de RV grupo C, VP4 de RV grupo A, y MSP5 de *A. marginale*, para evaluar la respuesta inmune inducida luego de su inoculación a ratones Balb/c, como modelo de experimentación.

Los resultados indicaron que los vectores herpéticos fueron capaces de generar una respuesta inmune específica. En el caso de los antígenos de RV analizados, se estudió el desarrollo de una respuesta inmune humoral, y en el caso del vector que codifica para MSP5 de *A. marginale*, se determinó una respuesta inmune principalmente celular, la cual se balanceó hacia una respuesta múltiple luego del suministro de un refuerzo con el antígeno proteico adyuvado.

Además, otro de los principales logros de este trabajo ha sido el establecimiento de los protocolos de producción de diferentes vectores virales para su uso como inmunógenos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, se demuestra que vectores basados en HSV-1 son candidatos atractivos para el desarrollo de vacunas genéticas de nueva generación, dirigidas contra patógenos virales y bacterianos que afectan a humanos y animales.

Palabras clave

Herpes Simplex Tipo 1; vectores herpéticos; producción de vectores virales; vacunas de nueva generación; Rotavirus

Summary

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) based vectors have shown a great potential for gene therapy and are considered promising vehicles to deliver heterologous antigens for new generation vaccines. Recently, different HSV-1 based viral vector systems have been developed and used in clinical trials for treatment of human cancer as well as vaccines against different pathogens.

In the present work, HSV-1 viral vectors have been evaluated for the assessment as a vaccine vector platform against group A and group C rotavirus (RV), the rickettsia *Anaplasma marginale*, and Foot-and-mouth disease virus (FMDV) infections.

Defective herpesviruses and amplicon vectors that express individually group A RV proteins VP2, VP4, VP6, VP7 and NSP4, or which co-express the structural genes VP2 and VP6 or VP4 and VP7 were developed. Additionally, amplicon vectors which express VP6 protein from a non-cultivable group C RV strain or the surface antigen MSP5 of *A. marginale* were constructed.

A display vector, which expresses in its surface the RGD epitope of the structural protein VP1, was generated by the insertion of the RGD motif into one exposed loop of the glycoprotein C of HSV-1.

Expression of the heterologous genes, either alone or in combination, was demonstrated by Western blot and/or immunofluorescence analyses in transduced or infected cells.

Stocks of the selected amplicon vectors, expressing group A RV VP4 and VP7, or *A. marginale* MSP5 were produced to carry out different immunization schedules in Balb/c mice, in order to assess the specific immune response elicited, in the absence of adjuvants.

The results showed an induction of specific immune responses in the vaccinated animals. The development of specific humoral immune response was obtained with amplicon vectors expressing RV proteins. A cellular immune response was mainly observed after inoculation of the *A. marginale* MSP5 amplicon vector, which shifted to a multiple immune response when boosted with the homologous adjuvanted recombinant protein. In addition, protocols for the scaling up of vector stocks were established.

Taken together, the results presented in this work indicate that HSV-1 amplicon vectors are attractive candidates for the development of safe genetic vaccines against human and animal pathogen infections.

Keywords

Herpes Simplex Virus Type 1, herpetic vectors, viral vector production, new generation vaccines, rotaviruses

Índice de figuras

1. Introducción

Figura 1.1.a	Esquema de una partícula de HSV-1	23
Figura 1.1.b	Esquema del genoma de HSV-1.....	23
Figura 1.2.a	Esquema simplificado de la cascada de expresión génica de HSV	25
Figura 1.2.b	Bloqueo de la expresión de genes tempranos (E) y tardíos (L) en virus defectivos.....	25
Figura 1.3	Esquema de producción de virus recombinantes defectivos	27
Figura 1.4	Esquema de producción de amplicones utilizando virus "helper"	29
Figura 1.5	Esquema de producción de amplicones con sistema "helper free"	30
Figura 1.6	Características de la arquitectura de partículas de rotavirus	32
Figura 1.7	Diagrama esquemático de la cápside del VFA	46
Figura 1.8	Representación de la estructura de la cápside de VFA y de sus intermediarios de ensamblaje	47
Figura 1.9	Representación de la estructura tridimensional de un protómero biológico del VFA	48

4. Materiales y Métodos

Figura 4.1	Esquema del genoma del virus recombinante T0ZGFP	55
Figura 4.2	Esquema del genoma de los virus recombinantes TORRVVP6 y TOECVP6	56
Figura 4.3	PCR a partir de colonias transformadas con la reacción de ligación [pHSV-VP6/EGFP]	67
Figura 4.4.a	Esquema del plásmido amplicón [pHSV-VP6/EGFP].	68
Figura 4.4.b	Análisis del patrón de restricción de clones [pHSV-VP6/EGFP].	68
Figura 4.5	Selección de clones [pHSV-VP6/EGFP] por medio de PCR a partir de colonias.	68
Figura 4.6.a	Mapa del plásmido [pHSV-VP6/Doble/EGFP].	69
Figura 4.6.b	Análisis del patrón de restricción de clones [pHSV-VP6/Doble/EGFP].	69
Figura 4.7.a	Primera ronda de selección de clones de [pHSV-VP6/VP2/EGFP] por medio de PCR a partir de colonias.	70

Figura 4.7.b	Segunda ronda de selección de clones de [pHSV-VP6/VP2/EGFP] por medio de PCR a partir de colonias.	70
Figura 4.8.a	Análisis del patrón de restricción de los clones positivos [pHSV-VP6/VP2/EGFP].	70
Figura 4.8.b	Mapa del plásmido [pHSV-VP6/VP2/EGFP].	71
Figura 4.9.a	Selección de clones de [pHSV-Doble/VP7] por medio de PCR a partir de colonias primera ronda.	72
Figura 4.9.b	Selección de clones de [pHSV-Doble/VP7] por medio de PCR a partir de colonias segunda ronda.	72
Figura 4.10.a	Esquema del plásmido amplicón [pHSV-Doble/VP7].	72
Figura 4.10.b	Análisis del patrón de restricción de clones de [pHSV-Doble/VP7].	72
Figura 4.11.a	Selección de clones de [pHSV-Doble/VP7/VP4] por medio de PCR a partir de colonias primera ronda.	73
Figura 4.11.b	Selección de clones de [pHSV-Doble/VP7/VP4] por medio de PCR a partir de colonias segunda ronda.	73
Figura 4.12.a	Mapa del plásmido amplicón [pHSV-VP7/VP4/EGFP].	74
Figura 4.12.b	Análisis del patrón de restricción de los clones positivos de [pHSV-VP7/VP4/EGFP].	74
Figura 4.13	Mapa del plásmido amplicón [pHSV-VP6/VP2/EGFP].	74
Figura 4.14	Electroforesis para obtener el plásmido amplicón [pHSV-VP2/EGFP] lineal.	75
Figura 4.15.a	Mapa del plásmido amplicón [pHSV-VP2/EGFP]	75
Figura 4.15.b	Análisis del patrón de restricción de clones de [pHSV-VP2/EGFP].	75
Figura 4.16	Análisis del patrón de restricción de un clon positivo de [pHSV-VP2/EGFP].	76
Figura 4.17.a	Mapa del plásmido amplicón [pHSV-VP4/EGFP].	77
Figura 4.17.b	Análisis del patrón de restricción de dos clones de [pHSV-VP4/EGFP] con <i>PvuII</i>	77
Figura 4.18.a	Mapa del plásmido amplicón [pHSV-NSP4/EGFP].	78
Figura 4.18.b	Análisis del patrón de restricción de 5 clones de [pHSV-NSP4/EGFP] con <i>PvuII</i> y <i>EcoRI</i>	78
Figura 4.19	Selección de clones de [pCI/HA-VP6C] por medio de PCR a partir de colonias.	79

Figura 4.20	Análisis del patrón de restricción de clones de [pCI/HA-VP6].	79
Figura 4.21.a	Mapa del plásmido [pCI-neo/HA-VP6C].	80
Figura 4.21.b	Análisis del patrón de restricción de las preparaciones de [pCI-neo/HA-VP6C].	80
Figura 4.22.a	Mapa del plásmido amplicón [pHSV-MSP5/EGFP].	81
Figura 4.22.b	Análisis del patrón de restricción de dos clones positivos de [pHSV-MSP5/EGFP].	81

5. Resultados

Figura 5.1	Concentración y purificación de partículas de vectores amplicón por ultracentrifugación.	107
Figura 5.2	Ejemplo de titulación de vectores amplicón.	108
Figura 5.3	Expresión de VP6 en cultivo de células, analizada por microscopía confocal.	109
Figura 5.4	Expresión de VP6 en cultivo de células, analizada por epifluorescencia.	110
Figura 5.5	Análisis de la expresión de VP6 y EGFP por medio de Western blot.	111
Figura 5.6	Expresión de VP2 en cultivo de células, analizada por microscopía de epifluorescencia.	112
Figura 5.7	Análisis de la expresión de VP2 y VP6 por medio de Western blot.	112
Figura 5.8	Análisis de la expresión de NSP4 por medio de Western blot.	113
Figura 5.9	Expresión de VP7 en cultivo de células, analizada por microscopía confocal.	114
Figura 5.10	Expresión de VP4 en cultivo de células, analizada por microscopía de epifluorescencia.	115
Figura 5.11	Colocalización de VP4 y fibras de actina.	116
Figura 5.12	Magnificación de co-localización de VP4 y fibras de actina.	116
Figura 5.13	Control negativo del experimento de colocalización, vector amplicón HSVs[EGFP].	117
Figura 5.14	Expresión de HA-VP6C y VP6C-HA, con vacuna ADN [pCI-neo/HA-VP6C].	119
Figura 5.15	Expresión de HA-VP6C en cultivo de células con sistema Vaccinia-Vtf7-3.	120

Figura 5.16	Análisis de la expresión de HA-VP6 como monómero o trímero por medio de Western blot.	120
Figura 5.17	Expresión de MSP5 de <i>Anaplasma marginale</i> y GFP por medio de vectores amplicón.	122
Figura 5.18	Expresión <i>in vivo</i> de EGFP en la oreja de ratones Balb/c.	123
Figura 5.19	Secuencia de gC modificada con epítipo RGD.	124
Figura 5.20	Esquema simplificado de selección <i>galk</i> para generar HSV-BAC modificado en gC HSV[[Δ pac Δ 27/RGD].	125
Figura 5.21.	Purificación de ADN de HSV-BACs por medio de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.	126
Figura 5.22	Análisis de la expresión de gC en células Vero 2-2, transducidas por los HSV-BACs por medio de Western blot.	127
Figura 5.23	Análisis de la expresión de EGFP en células Vero 2-2, transducidas con los HSV-BACs empaquetando [pHSV-EGFP] por medio de Western blot. .	127
Figura 5.24	Empaquetado de plásmido amplicón [pHSV-EGFP] utilizando [HSV-BAC] parental y modificado.	128
Figura 5.25	Morfología de partículas generadas con los HSV-BACs.	129
Figura 5.26	Efecto citopático en células Vero-7b de T0ZGFP y T0RRV-VP6.	129
Figura 5.27	Concentración y purificación de virus recombinantes utilizando gradientes autogenerados de iodixanol.	130
Figura 5.28	Expresión de genes reporteros en células Vero-7b infectadas con el virus recombinante T0ZGFP.	131
Figura 5.29	Análisis de expresión de gen reportero beta-galactosidasa en células Vero y Vero-7b.	132
Figura 5.30	Análisis de la expresión de RRV-VP6 por virus recombinante T0RRV-VP6 en distintas líneas celulares.	133
Figura 5.31	Expresión de EC-VP6 formando microfibras en cultivo de células MDBK.	134
Figura 5.32	Expresión de EC-VP6 en cultivo de células MDBK.	134
Figura 5.33.	Escalado de producción de T0RRVVP6 en escala de laboratorio.	135
Figura 5.34.	Efecto de los pasajes de virus sobre la estabilidad de EGFP en células Vero-7b.	136
Figura 5.35.	Caída de placas de lisis que expresan EGFP con el aumento de pasajes del virus recombinante T0RRVVP6.	137
Figura 5.36.	Sincicios y placas de lisis fluorescentes típicas de T0RRVVP6.	137

Figura 5.37.	Amplificación de RRV-VP6 de clones aislados del virus recombinante T0RRVVP6.	138
Figura 5.38	Expresión en <i>E. coli</i> y purificación de las proteínas recombinantes rMSP5-MBP y rMSP5-6xHis.	139
Figura 5.39.	Respuesta de anticuerpos totales anti- β -galactosidasa inducidos luego de la administración por diferentes vías regímenes " <i>prime-and-boost</i> " con el vector T0ZGFP.	140
Figura 5.40	Anticuerpos específicos contra RV inducidos luego de la administración de HSV _s [VP4].	141
Figura 5.41	Respuesta de anticuerpos totales anti-VP6 de RVC inducidos luego de la administración de los diferentes regímenes " <i>prime-and-boost</i> ".	142
Figura 5.42	Cinética de anticuerpos monoespecíficos anti-MSP5 medidos con cELISA.	143
Figura 5.43	Cinética de anticuerpos monoespecíficos anti-MSP5 medidos con cELISA.	145
Figura 5.44	Ensayo de linfoproliferación específica con rMSP5.	146

Lista de tablas

Tabla 1	Segmentos ARNdc del rotavirus del grupo A, SA11, y las proteínas correspondientes	35
Tabla 2	Detalle de los anticuerpos utilizados en esta tesis.	65
Tabla 3	Dosis de vectores utilizados en los experimentos con los vectores amplicón H _s [VP4] y H _s [EGFP].	100
Tabla 4	Dosis y combinación de inmunógenos utilizados en los experimentos utilizando el vector amplicón H _s [VP6C] y la vacuna a ADN [pCI/HA-VP6C]...	102
Tabla 5	Dosis y combinación de inmunógenos utilizados en los experimentos utilizando el vector amplicón H _s [MSP5] y la proteína rMSP5.	104
Tabla 6	Transgenes expresados en vectores herpéticos.	150

Figuras en Anexo I

Figura I.1.(a)	Esquema del plásmido [pHSV-Triple-EGFP].	190
Figura I.1.(b)	PCR del fragmento doble.	190
Figura I.2.(a)	Mapa del plásmido [pGEM®-T Easy/Doble].	191

Figura I.2.(b)	Análisis del patrón de restricción de clones recombinantes.	191
Figura I.3	Fragmentos purificados para obtener [pHSV-Doble-EGFP].	192
Figura I.4	Selección de clones de [pHSV-Doble-EGFP] por medio de PCR a partir de colonias.	192
Figura I.5.(a)	Mapa del plásmido [pHSV-Doble-EGFP].	193
Figura I.5.(b)	Análisis del patrón de restricción de clones [pHSV-Doble-EGFP].	193
Figura I.6	Productos de PCR de genes estructurales de RV Wa.	195
Figura I.7	Análisis del patrón de restricción de genes estructurales de RV Wa. ..	195
Figura I.8.(a)	Análisis del patrón de restricción de clones de [pGEM®-T Easy/Wa-VP6].	196
Figura I.8.(b)	Mapa del plásmido [pGEM®-T Easy/Wa-VP6].	196
Figura I.9.(a)	Análisis del patrón de restricción de clones [pCR®2.1-TOPO®/Wa-VP2].	197
Figura I.9.(b)	Mapa del plásmido [pCR®2.1-TOPO®/Wa-VP2].	197
Figura I.10.(a)	Análisis del patrón de restricción de clones [pCR®2.1-TOPO®/Wa-VP7].	197
Figura I.10.(b)	Mapa del plásmido [pCR®2.1-TOPO®/Wa-VP7].	197
Figura I.11	Análisis del patrón de restricción de clones [pGEM®-T Easy/Wa-VP4].	198
Figura I.12.(a)	Selección de clones [pGEM®-T Easy/Wa-VP4] por medio de PCR a partir de colonias.	198
Figura I.12.(b)	Mapa del plásmido [pGEM®-T Easy/Wa-VP4].	198
Figura I.13	Selección de clones [pGEM®-T Easy/Wa-NSP4] por medio de PCR a partir de colonias.	199
Figura I.14.(a)	Esquema del plásmido [pGEM®-T Easy/Wa-NSP4].	199
Figura I.14.(b)	Análisis del patrón de restricción de clones [pGEM®-T Easy/Wa-NSP4].	199
Figura I.15	Amplificación por PCR del marco abierto de lectura de VP6C.	201
Figura I.16.(a)	Esquema del plásmido [pGEM®-T Easy/Ha-VP6C].	201
Figura I.16.(b)	Análisis del patrón de restricción de clones [pGEM®-T Easy/Ha-VP6C].	201

Tablas en Anexo I

Tabla I.1	Oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para la construcción y secuenciación del plásmido amplicón [pHSV-Doble-EGFP].	191
Tabla I.2	Oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para el clonado de genes de RV Wa en plásmidos pCR4-TOPO y pCR2.1-TOPO.	193
Tabla I.3	Oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para la amplificación y clonado de VP6, VP2, VP7, VP4 y NSP4..	194
Tabla I.4	Oligonucleótidos iniciadores utilizados para completar los datos de las secuencias de los genes amplificados..	200
Tabla I.5	Oligonucleótidos iniciadores específicos para el clonado molecular de MSP5.	200
Tabla I.6	Oligonucleótidos iniciadores específicos para la secuenciación de construcción [pAEUA2/ β -gal].....	202
Tabla I.7	Oligonucleótidos iniciadores específicos para VP6 de rotavirus de simio (VP6-RRV) y la proteína fluorescente verde (EGFP)..	202
Tabla I.8	Oligonucleótidos iniciadores específicos para determinar la secuencia del fragmento de inserción en la gC.	202

1 Introducción

Uno de los principales objetivos de la vectorología viral, desde mediados de los 80', ha sido el desarrollo de vectores recombinantes para la presentación de transgenes a células de mamíferos, con una mínima toxicidad asociada. Actualmente, muchos sistemas virales se encuentran próximos a cumplir con este objetivo, suministrando una expresión transgénica estable en diferentes tipos celulares y tejidos (Bråve y col., 2007; Draper y Heeney, 2010). Entre los sistemas existentes podemos mencionar los derivados de virus adeno-asociados (Grieger y Samulski, 2005), adenovirus (Chen y col., 2010), retrovirus (Barraza y Poeschla, 2008), poxvirus (Walsh y Dolin, 2011), herpes simplex virus tipo 1 (Marconi y col., 2009), entre otros. El área de vacunas ha tomado parte de estos desarrollos para aplicaciones específicas, y se han utilizado como vectores de inmunógenos, codificantes de proteínas heterólogas, tratando de reemplazar patógenos vivos atenuados que pueden presentar riesgos, o dificultades tales como imposibilidad de su cultivo *in vitro*. A la vez, esta tecnología permite aprovechar las virtudes de un elemento replicativo para estudiar la inmunidad celular producida ante antígenos específicos (Osten y col., 2007; Souza y col., 2005). En este sentido el uso de vectores virales, defectivos en su replicación, pero capaces de generar respuesta inmune específica, se presenta como una estrategia atractiva para el estudio de la arquitectura de dicha respuesta, en infecciones ocasionadas por diferentes patógenos.

El proyecto FP6-HEVAR de la Comunidad Europea, (FP6-2004-INCO-DEV-3-*“Herpesvirus-based vaccines against rotavirus infections”*), del cual el presente trabajo formó parte, estuvo enfocado en la generación y evaluación de vectores genéticos innovativos, que pudieran contribuir a la comprensión de la biología inmune de las infecciones por rotavirus, y constituir un primer paso esencial hacia el desarrollo de vacunas genéticas nuevas para la prevención de infecciones ocasionadas por rotavirus humanos, el agente etiológico más importante de la diarrea con deshidratación en bebés y niños en los países en desarrollo.

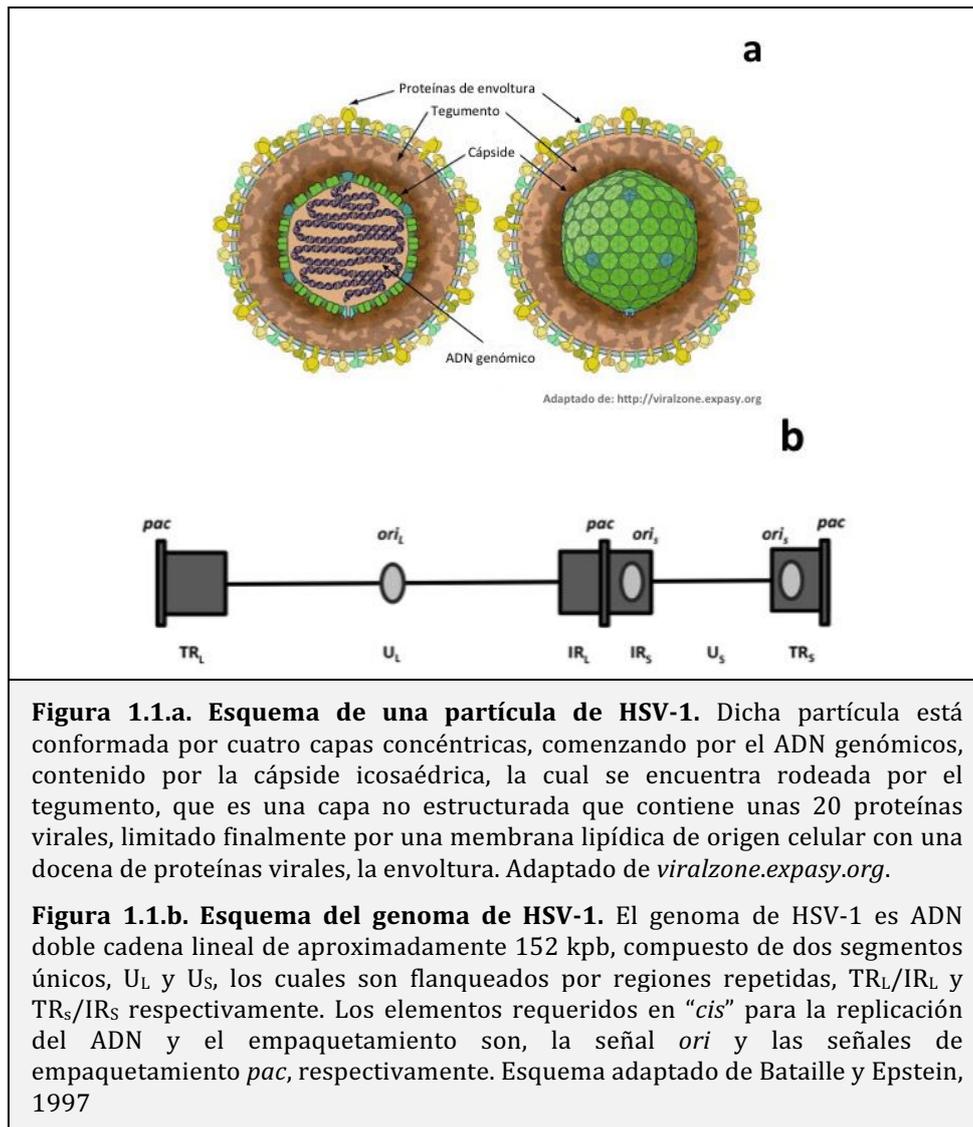
Por otro lado, en colaboración con el Laboratorio de Inmunología perteneciente al Estación Experimental INTA-Rafaela, y otros investigadores del Centro de Virología Animal-CONICET, se establecieron líneas de investigación que también fueron parte del presente trabajo, orientadas al estudio de respuesta inmune generada con vectores

herpéticos contra otros patógenos de interés veterinario, como *A. marginale* y el virus de la Fiebre Aftosa.

1.1 Vectores herpéticos

El virus Herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1), pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, y está presente entre el 65% al 90% de la población humana (Chayavichitsilp y col., 2009). Infecciones con HSV-1 son responsables principalmente de erupciones mucocutáneas, ocurriendo en algunos casos cuadros de encefalitis, sin embargo, también pueden ocurrir infecciones asintomáticas durante la dispersión del virus (Kaufman, 2005). Luego de una infección primaria, HSV-1 establece latencia en neuronas de ganglios que inervan el epitelio infectado, principalmente en el ganglio trigémino en el caso de infecciones orofaciales, siendo capaz de reactivarse en respuesta a ciertos estímulos, resultando en recurrencia de las sintomatologías mencionadas (Chen y Hudnall, 2006). También cabe destacar que se han descubierto interacciones benéficas hacia el huésped por parte de virus de esta familia (Barton y col., 2007; Duerkop y Hooper, 2013).

La partícula de HSV-1 posee un genoma de 152 kpb de ADN doble cadena, protegido por una cápside icosaédrica, que se encuentra rodeada de una capa que incluye proteínas virales, denominada tegumento, el cual está limitado por una envoltura externa de características lipoproteicas (Knipe y col., 2007), Figura 1.1.a. El genoma codifica para aproximadamente 80 genes, y estructuralmente puede dividirse en un segmento largo (U_L) y un segmento corto (U_S), conectados por regiones repetitivas internas (IR_L e IR_S) y terminales (TR_L y TR_S) (Bataille y Epstein, 1995). Posee tres orígenes de replicación *oriL*, *oriS* (Bataille y Epstein, 1995; Stow, 1982). Las señales de clivado/empaquetamiento (*pac*) están presentes en ambos extremos del genoma, como también en la unión de los segmentos genómicos. Durante la replicación del genoma, los componentes genómicos L y S, pueden invertir su sentido en relación al otro segmento, resultando en cantidades equimolares de cuatro isómeros genómicos, al momento de clivado y empaquetamiento del genoma (Bataille y Epstein, 1997), Figura 1.1.b.



Durante el ciclo infeccioso de HSV-1, la expresión de los más de 80 genes se produce con una temporalidad regulada en forma secuencial, en tres etapas principales. La expresión génica, controlada principalmente a nivel transcripcional, comienza con la expresión de genes inmediato-tempranos, tempranos y tardíos. Cuatro de los cinco genes inmediato-tempranos (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47) son responsables de controlar la expresión génica de las fases temprana y tardía, y también generar silenciamiento y regulación transcripcional en la célula infectada.

La propagación óptima de viriones de HSV-1, requiere de esta progresión de transcripción génica ordenada, denominada por algunos autores como cascada alfa, beta y gamma (Roizman y Zhou, 2015; Weir, 2001).

En el comienzo de este proceso, la transcripción de los genes inmediato-tempranos, ocurre en ausencia de síntesis *de novo* de proteínas virales, proceso que se

logra por el transporte de varias proteínas empaquetadas en los viriones, presentando VP16 un rol central, que con su actividad de factor transcripcional, en conjunto con proteínas celulares, actúa sobre motivos de ADN presente sólo en las regiones reguladoras de los genes inmediato-tempranos (Campbell y col., 1984; Fraefel y col., 2011; Mackem y Roizman, 1982; Preston y col., 1988; Shu y col., 2013; Weir, 2001), dando comienzo a la síntesis *de novo* de proteínas codificadas por algunos de los principales genes regulatorios mencionados (ICP0, ICP4, ICP22 e ICP27), para seguir avanzando en la cascada viral de transcripción y expresión génica (McMahan y Schaffer, 1990; Preston, 1979; Watson y Clements, 1980), como se muestra de manera esquemática en la Figura 1.2.a.

Entre estos genes inmediato-tempranos, ICP4 e ICP27, son esenciales para la replicación viral (McMahan y Schaffer, 1990). Cuando son deletados del genoma viral para generar los diferentes sistemas defectivos basados en HSV-1, se deben suministrar de manera externa (en *trans*), por medio de líneas celulares complementarias, con el objetivo de lograr la replicación. Deleciones en los genes ICP22 e ICP0 minimizan la toxicidad de estos vectores herpéticos (Glorioso, 2014; Marconi y col., 1996), mejorando sus características, Figura 1.2.b. También se han realizado deleciones en otros genes, tales como en los factores de virulencia γ -34.5 e ICP47, que si bien no son genes esenciales para la replicación en cultivo celular, en su forma nativa interfieren en la respuesta inmune innata del huésped. En la siguiente etapa de expresión génica, los productos de los genes tempranos, aportan actividades enzimáticas, que aumentan los deoxinucleótidos disponibles en la célula infectada (por ej.: timidina quinasa y ribonucleótido reductasa), y dirigen la síntesis *de novo* del genoma viral. Las últimas funciones son las de los denominados genes tardíos, los cuáles codifican para proteínas involucradas en el empaquetamiento del ADN genómico, así como proteínas estructurales que participan en el ensamblado del virión, incluyendo la cápside que se ensambla en el núcleo, las proteínas que se adquieren en el citoplasma celular, que son transportadas en el tegumento, y las glicoproteínas que forman parte de la membrana lipídica o envoltura.

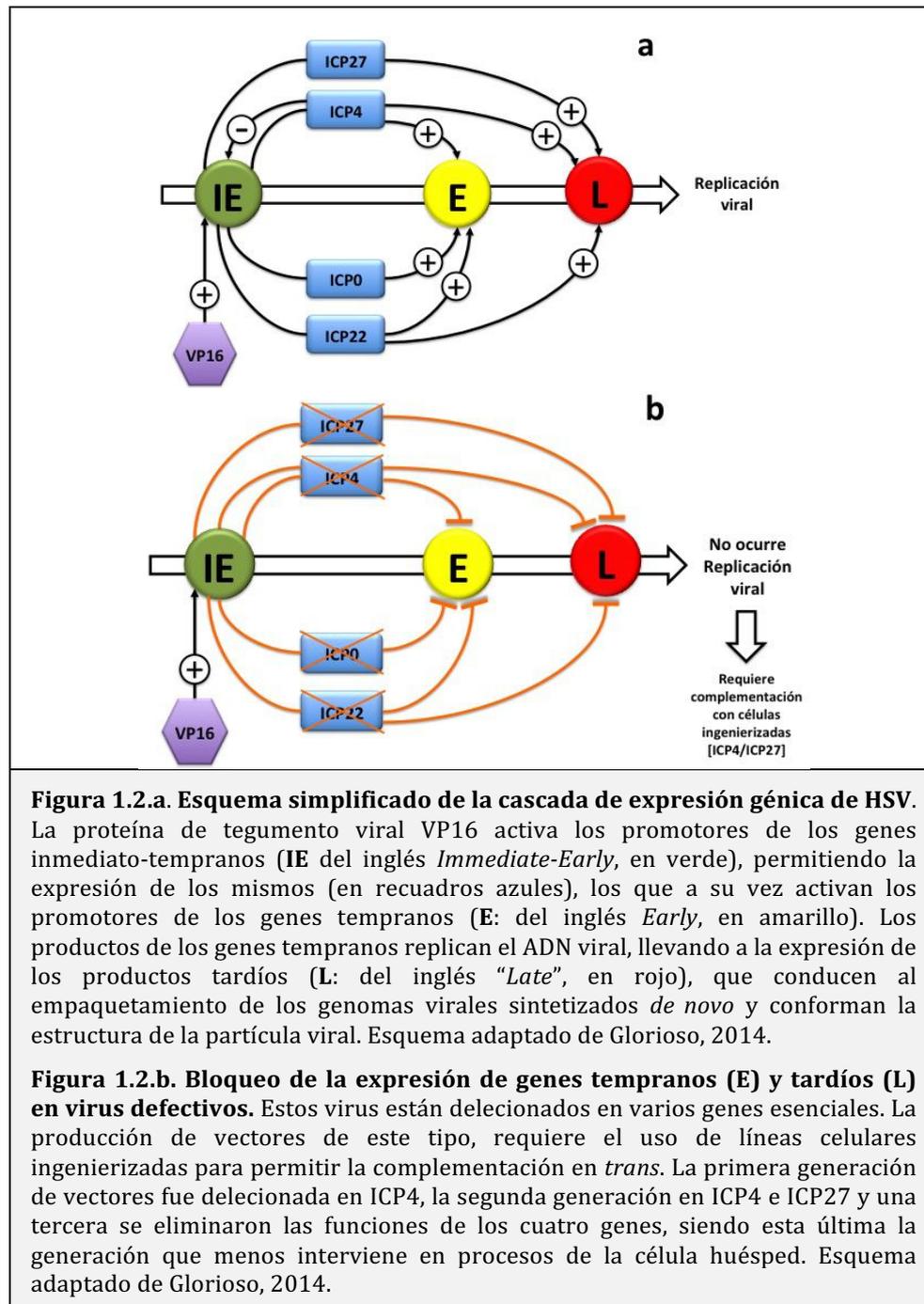


Figura 1.2.a. Esquema simplificado de la cascada de expresión génica de HSV.

La proteína de tegumento viral VP16 activa los promotores de los genes inmediato-tempranos (IE del inglés *Immediate-Early*, en verde), permitiendo la expresión de los mismos (en recuadros azules), los que a su vez activan los promotores de los genes tempranos (E: del inglés *Early*, en amarillo). Los productos de los genes tempranos replican el ADN viral, llevando a la expresión de los productos tardíos (L: del inglés "*Late*", en rojo), que conducen al empaquetamiento de los genomas virales sintetizados *de novo* y conforman la estructura de la partícula viral. Esquema adaptado de Glorioso, 2014.

Figura 1.2.b. Bloqueo de la expresión de genes tempranos (E) y tardíos (L) en virus defectivos. Estos virus están delecionados en varios genes esenciales. La producción de vectores de este tipo, requiere el uso de líneas celulares ingenierizadas para permitir la complementación *in trans*. La primera generación de vectores fue delecionada en ICP4, la segunda generación en ICP4 e ICP27 y una tercera se eliminaron las funciones de los cuatro genes, siendo esta última la generación que menos interviene en procesos de la célula huésped. Esquema adaptado de Glorioso, 2014.

Las características biológicas únicas de HSV-1, hacen que los vectores basados en este virus, sean considerados uno de los sistemas promisorios para terapia génica (Burton y col., 2001a, 2001b; de Silva y Bowers, 2009; Efstathiou y Minson, 1995; Glorioso, 2014; Glorioso y col., 1994; Kennedy, 1997; Lachmann, 2004; Lachmann y Efstathiou, 1997; Marconi y col., 2009; Oehmig y col., 2004). Las ventajas principales de los vectores herpéticos son, (1) su gran capacidad transgénica, de hasta 150 kpb, (2) el amplio rango de huésped incluyendo células quiescentes como en división, (3) el ADN viral no se integra a los cromosomas del huésped, (4) la posibilidad de reemplazar hasta

40 genes que no son esenciales para replicar en cultivos celulares, y (5) la capacidad de alcanzar el sistema nervioso. Por estas características, los vectores herpéticos son una herramienta muy interesante en áreas en plena expansión como terapia génica y desarrollo de nuevas vacunas.

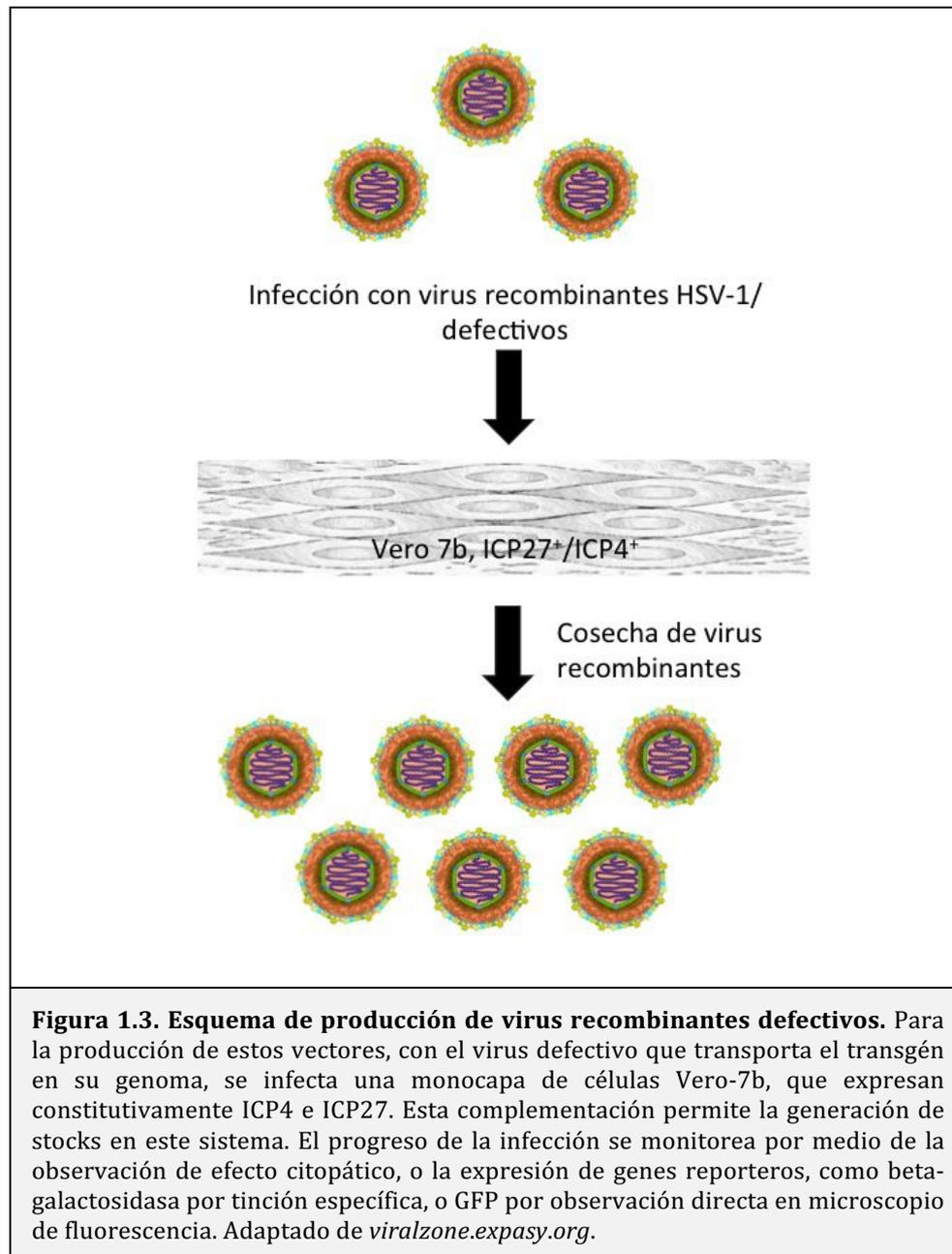
Existen tres tipos diferentes de vectores derivados de HSV-1, los cuáles se basan en las características descritas de este virus. Los ***virus recombinantes atenuados***, son virus competentes en su replicación, principalmente utilizados como oncolíticos, cuyas modificaciones genéticas restringen su replicación y capacidad lítica a células tumorales, sin causar daño a células normales del huésped. Por otro lado se encuentran los ***virus recombinantes defectivos en su replicación***, que son virus que poseen deleciones en uno o más de sus genes esenciales, cuyos productos son aportados en *trans* por líneas celulares específicas, posibilitando su replicación. Y por último, los ***vectores amplicón***, que también son sistemas defectivos, pero desprovistos totalmente de genes herpéticos, dependientes de un sistema colaborador para su propagación en cultivos celulares. En los tres casos las partículas obtenidas son idénticas a la del HSV-1 salvaje (*wt*). Las estrategias diseñadas para aportar funciones en *trans* para la producción de los vectores defectivos, determinan muchas de las diferencias que existen entre los sistemas de replicación y empaquetamiento de los distintos tipos de vectores.

En el presente trabajo, la primera metodología utilizada es la construcción de ***virus recombinantes defectivos en su replicación*** como portadores de transgenes, y la segunda es las de ***vectores amplicón***. Estos últimos, a su vez se dividen en dos subgrupos de acuerdo al sistema utilizado para su replicación: uno que utiliza un virus colaborador defectivo o "*helper*", y otro que se basa en un sistema libre de virus colaborador o "*helper free*". En ambos el sistema colaborador tiene como objetivo actuar como disparador de las funciones replicativas y de empaquetamiento, para la generación de partículas de virales. Adicionalmente, se utilizó el sistema de vectores "*helper free*" para la generación de un vector que presente en sus superficie un epítopo antigénico de un patógeno.

Virus recombinantes defectivos en su replicación

Este sistema de vectores deben ser producidos en cultivos celulares que complementen las deleciones de genes esenciales aplicadas a sus genomas. Los virus

defectivos utilizados en esta tesis poseen deleciones en varios genes esenciales, y pueden replicar en células que aporten ICP4 e ICP27, por ejemplo células Vero 7b (D. Krisky y col., 1997; D. M. Krisky y col., 1997; Marconi y col., 1996; Ozuer y col., 2002). En la Figura 1.3 se muestra un esquema de la producción de este tipo de vectores utilizados en este trabajo.



La titulación de estos vectores se realiza en la misma línea celular, ya que al ser posible su replicación, se puede realizar el conteo de placas de lisis, determinando las Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/ml).

Vector amplicón empaquetado con virus “helper”

Este sistema de vectores virales, consiste en dos partes esenciales, un plásmido amplicón con dos señales específicas reconocidas por el mecanismo de replicación genómica de HSV-1, y un virus colaborador o “*helper*”, que hace uso de estas señales para replicar y empaquetar el plásmido amplicón, en partículas virales sin genoma viral.

El plásmido amplicón, es un ADN circular cuyas dos señales esenciales de HSV-1, son el origen de replicación (*OriS*) y la señal de empaquetamiento (*pac*), carece de genes herpéticos, y lleva en cambio uno o varios casetes de expresión del transgén o transgenes de interés, bajo el control de un promotor eucariota. Adicionalmente, es posible propagar estos plásmidos en *Escherichia coli*, por poseer un origen de replicación bacteriano (*ColE1*) y el gen de β -lactamasa, que le confiere resistencia a ampicilina (*Amp*) a la bacteria (*AmpR*).

El sistema de vectores amplicón basado en un virus “*helper*” requiere una etapa de sobre-infección con dicho virus, de una monocapa celular que fue previamente transfectada con un plásmido amplicón.

El genoma del virus “*helper*”, como en el caso del virus tipo salvaje o *wt*, ingresa a la célula previamente transfectada y comienza un ciclo replicativo. Durante este ciclo, los complejos de replicación y empaquetamiento de ADN viral reconocen las señales que se encuentran en el plásmido amplicón y realizan el empaquetamiento del mismo, generando así partículas de vectores amplicón portando el casete transgénico en su material genético. En la Figura 1.4 se muestra un esquema de producción de estos vectores.

Actualmente los virus “*helper*” utilizados son virus defectivos y, por lo tanto, se deben complementar a su vez las deleciones que presenten, para que puedan completar los ciclos de replicación y empaquetamiento de los plásmidos amplicón. En el presente trabajo, esto se ha logrado mediante líneas celulares que expresan constitutivamente ICP4 y/o ICP27, genes que se encuentran delecionados en el genoma “*helper*” (HSVLa Δ J). Como producto, se obtiene una mezcla de partículas de vector amplicón y virus “*helper*”, ambos con una envoltura idéntica a la del HSV-1 *wt* (Epstein, 2005a; Logvinoff y Epstein, 2001, 2000a, 2000b; Manservigi y col., 2010; Marconi y col., 1996). Esta mezcla, además puede ser enriquecida en su componente de vector amplicón por pasajes en células especialmente diseñadas (Zaupa y col., 2003).

La titulación de los vectores amplicón se realiza en una línea celular que no expresa genes de HSV-1, y por lo tanto no permite la replicación del virus “*helper*”. De este modo se puede realizar el conteo de células transducidas por los vectores amplicón, ya que éstas serán las únicas células que expresen EGFP, pudiendo determinar las Unidades Formadoras de Foco por mililitro (UFF/ml).

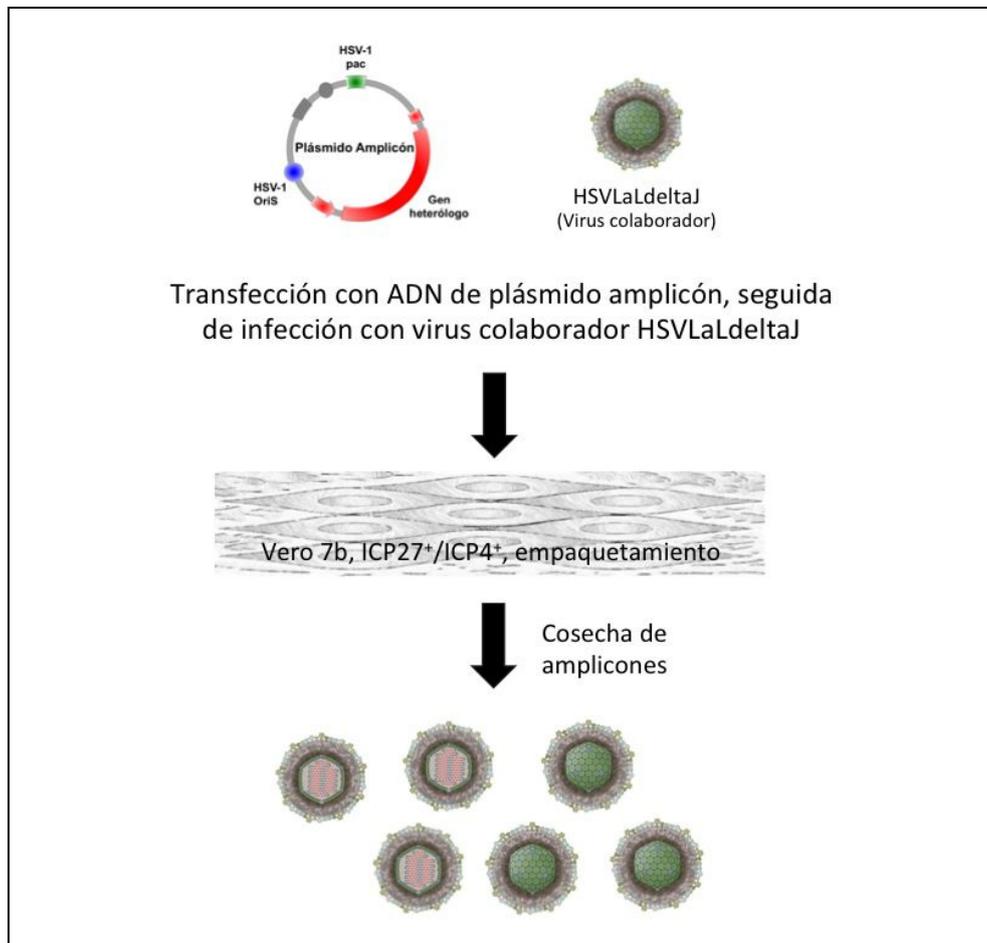


Figura 1.4. Esquema de producción de amplicones utilizando virus “*helper*”.

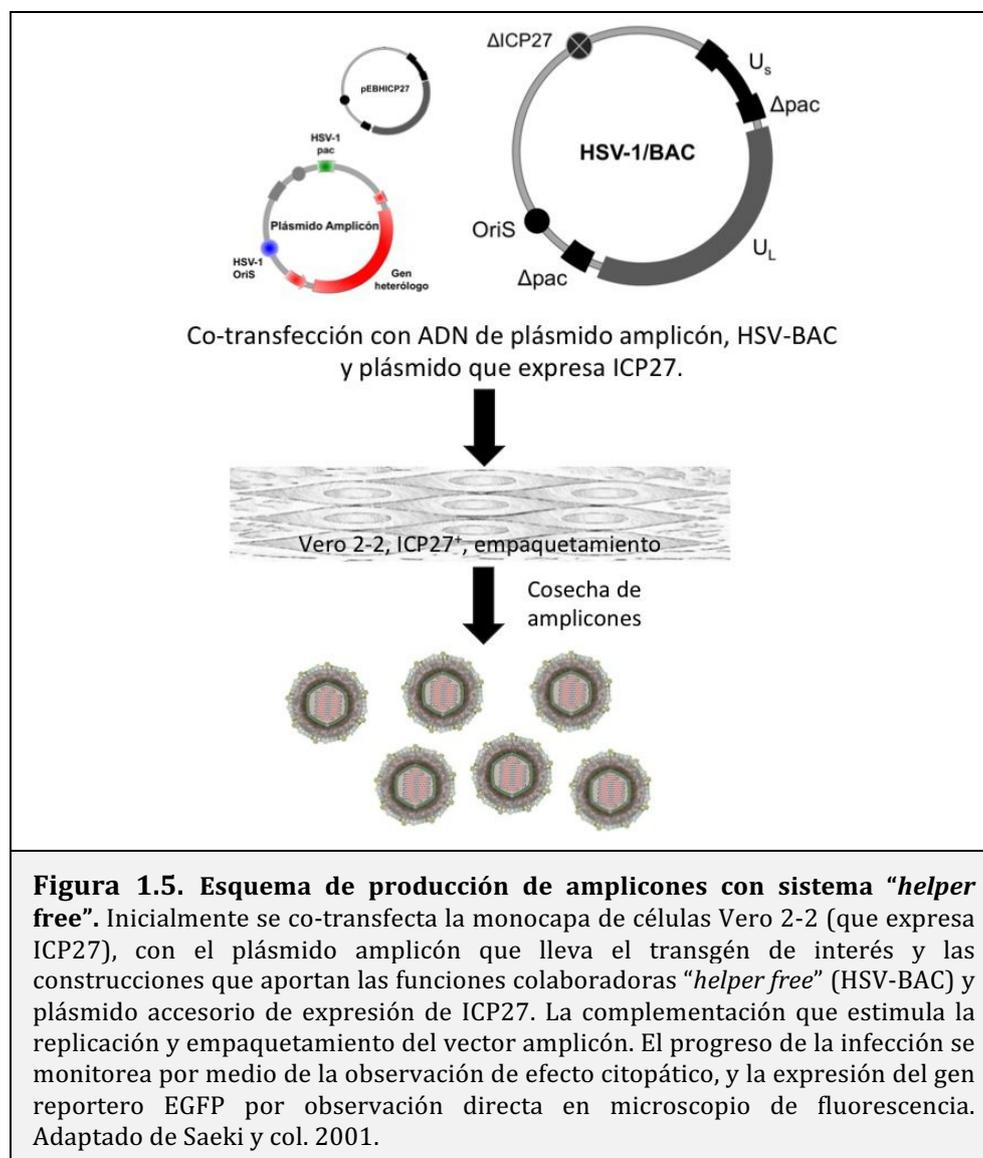
Inicialmente se transfecta la monocapa de células Vero-7b (que expresan ICP4 e ICP27), con el plásmido amplicón que lleva el transgén de interés y luego se infecta con el virus “*helper*”. La complementación que estimula la replicación del virus “*helper*”, permite que cumpla con las funciones colaboradoras y ocurra el empaquetamiento de los plásmidos amplicón. El progreso de la infección se monitorea por medio de la observación de efecto citopático, y la expresión del gen reportero EGFP por observación directa en microscopio de fluorescencia. Adaptado de viralzone.expasy.org y Epstein, 2009.

Vectores amplicón empaquetados por el sistema “*helper free*”

La metodología “*helper free*” (o libre de virus colaborador) que se usó en este trabajo, se diferencia del sistema anterior, en que el suministro del material genético viral para lograr el empaquetamiento de los vectores amplicón, se realiza por medio de

un bácmido que contiene un genoma herpético defectivo, que aporta los genes esenciales para la replicación y empaquetamiento de los vectores amplicón. En la Figura 1.5, se observa un esquema de la metodología empleada, que utiliza la cotransfección de dos componentes, el plásmido amplicón y ADN del bácmido HSV-1/BAC.

Existe otra metodología que utiliza un sistema constituido por un set de cósmidos que portan fragmentos superpuestos que incluyen todo el genoma viral, en vez de una única molécula de ADN defectiva como el caso del bácmido mencionado. Aplicando cualquiera de las dos estrategias mencionadas, lo que ocurre es el ingreso del genoma viral a la célula sin la presencia de proteínas regulatorias.



La ausencia de estas actividades regulatorias, hace que el inicio de la temporalidad en la expresión génica no sea potencialmente la óptima para la

producción de vectores amplicón. Este problema se resuelve por medio de complementación adicional con plásmidos, y el uso de una línea celular denominada Vero 2-2, los cuales expresan genes virales esenciales. Los sistemas de complementación utilizados en este trabajo expresan el gen ICP27 (Bowers y col., 2001; Fraefel y col., 2011; Laimbacher y Fraefel, 2014; Marconi y col., 1996; Weir, 2001).

Las partículas de vector amplicón obtenidas con esta metodología, se cuantifican por medio de titulación en monocapas de células Vero o Vero 2-2, ya que al no poseer genoma viral no podrán replicar, pero sí serán capaces de ingresar a las células y expresar los transgenes, entre ellos el reportero EGFP, por medio del cual se determinan las UFF/ml.

Uso de HSV-1 como presentador de epitopes antigénicos en su superficie

Por medio de la modificación genética de HSV-1, se puede aplicar otra estrategia de presentación antigénica, para la expresión por ejemplo de un epitope neutralizante viral expresado en la superficie de las partículas de un vector herpético. En la estrategia descrita en el presente trabajo, la inserción de un epitope de interés se realiza en el genoma de la cepa F de HSV-1 (Tanaka y col., 2003), por medio de una metodología de recombinación homóloga facilitada en un sistema que se lleva a cabo en *E. coli* (Warming y col., 2005).

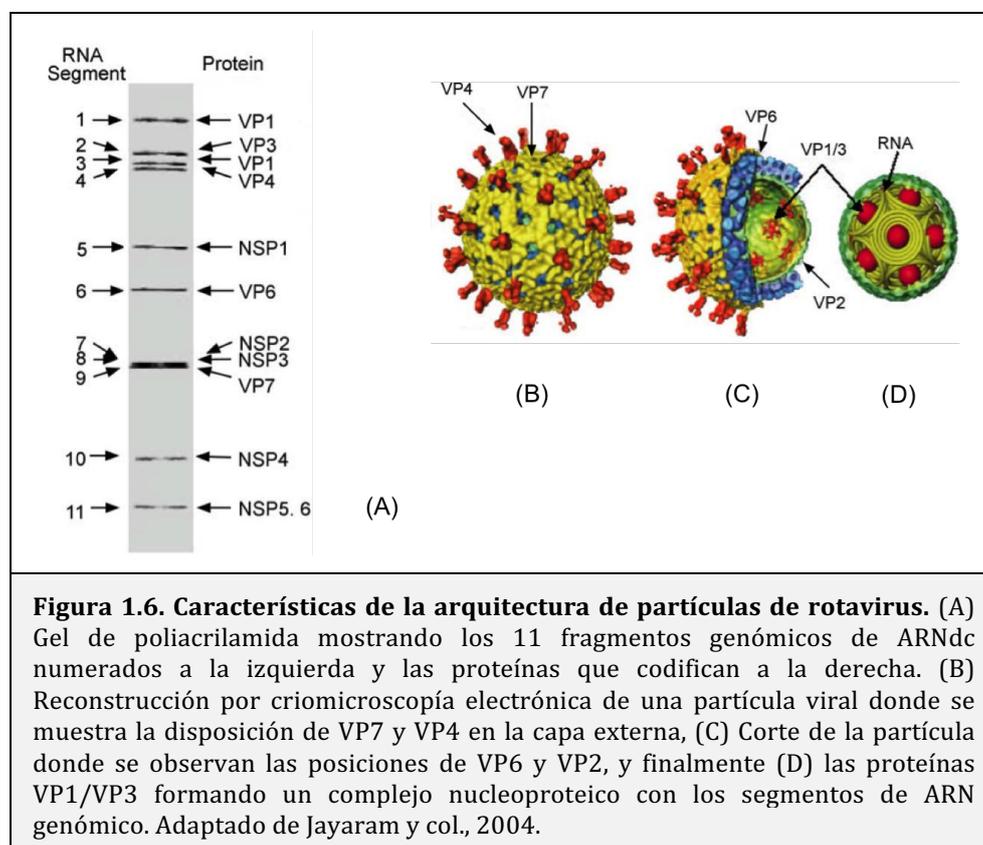
Los vectores basados en HSV-1, utilizados en el presente trabajo, poseen un nivel de seguridad alto ya que son sistemas no replicativos en células normales, permitiendo una eficiente expresión génica (Berto y col., 2005; Epstein, 2009, 2005a, 2005b; Frenkel, 2006; Jerusalinsky y col., 2012; Lachmann, 2004; Laimbacher y Fraefel, 2014, 2012; Manservigi y col., 2010; Marconi y col., 2009; Santos y col., 2006; Sena-Esteves y col., 2000). Los vectores herpéticos descritos, se utilizaron para la expresión de diferentes antígenos pertenecientes a: *Anaplasma marginale*; rotavirus del Grupo A y C; y Virus de la Fiebre Aftosa.

1.2 Rotavirus

Las infecciones ocasionadas por rotavirus son la principal causa de gastroenteritis severas en niños menores a 5 años de edad, responsable de la muerte de aproximadamente medio millón de niños, principalmente en países subdesarrollados de todos los continentes (Shaw, 2013; White Johanson y col., 2010). Estos virus se

identificaron como el agente etiológico de esta patología en humanos en 1973 (Bishop y col., 1973), mientras que unos años antes, ya se habían descrito en roedores (Pappenheimer y Enders, 1947; Pappenheimer y Sargent Cheever, 1948), simios (Malherbe y Harwin, 1963) y bovinos (Mebus y col., 1973, 1969; Stair y col., 1973).

Un virión de rotavirus es una partícula icosaédrica no envuelta de unos 100 nm de diámetro, que rodea a un genoma constituido por 11 segmentos de ARN de doble cadena, que codifican para 6 proteínas estructurales (PE: VP1-VP4 y VP6-VP7) y 6 no estructurales (NSP1-NSP6). Las PEs de la cápside viral, están distribuidas en un arreglo de tres capas concéntricas rodeando al genoma viral formadas por VP2, VP6 y VP7, mientras que VP4 forma espículas que permanecen ancladas a la capa externa (Desselberger, 2014; Estes y Cohen, 1989; Gray y col., 2010), Figura 1.6. Las proteínas no estructurales, cumplen funciones diversas, incluyendo replicación genómica, ensamblado de partículas, regulación de la respuesta innata del huésped, y estimulación de la expresión de genes virales (Hu y col., 2012b). La capa interna que rodea al genoma viral está conformada por la proteína VP2, acompañada en el interior por las enzimas ARN-polimerasa-ARN-dependiente (VP1), y la ARN-guanilil metil-transferasa (VP3) (Desselberger, 2014; Jayaram y col., 2004).



Los rotavirus (RV) son integrantes de la familia *Reoviridae*, donde comparten muchas características morfológicas y bioquímicas con otros 14 géneros. Una de las metodologías de clasificación se realiza de acuerdo a la reactividad serológica que permite definir 8 grupos virales (de A a H) (Matthijnsens y col., 2012). Dentro de los RV del grupo A que infectan humanos, se ha establecido otra clasificación basada en otras dos proteínas virales (VP7 y VP4), donde se identificaron al menos 27 “G-tipos” (determinados por la secuencia de VP7) y 37 “P-tipos” (determinados por la secuencia de VP4). Dentro de la clasificación por tipo P, se ha introducido una doble nomenclatura basada en la combinación del genotipo y el serotipo, por ejemplo P1A[8] designa el serotipo 1A y genotipo 8. Recientemente se ha propuesto una clasificación más compleja, basada en la secuencia del genoma completo, la cual revela una gran variabilidad entre los RVs circulantes (Maes y col., 2009; Matthijnsens y col., 2008; McDonald y col., 2009).

Respecto de RVs del grupo C, si bien fueron descritos inicialmente como agentes similares a RVs (Rodger y col., 1982), se sabe que también son causa de gastroenteritis en humanos. No poseen una clasificación formal basada en VP7 (“G-tipo”) y VP4 (“P-tipo”), pero se han diferenciado en la bibliografía 4 serotipos G. Los RV humanos del grupo C analizados, por lo general se agrupan en un solo genotipo RVC G4, con un alto grado de conservación entre ellos, y cuya presencia se ha identificado en todo el mundo (Adah y col., 2002; Araújo y col., 2011; Bányai y col., 2006; Castello y col., 2009; Esona y col., 2008; Gabbay y col., 2008; Khamrin y col., 2008; Kumazaki y Usuku, 2014; Luchs y do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky, 2015; Marton y col., 2015; Medici y col., 2009; Mitui y col., 2009; Rahman y col., 2005; Schnagl y col., 2004), siendo reconocidos como un problema de salud importante, ya que son responsables de episodios esporádicos y brotes de gastroenteritis en niños y adultos, pero con una epidemiología y ecología menos conocida que para RVs del grupo A.

El ciclo de replicación comienza con una interacción compleja del virión con la membrana celular (López y Arias, 2004), interactuando primero la subunidad VP8* (producto de la activación de la proteína VP4 por medio del clivaje proteolítico en dos subunidades VP8* y VP5*) con el ácido siálico del receptor celular, (Dormitzer y col., 2004). Recientemente se ha demostrado que ciertas cepas de RV son capaces de interactuar con receptores en ausencia de ácido siálico (Hu y col., 2012a). Como correceptores, pueden actuar otras moléculas celulares, por ejemplo integrinas que se

asocian con VP5* o VP7 (Gutierrez y col., 2010). La importancia relativa de los diferentes receptores de rotavirus humanos es un área de estudio que aún está siendo explorada (Fleming y col., 2014).

Una vez que interactúa con su receptor celular, VP4 sufre un cambio conformacional que expone VP5*. Es por esto, que el tratamiento con la proteasa tripsina favorece esta transición confiriendo mayor infectividad *in vitro* a las partículas virales, lo que es muy útil para la propagación de estos virus en cultivos celulares. Luego de esta interacción el mecanismo de ingreso puede ser mediado por endocitosis (dependiente o no de clatrina, según la cepa de RV) o penetración directa de la membrana, con solubilización de la capa externa de las partículas debido al descenso de Ca^{+2} dentro de los endosomas. Aparentemente en la vía endocítica que siguen diferentes cepas estaría involucrada inicialmente la proteína VP4 (Díaz-Salinas y col., 2014). Por lo expuesto en la bibliografía consultada, existen varios factores que estarían involucrados en la entrada de RVs a la célula huésped, demostrando su gran plasticidad para utilizar más de una vía de ingreso.

Una vez en el citoplasma, las partículas son transcripcionalmente activas generando ARN para síntesis de proteínas de manera temprana, ver Tabla 1, seguida de replicación genómica en una etapa tardía (Lu y col., 2008). Diferentes proteínas de RVs interactúan específicamente formando cuerpos de inclusión citoplasmáticos denominados “viroplasmas”, iniciadas por NSP2 y NSP5 (Contin y col., 2010; Fabbretti y col., 1999). En estos centros de replicación, los complejos de VP1/VP3/ARNsc interactúan con un decámero de VP2, constituyendo las partículas sólo rodeadas por VP2, que son rápidamente cubiertas por VP6, formando partículas de doble capa (DLPs), las cuales migran al retículo endoplásmico (RE), donde interactúan con NSP4, que colabora para la incorporación de la capa más externa formada por VP7 y las espículas de VP4, resultando finalmente en partículas de capa triple (TLPs) que son liberadas de la células huésped por lisis o brotación, dependiendo del sustrato celular.

Tabla 1. Segmentos de ARNdc del rotavirus del grupo A, SA11, y las proteínas codificadas. Adaptado de Mertens y col., 2003. SA11 es un RV que infecta simios y es una cepa de referencia en su grupo.

Segmento genómico (bp)	Producto	Tamaño en aa (Da)	Localización	Funciones y propiedades
1 (3.302)	VP1	1.088 (125.005)	Cápside interna	ARN-polimerasa ARN-dependiente. Parte del complejo de replicación, y del complejo de transcripción con VP3
2 (2.690)	VP2	881 (102.431)	Cápside interna	Proteína estructural de la cápside interna. Parte mínima del complejo de replicación.
3 (2.591)	VP3	835 (98.120)	Cápside interna	Parte del complejo de transcripción en el virión junto con VP1.
4 (2.362)	VP4	776 (86.782)	Cápside externa (espícula)	Forma la espícula de la cápside externa. La infectividad se ve aumentada por digestión con tripsina de VP4 en VP5* y VP8*. Hemaglutinina. Proteína de unión a receptor. Antígeno de neutralización P-tipo.
	VP5*	529 (60.000)		
	VP8*	247 (28.000)		
5 (1.611)	NSP1	495 (58.654)	No estructural	Unión específica a 5'-mARN viral. Interactúa con factor 3 regulatorio de interferón.
6 (1.356)	VP6	397 (48.160)	Cápside intermedia	Proteína mayoritaria del virión, situada en la capa intermedia. Posee determinantes antigénicos de grupos y subgrupos de RV. Implicancia en protección.
7 (1.105)	NSP3	315 (35.600)	No estructural	Unión específica a 3'-ARN viral. Interactúa con eIF4G1 y circulariza ARNm en el complejo de iniciación. Está involucrada en regulación y silenciamiento traduccional en el huésped.
8 (1.059)	NSP2	317 (36.700)	No estructural	Unión no-específica a ARNsc, involucrada en la formación de viroplasma junto con NSP5 con quien interactúa junto a VP1.
9 (1.062)	VP7	326 (37.368)	Cápside externa (glicoproteína)	Glicoproteína estructural de la capa externa del virus. Antígeno de neutralización G-tipo. Interviene en la penetración de la membrana de la célula huésped.

10 (751)	NSP4	175 (20.290)	No estructural	Enterotoxina. Proteína transmembrana, receptora de DLPs a nivel del RE, mediando el pasaje a través de su membrana. Provoca movilización de $[Ca^{2+}]_i$ en la célula huésped.
11 (667)	NSP5	198 (21.725)	No estructural	Posee actividad de quinasa autocatalítica, amentada cuando interactúa con NSP2.
	NSP6	92 (11.012)	No estructural	Interactúa con NSP5, se encuentra en viroplasm. Ausente en RV grupo C.

La patofisiología de RV, indica que infecta enterocitos maduros de las microvellosidades intestinales, los cuales tienen funciones importantes en absorción y digestión en el intestino delgado, resultando en alteración de su función de absorción de Na^+ , agua y disacáridos. La malabsorción resulta en el tránsito no digerido de disacáridos, carbohidratos, grasas, y proteínas no digeridas hacia el colon, los cuáles son osmóticamente activos, y conducen a un cuadro diarreico. La enterotoxina NSP4 tiene un papel importante en el desbalance electrolítico (Ca^{2+}). La gastroenteritis ocasionada por rotavirus es multifactorial, en respuesta a la infección viral y la respuesta inmune del huésped (Ramig, 2004).

La respuesta inmune adaptativa está dirigida por células B productoras de anticuerpos específicos contra proteínas virales (Franco y col., 2006; Jaimes y col., 2004), y también por células T específicas de epitopes de RVs, expuestos en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad I y II. Anticuerpos neutralizantes dirigidos contra VP4 y VP7 son importantes en la respuesta antiviral, por mecanismos de exclusión viral, es decir evitando la infección de enterocitos no infectados, los que actúan en conjunto además con la actividad de LT $CD4^+$ y $CD8^+$ (Blutt y col., 2008; Franco y Greenberg, 1999, 1997). De acuerdo con resultados obtenidos en ensayos con animales, los niveles de IgA específica contra RVs medidos a tiempos reducidos post-infección, generalmente correlacionan bien con protección, aunque hay evidencias controvertidas en este aspecto (Franco y col., 2006). Adicionalmente las células B son necesarias para una protección de larga duración frente a RV, como se ha demostrado en ratones deficientes en células B (Franco y Greenberg, 1999). En ratones normales se desencadena tanto una respuesta sistémica de células B como también una respuesta local en mucosas. En la respuesta sistémica se produce una selección clonal de células B,

tanto en el bazo como médula ósea, que expresan inmunoglobulinas de clase G (IgG) y de clase A (IgA). En mucosas, lo más probable es que las células B situadas en las placas de Peyer y la lámina propia del intestino produzcan IgAs poliméricas (Youngman y col., 2002). Este tipo de respuesta concuerda con la etapa de viremia durante la fase aguda de la infección. En un modelo murino de deficiencia en células B y T, RV mantiene una infección crónica, la cual es posible suprimirla por transferencia pasiva de células B que se encuentren dirigidas específicamente a la mucosa intestinal, pero no las que actúen de manera sistémica (células B que expresan receptores específicos para dirigirse a órganos en mucosas (Williams y col., 1998). Esto sugiere la importancia de que las células plasmáticas efectoras se deben localizar en el intestino para su efecto antiviral, y que los anticuerpos séricos no son por sí solos muy eficientes para la protección. Por este motivo, se ha propuesto un modelo en el que los RV estimulan antigénicamente tanto la inmunidad de mucosas como la inmunidad sistémica (Angel y col., 2007; Franco y col., 2006). También se ha observado que anticuerpos específicos IgM o IgG presentes en el intestino, o circulantes en niveles suficientes, pueden alcanzar el intestino por mecanismos desconocidos, y mediar también protección (Kuklin y col., 2001; O'Neal y col., 2000).

Los antígenos virales VP6 y NSP4, son también blancos de anticuerpos protectivos (Ball y col., 1996; Burns y col., 1996; Choi y col., 2003), los dirigidos contra VP6 son los que actuarían en mecanismos de expulsión de viriones, lo que ocurre durante la transcitosis de IgAs poliméricas desde la membrana basolateral al lumen del intestino, éstas se unen a la proteína VP6 y “expulsan” viriones a la luz intestinal, aunque hay evidencia de que no tendrían un efecto antiviral significativo cuando se administran de manera pasiva a la cavidad intestinal, o por medio de la leche materna en ratones lactantes (Burns y col., 1996; Choi y col., 2003; Coste y col., 2000). Por otro lado, los anticuerpos dirigidos contra la proteína NSP4 son capaces de detener la diarrea por neutralización de esta toxina (Ball y col., 1996), pero no impiden el avance de la infección. Por último, se ha propuesto también que hay anticuerpos contra VP6, que impiden la transcripción de RV interrumpiendo el ciclo de replicación en una etapa temprana (Feng y col., 2002).

En lo que respecta a respuesta inmune innata, diferentes experimentos realizados con animales inmunocomprometidos indican que existen mecanismos no completamente caracterizados, capaces de colaborar con la eliminación de RV (Taterka

y col., 1995). En este sentido, las células *Natural Killer*, que si bien no tienen un efecto esterilizante de la infección, podrían estar mediando este efecto anti-RV (Franco y col., 2006).

Para el desarrollo de IgA intestinal, y memoria específica contra RV, es esencial la presencia de las células T CD4⁺, aunque no son de importancia para la eliminación directa del virus (Angel y col., 2007; Franco y Greenberg, 1999, 1997). En ausencia de células T se ha comprobado la persistencia de RV con una baja tasa de replicación. Por otro lado, células T CD8⁺ específicas (relacionadas a la infección primaria por RV), tienen la capacidad de mediar protección parcial a la reinfección durante un período corto de tiempo, siendo más eficientes las células T CD8⁺ que expresan la integrina $\alpha 4\beta 7$, ya que se las direcciona a la mucosa intestinal (Franco y Greenberg, 1999).

A pesar de los aportes que se han logrado tanto en modelos animales como a partir de inmunizaciones en humanos, los mecanismos efectores que actúan luego de una infección natural o luego de vacunación no se encuentran completamente entendidos. Sí se puede decir que hay una correlación entre la IgA sérica, medida inmediatamente luego de la infección, y los niveles de IgA en intestino, constituyendo una buen indicador de protección.

En individuos vacunados la correlación de protección con el nivel de anticuerpos específicos es variable, inclusive varía entre las diferentes vacunas ensayadas hasta el momento. Otros efectores, como los celulares descritos anteriormente tendrían también un rol importante.

Un mayor conocimiento de estos mecanismos protectores ayudaría a lograr un diseño más racional de vacunas, considerando la gran importancia global que tiene esta enfermedad a nivel global.

Vacunas contra rotavirus

Actualmente existen dos vacunas que fueron aprobadas en diferentes países, incluyendo Argentina, RotaTeq (Merck, Nueva Jersey, EUA) y Rotarix (GlaxoSmithKline, Londres, Reino Unido). Estas vacunas fueron habilitadas para vacunación masiva de niños en Estados Unidos en 2006 y 2008 respectivamente, y en Argentina se incorporaron formalmente al calendario de vacunación oficial a partir de enero de 2015. En 2009 la Organización Mundial de la Salud, ya había recomendado la inclusión de las vacunas contra RV en los programas de inmunización nacionales de todos los

países, indicando especialmente la necesidad de introducirlas en aquellos donde las muertes por diarrea superen el 10% de mortalidad en menores de 5 años de edad. La OMS y GAVI “*The Vaccine Alliance*”, han trazado planes para fortalecer países donde la mortalidad infantil es alta y además carecen de infraestructura y recursos económicos para desarrollar programas de vacunación (Martí y col., 2015; Patton, 2012; Uruña y col., 2015).

La vacuna RotaTeq, producida por Merck, es pentavalente y se administra oralmente a niños de 2, 4 y 6 meses de edad. La vacuna contiene virus atenuados de RV bovino cepa W3 que portan genes de RV de humanos de distintos tipos (G1, G2, G3, o G4 VP7 o P[8] VP4) estos virus han sido obtenidos por reasociación (*reassortment*) de segmentos genómicos: [W179-9 (G1P[5]), SC-2 (G2P[5]), WI78-8 (G3P[5]), BrB-9(G4P[5]), y WI79-4 (G6P[8])]. El diseño multivalente deriva de que las respuestas protectoras son de carácter homotípico, es decir específico para el tipo G/P del virus que está ocasionando la infección (Kapikian y col., 2005, 1996). De hecho, los primeros estudios de protección con cepas de RV de animales (por ejemplo RRV G3P[3]) indicaron que estos virus monovalentes eran poco efectivos en inducir protección heterotípica (Christy y col., 1988). Por lo tanto RotaTeq incluye en su composición antigénica a las cepas de RV globalmente dominantes, G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], y G9P[8], indicando que la vacuna debería proveer una respuesta inmune efectiva contra éstas cepas, así como otras menos frecuentes (por ej., G12P[8] y G2P[6]), requiriéndose también, la inducción de respuesta inmune heterotípica para el caso de virus emergentes como es el caso de G12P[6] (Patton, 2012).

Rotarix (GlaxoSmithKline), es una vacuna atenuada monovalente que es administrada oralmente a niños de 2 a 4 meses de edad (O’Ryan, 2007). El único componente de la vacuna es el virus RIX4414 (G1P[8]), derivado de un aislamiento (Ruiz-Palacios y col., 2006). Dada la presencia de proteínas específicas para los tipos G1- y P[8]-específicas en RIX4414, la inmunización con Rotarix induciría respuestas homotípicas que protegen a los individuos vacunados contra los RV globalmente dominantes excepto para los genotipos G2P[4]. Sin embargo, hay reportes que indican que Rotarix también es efectivo en contra estas cepas heterólogas, previniendo diarrea severa. No está claro si esta protección cruzada se debería a la generación de anticuerpos neutralizantes dirigidos a VP7 o VP4, a anticuerpos contra proteínas internas (VP6 y NSP2), o bien a linfocitos T citotóxicos (Patton, 2012).

Otra vacuna que había sido aprobada en 1998, Rotashield® (Wyeth, NJ, EUA), resultante de la reasociación de una cepa de RV humano con RV de simio, fue retirada del mercado al año siguiente por asociarse a problemas de invaginación intestinal en la población vacunada, un caso cada 10.000 vacunados, luego de la primer dosis.

La introducción de RotaTeq y Rotarix ha resultado en una significativa reducción de los niveles requeridos de atención de salud debida a gastroenteritis ocasionada por RV, principalmente en países desarrollados. En contraste, hay pruebas clínicas que indican que estas vacunas son mucho menos eficaces en algunos países subdesarrollados, por razones que aún no son muy bien comprendidas (Armah y col., 2010; Patel y col., 2011; Zaman y col., 2010). Es importante considerar que estas vacunas se desarrollaron de manera casi completamente empírica, quedando aún sin elucidar algunos mecanismos que llevan a la inducción de protección.

Se presentan desafíos importantes hacia futuro, considerando que estas vacunas están compuestas de virus genéticamente fijos, siendo que los RV en la naturaleza son virus que componen una familia dinámica que se excretan en altos títulos por cada individuo infectado. Se deberá considerar el desarrollo de nuevas herramientas, nuevos agentes vacunales y profundizar el estudio de las bases inmunológicas de los procesos inducidos en los individuos protegidos con vacunación (Parashar y col., 2013; Patton, 2012).

1.3 Anaplasmosis

La Anaplasmosis bovina, ocasionada por *Anaplasma marginale* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae* (Dumler y col., 2001)), es una enfermedad infecciosa que en su fase aguda provoca que los animales infectados presenten anemia severa e ictericia sin hemoglobinemia ni hemoglobinuria, debido a la fagocitosis de los eritrocitos infectados por el sistema reticuloendotelial, pérdida de peso, fiebre, abortos, disminución de la producción de leche, y a menudo letargia seguida de muerte (Kocan y col., 2010; McGarey y col., 1994). Las pérdidas económicas son de gran importancia en regiones donde esta rickettsia es endémica (Kocan y col., 2003; OIE, 2012). Este patógeno es diseminado por medio de garrapatas o transferencia mecánica de sangre infectada, por medio de otros insectos hematófagos vectores, o por instrumentos contaminados incluyendo agujas, caravanas, equipo para quitar cuernos y elementos de castración (transmisión iatrogénica). Adicionalmente es posible la transmisión transplacentaria,

siendo todos estos mecanismos los que contribuyen a la epidemiología de la enfermedad (Aubry y Geale, 2011; Kocan y col., 2004). La Anaplasmosis bovina está presente principalmente en regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial. Bovinos de cualquier edad son susceptibles a la infección, la cual es más severa con el aumento de la edad. Una vez que el animal se infecta se torna portador el resto de su vida.

Un modelo de respuesta inmune inducida en los bovinos, propone que el patógeno es eliminado de la circulación en el huésped mediante anticuerpos dirigidos contra epitopes situados en la superficie del mismo, en combinación con la activación de la fagocitosis por macrófagos y posterior destrucción. La pieza central de este modelo es la presencia de linfocitos T CD4⁺ que expresan INF- γ , lo que aumenta la síntesis de IgG que puede opsonizar al patógeno, activando los macrófagos que aumentan la expresión de los receptores específicos y consecuentemente la fagocitosis. Sin embargo también se ha demostrado que si bien los linfocitos T CD4⁺ son importantes, la presencia respuesta humoral específica es esencial para contener la infección ocasionada por *A. marginale* (Kocan y col., 2010).

Vacunas contra Anaplasmosis

Las medidas de control aplicadas para la anaplasmosis, no ha cambiado mucho en los últimos 70 años y varían según la localización geográfica, incluyendo control de artrópodos mediante la aplicación de acaricidas, administración de antibióticos y vacunación. El control de artrópodos es una tarea compleja en algunas áreas, y previene sólo parcialmente la transmisión de *A. marginale*. Por otro lado existen zonas donde la transmisión mecánica es importante, tanto por medio de insectos hematófagos, por instrumental contaminado, o transmisión iatrogénica. La quimioprofilaxis, utilizada más frecuentemente en EUA que en otros países, es costosa y a veces no siempre aplicable a todo el ganado. El uso intensivo de antibióticos tiene el problema de ocasionar selección de cepas resistentes. La vacunación ha sido la forma más económica y efectiva de control de anaplasmosis a nivel mundial.

Las vacunas existentes pueden dividirse en dos tipos principales: vacunas vivas e inactivadas. Ambas se basan en el uso de cepas de *A. centrale* o *A. marginale*, obtenidas a partir de cultivo eritrocitos de bovino infectados. Estas vacunas inducen inmunidad protectora, reduciendo o previniendo la enfermedad clínica, pero no evitan la infección persistente del ganado con *A. marginale*. La infección persistente, es el factor que más

contribuye a la dispersión de *A. marginale* ya que estos animales actúan como reservorios y fuente de infección de garrapatas (Kocan y col., 2003, 2000). Por otro lado, la inmunidad producida por este tipo de vacunas no siempre es uniforme frente a todas las cepas, habiéndose detectado brotes aún en animales vacunados (Bock y de Vos, 2001; Turton y col., 1998; Wilson y col., 1980). *Anaplasma centrale* es utilizada en nuestro país como vacuna viva, esta vacuna es producida principalmente por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, pero se sabe que si bien reduce los efectos de la enfermedad, no previene la dispersión del patógeno. Otras limitaciones intrínsecas de este tipo de vacunas, son la necesidad de criopreservación, y la posibilidad de inducir iso-anticuerpos contra eritrocitos, transmitidos a través del calostro, resultando en isoeritrolisis en el neonato (Aubry y Geale, 2011).

Nuevas vacunas contra la Anaplasmosis

En la búsqueda de determinantes bacterianos responsables de inducir protección suficiente para eliminar el patógeno circulante, se aplicaron diferentes estrategias.

Vacunas basadas en extractos bacterianos y a subunidad

Se ensayaron inmunizaciones con fracciones proteicas de *A. marginale*, en las que se incluyen las proteínas principales de superficie. En estos experimentos, si bien se logró una disminución de la rickettsemia, no se obtuvo una buena respuesta en la totalidad de animales al desafío con el patógeno (Palmer y col., 1994; Tebele y col., 1991). Se han descrito 6 proteínas principales de superficie (MSPs) que podrían estar involucradas en una respuesta inmune protectora: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5 (Kocan y col., 2003; Oberle y col., 1993; Tebele y col., 1991; Visser y col., 1992). Estas proteínas son responsables de la interacción de *A. marginale* con las células huésped, a las que recientemente se han sumado más de 20 antígenos subdominantes como VirB2, VirB7, VirB9, VirB10, VirB11, entre otros (G Junior y col., 2010; Lopez y col., 2005; Suttén y col., 2010).

Por otro lado, se ensayaron vacunas a subunidad, formuladas con algunas de las MSPs (MSP1a, MSP1b, MSP4 y MSP5), utilizando diferentes adyuvantes, arribando a resultados interesantes en cuanto a la inducción de respuesta inmune específica en ratones (Kawasaki y col., 2007) y bovinos (Gasparini y col., 2013). Sin embargo, al ser

evaluadas en ensayos de desafío, no se alcanzaron niveles satisfactorios de inmunidad esterilizante (Gasparini y col., 2010; Palmer y col., 1989).

En este camino de expresión de antígenos recombinantes en diferentes sistemas, se han desarrollado *E. coli* recombinantes que expresan antígenos de *A. marginale* (MSP1 a y b), las que se utilizaron para evaluar la respuesta inmune específica generada en ratones con resultados interesantes (Tamekuni y col., 2009).

Vacunas de ADN

En cuanto a vacunas de ADN, se han implementado estrategias promisorias, orientadas a mejorar la presentación antigénica en bovinos, utilizando construcciones con las que se co-expresan moléculas inmunomoduladoras, por ejemplo Flt3L y GM-CSF, aumentando significativamente el reclutamiento de células dendríticas (CDs) en el sitio de inoculación (Encke y col., 2006; Mwangi y col., 2002). Otro ejemplo es el uso de la proteína de BoHV-1 BVP22 (Zheng y col., 2005). Epitopes de MSP1 clonados en el mismo marco de lectura que BVP22, generaron una respuesta inmune mayor que MSP1 presentada de manera individual (Mwangi y col., 2007, 2005). Por otro lado, y de una manera más clásica, otros trabajos abordaron el uso de vacunas a ADN, con mayor número de proteínas (MSP1a, MSP1b y MSP5), observándose una buena respuesta específica en ratones, luego de cinco dosis (Kano y col., 2008). En un experimento similar en bovinos, pero esta vez con vacunas ADN que expresan más antígenos, MSP1a, MSP1b, MSP5, VirB9 y VirB10, se evidenció el estímulo de la respuesta inmune específica, pero no previno de infección frente al desafío con una cepa virulenta (Coelho y col., 2010).

Anaplasma marginale en cultivo celular

La inoculación de bovinos con cultivos inactivados de *A. marginale*, producidos en células de garrapatas IDE8 (ATCC), generó protección frente a la aparición de signos clínicos, pero al igual que con *A. centrale*, no previno la infección (Blouin y Kocan, 1998; Blouin y col., 2000; de la Fuente y col., 2002; Kocan y col., 2001; Passos, 2012).

Transformación de Anaplasma marginale

Esta estrategia consiste en modificar el genoma de *A. marginale* por recombinación homóloga, para generar *knock-outs*, introducir genes inmunomoduladores, o marcadores. Estos organismos genéticamente modificados, no han podido resolver el problema de la generación de inmunidad esterilizante contra

patógeno. Como problema adicional, los clones obtenidos resultaron más difíciles de replicar que la cepa parental de donde fueron obtenidos (Felsheim y col., 2010; Hammac y col., 2013; Noh y col., 2011).

Vectores virales

En la mayor parte de los sistemas de vacunas genéticas ocurre la internalización del ADN, y la posterior expresión del antígeno codificado en el mismo, imitando lo que ocurriría en el caso de utilizar vacunas vivas. Sin embargo, las vacunas a ADN no tienen facilitado libremente el ingreso a la célula, para la posterior expresión y presentación antigénica. Es por esto último, que para aumentar la efectividad, deben ser vehiculizadas para poder promover estos procesos, es en este sentido que los vectores virales defectivos aportan su capacidad de ingreso a células del sistema inmune, y se presentan como estrategias más eficaces y seguras que las vacunas convencionales contra *A. marginale*, con la potencialidad de una correcta presentación antigénica, y la ventaja de no replicar en el huésped. Utilizando este tipo de vacunas basada en sistemas de vectores virales, se ha reportado el uso del virus vaccinia para la expresión de MSP1a, obteniendo respuesta humoral específica en ratones. Aunque la respuesta celular no fue evaluada, se demostró la posibilidad de inducir respuesta inmune específica con este sistema (McGuire y col., 1994).

En países donde la anaplasmosis es endémica, se han utilizado varios métodos de inmunización, pero hasta el momento ninguno ha resultado efectivo (OIE, 2012), en el sentido de evitar la persistencia del patógeno en los animales reservorios. Este escenario desalentador se debe en parte a un limitado conocimiento de la biología de *A. marginale*, el cual está actualmente avanzando gracias al análisis de la secuenciación del genoma, y la asociación de características de diferentes cepas (Agnes y col., 2011; Brayton y col., 2005; Dark y col., 2011; Ducken y col., 2015; Herndon y col., 2010). El éxito de nuevas vacunas va a depender de la capacidad que éstas tengan para imitar, o redireccionar la respuesta del huésped hacia el bloqueo de la infección, utilizando antígenos nuevos, dominantes y subdominantes que sean blancos promisorios, sumándose a los previamente conocidas proteínas de superficie (Albarrak y col., 2012; Aubry y Geale, 2011; Ducken y col., 2015).

1.4 Virus de la Fiebre Aftosa

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad que afecta a animales biungulados (*artiodáctilos*), destacándose aquellos de mayor importancia económica, como bovinos, porcinos, ovinos y caprinos, aunque esta lista se podría extender a más de 70 especies diferentes susceptibles a la infección natural o experimental (Casas Olascoaga y col., 1999; Mahy, 2005; Pereira, 1981).

La FA es una enfermedad vesicular aguda, altamente contagiosa e inmunológicamente compleja, de diseminación muy rápida, y es la que causa más pérdidas económicas en la ganadería (Casas Olascoaga y col., 1999; Mahy, 2005; Sobrino y Domingo, 2004).

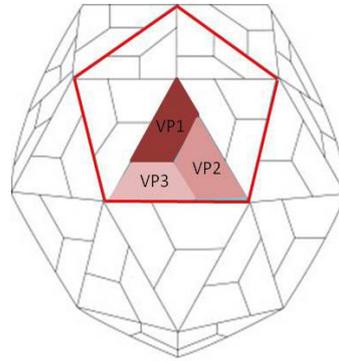
Su agente causal es el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA), un virus de genoma a ARN, el cual, de forma semejante a lo que ocurre con otros virus a ARN, presenta un alto polimorfismo genético y antigénico (Bachrach, 1968; Domingo y Holland, 1997; Pereira, 1976), verificándose la existencia de siete serotipos con características serológicas diferentes: O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia. Debido a estas diferencias, los animales recuperados de la infección o vacunados contra un serotipo viral, son susceptibles a la infección por cepas de otros serotipos, e inclusive por algunas variantes dentro del mismo serotipo (Bachrach, 1968; Brooksby, 1982; Cartwright y col., 1982).

La FA figura en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE. La proximidad geográfica y la existencia de intercambios comerciales con países en los que la FA es endémica, impone un riesgo permanente de reintroducción en los países libres. De hecho, en los últimos años se han registrado numerosos brotes de FA en países que se consideraban libres de la enfermedad, como es el caso de Taiwán (Dunn y Donaldson, 1997), en países de Europa, como Grecia, Rusia, y los Balcanes, (Valarcher y col., 2008), en Japón (Sakamoto y Yoshida, 2002), en el Reino Unido (Samuel y Knowles, 2001) y en regiones ya declaradas libres de América del Sur (König y col., 2007; Malirat y col., 2007; Maradei y col., 2013; Mattion y col., 2004). La información detallada y actualizada sobre la situación actual de la FA se registra periódicamente en la página web de la Organización Mundial de Salud Animal (<http://www.oie.int>).

El VFA es un virus desnudo de estructura icosaédrica. La región codificante del genoma da origen a una única poliproteína que, tras ser traducida, es procesada proteolíticamente, por las proteasas virales dando lugar a las distintas proteínas

maduras estructurales: VP4, VP2, VP3, VP1, que forman parte del virion (Figura 1.7) y no estructurales: L, 2A, 2B, 3A, 3B, 3C y 3D (Palmenberg, 1990).

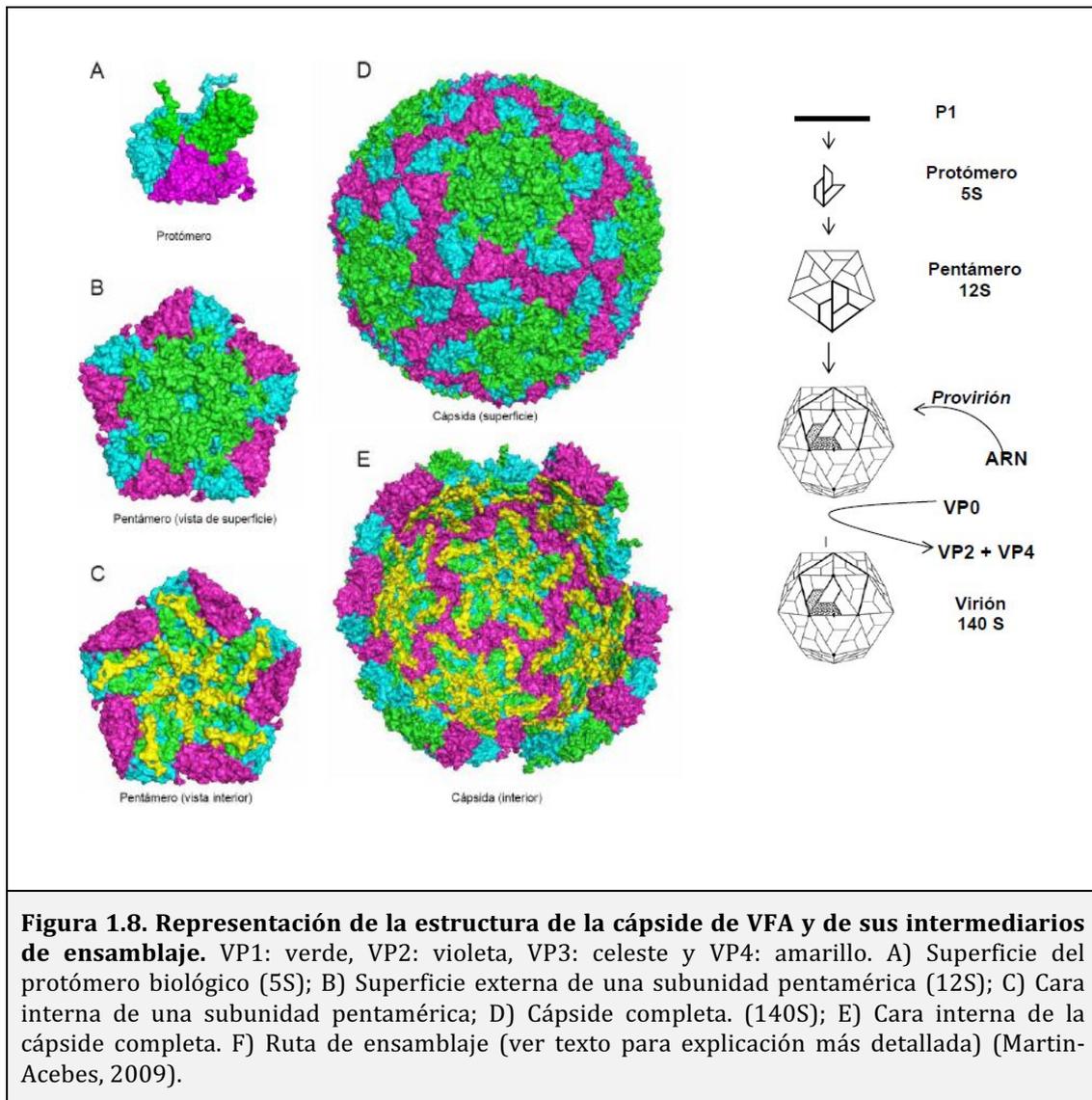
Figura 1.7. Diagrama esquemático de la cápside del VFA. Las cuatro proteínas estructurales, VP1-4, forman la menor subunidad de la cápside, el protómero. Cinco protómeros se unen para formar un pentámero, y 12 pentámeros constituyen la cápside completa. La proteína VP4 está localizada en la cara interna, por lo cual no se visualiza en la representación (Giraldez, A.- Tesis doctoral, 2013)



En ciertas circunstancias es posible detectar partículas que presentan un coeficiente de sedimentación de 75S, las cuales se reconocen como cápsides vacías; y son productos naturalmente defectivos que contienen moléculas de VP1, VP3 y un precursor denominado VP0 (que da origen a VP2 y VP4), pero no contienen ARN viral.

En la Figura 1.8 se representa la estructura de la cápside viral y sus intermediarios.

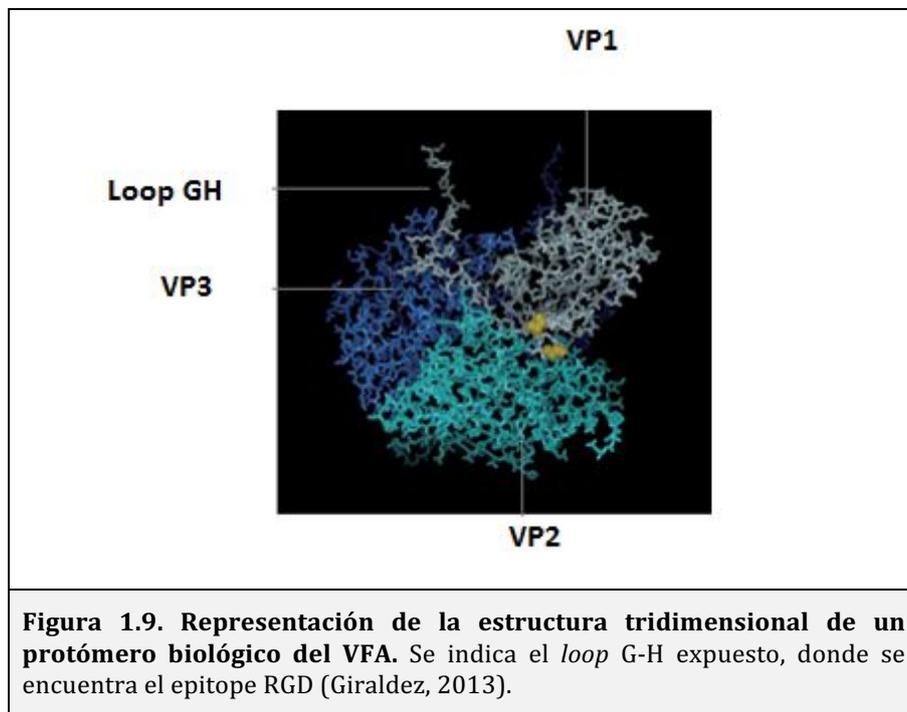
El reconocimiento de las células blanco por el VFA ocurre a través del triplete de aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp), ubicado en el "loop" GH de la proteína VP1, que se une a una serie de integrinas, como $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta6$ y $\alpha\beta8$, que actúan como receptores celulares (Baranowski y col., 2001; Baxt y Becker, 1990; Baxt y Rieder, 2004; Burman y col., 2006; Fox y col., 1989; Mateu y col., 1996; Neff y col., 1998; Robertson y col., 1983).



Los estudios de estructura viral revelan que el “loop” GH es una protrusión desordenada, expuesta y flexible (Acharya y col., 1989; Verdaguer y col., 1999) (Figura 1.9), con el motivo RGD conservado rodeado de aminoácidos altamente variables (Carrillo y col., 2005; Ruiz-Jarabo y col., 2004). Algunas de las posiciones adyacentes al RGD tienen importancia en el reconocimiento del receptor (Burman y col., 2006; Mateu y col., 1996).

La estructura terciaria en forma de barril β compuesto por 8 cadenas β antiparalelas conectadas por bucles de longitud variable compartida por los polipéptidos VP1-3 es la que define la antigenicidad de cada serotipo. El principal sitio antigénico, implicado en la neutralización de la infectividad viral, se localiza en el “loop” G-H de VP1, localizado en las posiciones 140-160 aproximadamente, dependiendo del serotipo (Baranowski y col., 2001; Bittle y col., 1982; Mateu y col., 2004). El triplete

RGD, que como mencionamos anteriormente interviene en el reconocimiento del receptor, se localiza en la zona central de este “loop”.



Respuesta inmune contra el virus de la fiebre aftosa

Como consecuencia del proceso infeccioso, el VFA induce una respuesta inmune protectora para posteriores desafíos frente al virus. Esta respuesta inmune es estimulada específicamente e induce una eficiente protección frente a reinfecciones con virus homólogos o relacionados antigénicamente (Collen, 1994).

Se ha descrito una buena correlación entre los niveles de anticuerpos específicos medidos *in vitro* y la protección *in vivo* (Robiolo y col., 2010, 1995; Van Maanen y Terpstra, 1989).

Vacunación contra el VFA

Las vacunas contra el VFA que se usan en la actualidad, y que han permitido erradicar la enfermedad en numerosos países, se elaboran a partir de la inactivación química de partículas virales completas producidas en cultivos celulares. Estas vacunas se producen a nivel industrial, por infección células BHK-21 en suspensión (Stoker y MacPerson, 1964), incluyendo cepas de diferentes serotipos virales ajustando la formulación antigénica a los requerimientos locales, en función de las cepas circulantes (Mattion y col., 2009; Paton y col., 2005). Cabe destacar que existieron desarrollos para

producir vacunas basadas en virus atenuados, natural o artificialmente (Barteling, 2004), pero estos intentos se abandonaron principalmente debido a la complejidad de la diversidad antigénica, y la probabilidad de reversión al fenotipo virulento.

Las vacunas inactivadas convencionales presentan algunas desventajas, entre las cuales la necesidad de manipulación de virus infeccioso es una de las más notorias, por lo que se ha trabajado desde hace bastante tiempo en diferentes aproximaciones para el desarrollo de nuevas vacunas. Por ejemplo, se han realizado estudios con vacunas basadas en péptidos sintéticos (Cubillos y col., 2008; Shieh y col., 2001; Taboga y col., 1997; Zamorano y col., 1994), en donde se ha demostrado recientemente que puede mejorarse la respuesta inmune asociándolos a epítopes T-colaboradores (Th) promiscuos (Wang y col., 2002), o bien diseñando péptidos de modo tal que se logre la correcta exposición de sitios antigénicos discontinuos (Villén y col., 2002); también se ha abordado la generación de vacunas a subunidades proteicas, mediante la inoculación de proteínas inmunogénicas producidas por técnicas de ADN recombinante (Broekhuijsen y col., 1986; Strohmaier y col., 1982), incluyendo proteínas de fusión con antígenos foráneos, y nuevas vacunas atenuadas (Chinsangaram y col., 1998). Otras metodologías incluyen vacunas producidas a partir de partículas virales vacías (VLPs) (Abrams y col., 1995; Grubman y col., 1993). Si bien se cuenta con resultados promisorios, hasta la fecha ninguna de estas metodologías se ha mostrado completamente satisfactoria.

Recientemente se han publicado estudios donde se analiza el uso de vectores virales no replicativos que expresan las proteínas de cápside del VFA, y producen cápsides vacías, en estrategias de "*prime-and-boost*". Los resultados los muestran como una alternativa interesante de aplicación de inmunógenos recombinantes de nueva generación en la lucha contra la fiebre aftosa (D'Antuono y col., 2010; Romanutti y col., 2013).

2 Hipótesis

El eje central de la hipótesis de trabajo es que el uso de vectores derivados del virus Herpes Simplex-1 (HSV-1) podría representar una herramienta de utilidad para la transferencia de genes a células de mamíferos, para la expresión *in situ* de antígenos heterólogos que eventualmente puedan estimular el sistema inmunológico del huésped.

La vehiculización de genes de rotavirus de grupo A o grupo C, en particular los que codifican para las proteínas estructurales VP2, VP4, VP6, VP7, en distintos tipos de vectores derivados de HSV-1 podría determinar la expresión *in situ* de las proteínas que sean capaces de generar una respuesta inmune relevante para el desarrollo de nuevas vacunas contra este patógeno. De igual modo, la expresión en células de mamíferos del gen de la proteína de superficie MSP5 de *Anaplasma marginale*, podría constituir un avance en el estudio de la respuesta inmune inducida por vacunas genéticas contra este patógeno, al ser vehiculizadas por vectores herpéticos.

Asimismo, vectores virales basados en HSV-1 podrían ser utilizados como presentadores de epitopes de relevancia biológica en su superficie. Por ejemplo, la de un epitope heterólogo neutralizante (RGD) del Virus de la Fiebre Aftosa, mediante la modificación de glicoproteínas de membrana de HSV-1, en particular la glicoproteína C (gC), generando virus defectivos que contengan inserciones de secuencias de otros patógenos.

Dadas sus características, estos vectores podrían ser útiles además para estudiar la distribución y/o asociación de proteínas en distintos compartimentos celulares.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Construir vectores derivados de herpesvirus (virus defectivos y amplicones) aptos para la expresión *in situ* en células de mamíferos, de proteínas de patógenos que afectan a humanos y animales, con el fin de que constituya un aporte al desarrollo de nuevas vacunas

3.2 Objetivos específicos

- Generar virus defectivos y amplicones derivados de HSV-1, aptos para expresar distintas proteínas de patógenos que afectan a humanos y animales, en particular de Rotavirus de tipos A y C, y de la rickettsia *Anaplasma marginale*.
- Construir un vector viral herpético defectivo capaz de exponer en la membrana un epítipo inmunológicamente relevante perteneciente al virus de la Fiebre Aftosa, fusionado a la glicoproteína C de HSV-1.
- Establecer una plataforma de trabajo para la producción de los distintos vectores herpéticos, y estandarizar los parámetros de cultivo, transfección, infección y titulación de los vectores mencionados, utilizando la expresión de genes reporteros como EGFP o β -galactosidasa.
- Evaluar los vectores herpéticos generados, como inmunógenos en un modelo murino.
- Estudiar la factibilidad del uso de vectores amplicón en estudios moleculares básicos, en particular interacciones entre proteínas virales o con otras proteínas celulares.

4 Materiales y métodos

4.1 Líneas celulares

4.1.1 Vero (ATCC: CCL-81TM)

La línea celular Vero es una línea continua, derivada inicialmente de células epiteliales de riñón de *Cercopithecus aethiops* (Nippon Rinsho 1963; 21:1201-1215) (Ammerman y col., 2008). En este trabajo, se utilizó para ensayos de expresión de genes heterólogos, por parte de los sistemas de virus recombinantes y de vectores amplicón.

4.1.2 Vero-7b

La línea celular Vero 7B (Kriskey y col., 1998; Marconi y col., 1996), se utilizó para la replicación de virus defectivos no replicativos, complementa en *trans* los genes *ICP4* (RS1) e *ICP27* (UL54), deriva de células Vero transfectadas establemente con un plásmido que contiene los promotores y secuencias codificantes para *ICP4* e *ICP27*, y neomicina fosfotransferasa.

4.1.3 Vero 2-2

La línea celular Vero 2-2 (Sekulovich y col., 1988; Smith y col., 1992), proviene de la línea celular Vero, modificadas establemente para proveer el gen que codifica el gen *ICP27* de Herpes simplex tipo 1 y resistencia a neomicina, en este trabajo se utilizó para la obtención y titulación de vectores herpéticos libres de virus colaborador. Esta línea celular fue cedida por Dr. Cornel Fraefel (Laboratorio de Virología, de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Zúrich, Suiza).

4.1.4 Gli36

Obtenidas originalmente a partir de glioblastoma humano (Kashima y col., 1995), en este trabajo se utilizó para la titulación de stocks de vectores amplicón en presencia de virus colaborador. Fueron cedidas al Proyecto HEVAR, por el Dr. D. Louis, Universidad de Harvard, Cambridge, MA.

4.1.5 MA104 (ATCC:CRL-2378)

Esta línea celular se obtuvo a partir de riñón de simio *Macaca mulata*, se utilizan ampliamente para la propagación de diferentes virus incluyendo varias cepas de rotavirus (Matsuno y col., 1977; Whitaker y Hayward, 1985). Esta línea celular establecida, se utilizó para propagación rotavirus Wa y EC.

4.1.6 MDBK (ATCC:CCL-22TM)

Esta línea celular establecida, deriva de riñón bovino (*Bos taururs*) (Madin y Darby, 1958), utilizada en el laboratorio rutinariamente para titulación de Herpesvirus bovino tipo 1, en el presente trabajo se empleó para realizar el análisis de expresión de genes heterólogos.

4.1.7 CV-1 (ATCC: CCL-70TM)

Esta línea celular pseudodiploide, obtenida a partir de riñón de *Cercopithecus aethiops* (Jensen y col., 1964), se utilizó para la replicación de Virus Vaccinia expresando T7-ARN polimerasa (Vtf7-3), para análisis de expresión de genes heterólogos.

4.2 Cultivo de células

Las células se cultivaron en diferentes recipientes específicos para cultivo celular, (Greiner BioOne Frickenhausen, Alemania), y se mantuvieron en estufa de cultivo de células, a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂ y saturada con H₂O.

El medio de cultivo empleado para mantenimiento de todas las líneas celulares fue Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, N° cat.: 11995065, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), con adición de 100 UI/ml de penicilina y 60 µg/ml de estreptomycin como antibióticos, suplementado con SFB al 10% para el crecimiento celular, y SFB al 2% para el caso de las infecciones en los diferentes experimentos.

Para los cultivos de las líneas celulares Vero-7b y Vero 2-2, el medio de cultivo se suplementó con G418 (N° cat.: 11811031, Gibco, Grand Island, NY, EUA), que es un análogo de neomicina activo en células eucariotas, en una concentración de 200 µg/ml como antibiótico adicional, para lograr el mantenimiento de la línea celular.

Como procedimiento general, las células se cultivaron hasta un 80 a 90% de confluencia y los pasajes se realizaron en recipientes nuevos. La frecuencia de pasaje de mantenimiento en general se realizó dos veces a la semana, durante el período de experimentos. Brevemente, la monocapa celular se lavó dos veces con PBS 1X (pH=7.4), se añadió tripsina 0,05% (preparada a partir de: Trypsin, N° cat.: 15090, Gibco, Grand Island, NY, EUA), y se incubaron nuevamente en la estufa a 37°C hasta que se pueden despegar fácilmente del recipiente de cultivo. Las células se resuspendieron inmediatamente en DMEM suplementado al 10% SFB, pasaron a un frasco nuevo, descartando el remanente. En general los pasajes se realizaron 1:5 en relación a su

confluencia, excepto para Gli36 que se aplicó una dilución de pasaje 1:10 de su confluencia.

Las líneas celulares utilizadas provienen de un banco de trabajo realizado, administrado y almacenado en termos de nitrógeno en el Instituto Dr. Cesar Milstein-CONICET, C.A.B.A.

4.3 Rotavirus

4.3.1 Propagación de RVs

La propagación de RV de las cepas RRV (*N° taxonómico: 444185*), EC (*N° taxonómico: 70865*) y Wa (*N° taxonómico: 10962*), se realizó de la siguiente manera: se lavó la monocapa de MA104 de cada frasco de 175 cm², 3 veces con PBS 1X, el inóculo viral se preparó incubando con tripsina en una concentración final de 5 µg/ml durante 30 min. a 37°C, y llevando la suspensión viral necesaria para una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1, a un volumen final de 5 ml en cada frasco. La monocapa y el correspondiente inóculo, se incubaron 1 h a 37°C, con una agitación suave cada 15 min., luego se retiró el inóculo para agregar 30 ml de medio MEM sin SFB, con tripsina en una concentración final de 0,5 µg/ml. Las células se incubaron en estufa de cultivo a 37°C, hasta la observación de efecto citopático completo. Los frascos se congelaron a -80°C y descongelaron 3 veces, centrifugando a 800 x g durante 5 min. El sobrenadante resultante, se dividió en alícuotas pequeñas y se almacenó a -80°C hasta su uso.

4.3.2 Obtención de ARN de RVs

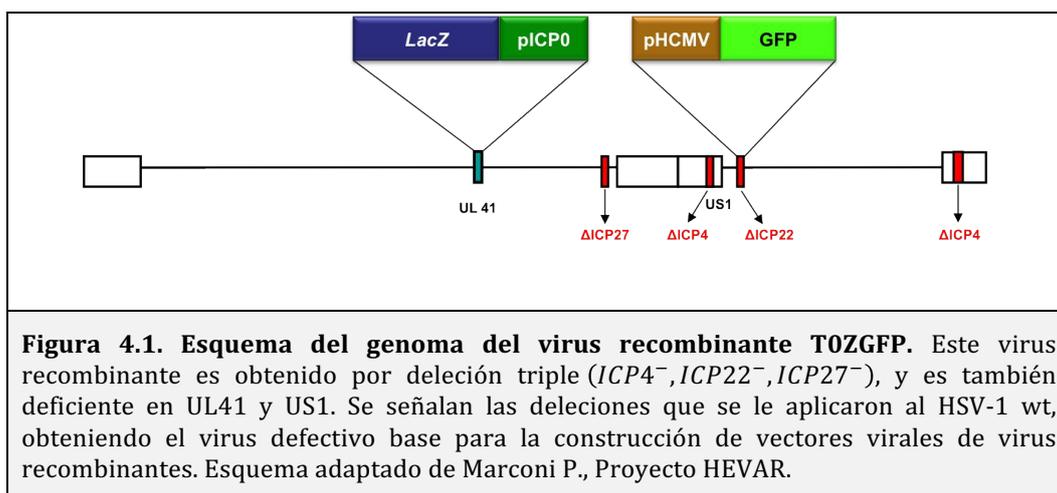
Para la amplificar los marcos abiertos de lectura codificantes de los genes de RV, se utilizó como molde ARN de la cepa Wa (G1P[8]) para amplificar VP2, VP4, VP6, VP7, y NSP4, ARN de la cepa EC (G3P[17]) y de RRV (G3P[5]) fue utilizado para amplificar VP6 en ambos casos. La cepa RRV fue provista por la Dra. Graciela Glikmann (Universidad de Quilmes), la cepa EDIM Cambridge (EC) cedida por Dr. Harry Greenberg (Universidad de Standford, CA) y la cepa Wa amplificada de un banco viral presente en el Instituto Dr. Cesar Milstein-CONICET. El ARN viral se extrajo utilizando reactivo Trizol LS (*N° cat.: 1029-010*, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las extracciones fueron realizadas por los grupos de investigación pertenecientes al consorcio del proyecto HEVAR, puntualmente en el Sección Virología de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, y en el Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental, de la Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

El ARN viral de un aislamiento de RV grupo C, se utilizó para amplificar la secuencia codificante de VP6C. Dicho material fue cedido a la Dra. Rosana Rota, durante el trabajo en colaboración realizado con el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina.

4.4 Vectores virales

4.4.1 Virus recombinante T0ZGFP

T0ZGFP, es un herpes virus defectivo al cual se le han deletado los genes *ICP4*, *ICP27* e interrumpido los genes *ICP22* y *UL41*, Figura 4.1. Este virus tiene como reporteros, el gen de *EGFP* inserto en el locus de *ICP22*, cuya expresión es controlada por el promotor inmediato-temprano de Citomegalovirus (pCMV), y en el locus *UL41* (gen de silenciamiento del huésped: “*virion host shutoff (vhs)*”) el gen de la β -galactosidasa, bajo el control del promotor inmediato temprano de *ICP0*. A partir de éste virus se construyeron los virus defectivos que portan los antígenos de diferentes cepas de rotavirus, descritos a continuación (D. M. Krisky y col., 1997; Krisky y col., 1998; Marconi y col., 1996). T0ZGFP y los virus que derivan del mismo, se replicaron y titularon en la línea celular Vero-7b, al igual que sus virus derivados. Este virus defectivo fue desarrollado y suministrado por el laboratorio dirigido por la Dra. Peggy Marconi de la Universidad de Ferrara, Italia.



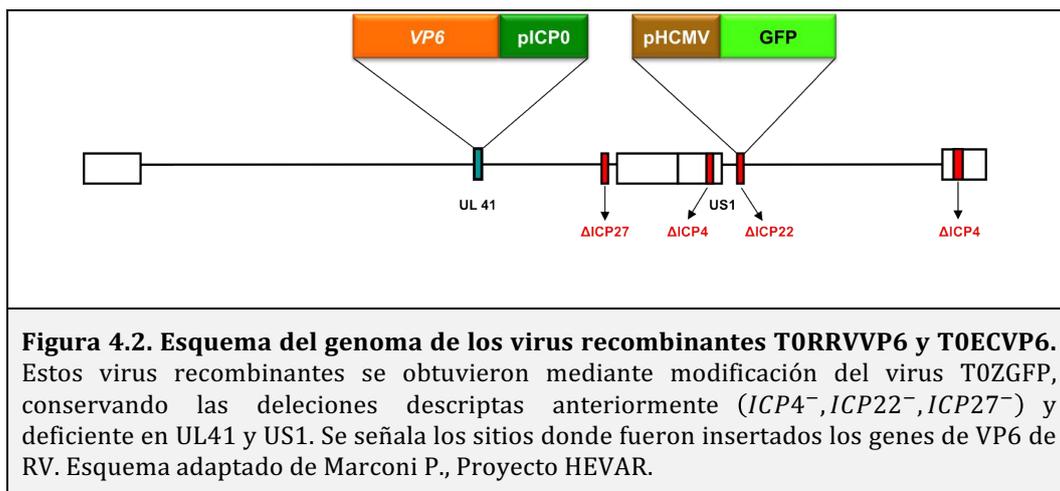
4.4.2 Virus recombinante TORRVVP6

TORRVVP6, es un herpes virus defectivo al cual se le han deletado los genes *ICP4*, *ICP22* e *ICP27* y también es deficiente en *UL41* y *US1*, Figura 4.2, de la misma manera que su virus parental T0ZGFP, Figura 10. Como se mencionó arriba, porta como reportero el gen de *EGFP* en el locus de *ICP22*; y en el locus *UL41*, se introdujo la

secuencia que codifica para VP6 de rotavirus RRV. Este virus se replicó y tituló utilizando a línea celular Vero-7b.

4.4.3 Virus recombinante TOECVP6

TOECVP6 es un herpes virus defectivo, Figura 4.2, con las mismas deleciones del virus parental TOZGFP, Figura 4.1, al cual se le ha introducido como reportero el gen de *EGFP* en el locus de *ICP22*; y la secuencia que codifica para VP6 de rotavirus EC, en el locus *UL41*.



4.4.4 HSV-1 LaLΔJ

HSV-1 LaLΔJ es un virus recombinante desarrollado en el laboratorio del Dr. Alberto Epstein, Universidad de Lyon, Francia, se utilizó como virus colaborador para empaquetamiento de vectores amplicón. Es un virus defectivo en los genes que codifican para *ICP4* e *ICP34.5* y las señales de empaquetamiento "*pac*". Sólo contiene una señal "*pac*" ingenierizada en el locus de la glicoproteína C (*gC*), la cual se encuentra flanqueada por dos sitios "*loxP*", que son secuencias de reconocimiento de la recombinasa Cre. Para la producción de este virus defectivo colaborador, se utilizó la línea celular Vero-7b que complementa la deleción de *ICP4* (Logvinoff y Epstein, 2001, 2000a, 2000b; Zaupa y col., 2003).

4.4.5 HSV-BAC1

HSV-BAC1, es un cromosoma bacteriano artificial que contiene el genoma modificado de HSV-1 de la cepa F (N° de Acceso: GU734771) fHSVΔ*pac*Δ27, el cual se le ha delecionado el gen esencial que codifica para *ICP27* y las señales de empaquetamiento (*pac*), adicionalmente se le insertaron 20 kpb de ADN que codifican para ICP0, aumentado el tamaño de la construcción (de 151 a 178 kpb), lo que favorece

la replicación y empaquetamiento del plásmido amplicón sin generación de virus colaborador competente (Fraefel y col., 1996; Saeki y col., 2001, 1998). Este sistema de empaquetamiento se utilizó para realizar preparaciones libres de colaborador de vectores amplicón.

4.4.6 HSV-BAC2

HSV-BAC2, es un cromosoma bacteriano artificial que contiene el genoma modificado de HSV-1 cepa 17 (N° de Acceso: NC_001806), también se utiliza la nomenclatura fHSV Δ pac Δ 27, el cual tiene delecionado el gen esencial que codifica para ICP27 y las señales de empaquetamiento “pac”, al cual también se le ha aumentado el tamaño genómico por inserción de ADN (desde 151 a 178 kpb), favoreciendo la replicación y empaquetamiento del plásmido amplicón, en ausencia de virus colaborador competente (Fraefel y col., 1996; Saeki y col., 2001, 1998). Esta construcción se utilizó como molde para la modificación del genoma de HSV-1, por inserción de gC, y empaquetar el plásmido amplicón [pHSV-EGFP], para realizar ensayos en cultivos celulares.

4.4.7 HSV-BAC [Δ pac Δ 27/RGD]

HSV-BAC [Δ pac Δ 27/RGD] es un cromosoma bacteriano artificial derivado de HSV-BAC2, al cual se le realizó la modificación adicional en la glicoproteína C (gC), por medio de inserción de un epítipo neutralizante (RGD), presente en la proteína estructural VP1 de VFA. La inserción se realizó en el dominio de unión a heparán sulfato de gC. Esta construcción se utilizó para generar partículas de virus defectivo basado en HSV-1, que presenten en su superficie el epítipo antigénico RGD de VFA, y que a su vez sirva como sistema de empaquetamiento, para esto último se utilizó el plásmido [pHSV-EGFP].

4.5 Plásmidos

4.5.1 pGEM[®]-T Easy

Este plásmido (Promega, WI, EUA) se utilizó para el clonado molecular y secuenciación de los diferentes productos de PCR, es un plásmido de alto número de copia, y posee el gen *AmpR* como marcador de selección en *E. coli*.

4.5.2 pEBHICP27

Este plásmido se utilizó en el sistema de vectores amplicón libres de colaborador, aporta ICP27 de HSV-1, lo cual favorece la transcripción génica de HSV-1, favoreciendo la producción de partículas. ICP27 se encuentra codificada con su propio promotor y señal de poliadenilación así como las secuencias del antígeno nuclear 1 del virus Epstein-Barr (EBNA1) y el *oriP* del mismo virus permitiendo replicación y estabilidad episomal de esta construcción en distintas líneas celulares, y además codifica para el gen de resistencia *AmpR* para propagarlo en *E. coli* (Saeki y col., 2001; Yates y Guan, 1991).

4.5.3 pAEUA2

La construcción pAEUA2, es un plásmido amplicón que tiene las siguientes secuencias: origen de replicación (*oris*) y señal de empaquetamiento (*pac*) de HSV-1, para poder ser replicado y empaquetado por el sistema colaborador. También posee un origen de replicación procariota de alto número de copia, EGFP como gen reportero, gen *AmpR*, para la propagación en *E. coli*, y un sitio de clonado múltiple que permite el clonado del gen de interés bajo el control de un promotor pCMV (Cuchet y col., 2005). Este plásmido se utilizó para realizar análisis de expresión de β -galactosidasa y evaluar la expresión de genes heterólogos en diferentes experimentos.

4.5.4 pHSV-EGFP

Este plásmido amplicón se utilizó para generar partículas de vector amplicón utilizadas como control en los distintos experimentos. Contiene las señales *pac* y *oris* de HSV-1, EGFP como gen reportero bajo el control del promotor 4/5 de HSV-1, también codifica *AmpR*, permitiendo su propagación en *E. coli*. Originalmente se utilizó con el sistema libre de virus colaborador (Aboody-Guterman y col., 1997; Laimbacher y Fraefel, 2014), en este trabajo se utilizó también con el sistema que requiere virus defectivo como colaborador.

4.5.5 pHSV-Doble-EGFP

Esta construcción es un plásmido amplicón tri-cistrónico, que posee dos sitios de unión a ribosoma (IRES, derivados del Virus de Encefalomiелitis Murina), con respectivos sitios de clonado, y la unidad de transcripción consiste en el promotor inmediato-temprano (IE 4/5) de HSV-1, y la señal de poliadenilación de SV40. Este plásmido se construyó en el presente trabajo, basado en una versión cuatri-cistrónica,

[pHSV-Triple-EGFP] (Laimbacher y col., 2012), y se utilizó para la coexpresión de los siguientes pares de genes de RVs, VP6/VP2 por un lado, y VP7/VP4 por otro.

4.5.6 pHSV-IRES-EGFP

Esta construcción es un plásmido amplicón bi-cistrónico, que posee un sitio de unión a ribosoma (IRES, derivados del Virus de Encefalomiелitis Murina), con un sitio de clonado, y la unidad de transcripción consiste en el promotor inmediato-temprano (IE 4/5) de HSV-1, y la señal de poliadenilación de SV40 (Laimbacher y col., 2012), y se utilizó para la coexpresión de genes heterólogos junto a EGFP.

4.5.7 pCI-neo

El plásmido pCI-neo (Promega, WI, EUA) se utilizó para la expresión en células eucariotas, del gen de VP6 de RV del grupo C, bajo el control del promotor pCMV. Este vector contiene el gen de la fosfotransferasa de neomicina como marcador de selección eucariota y el gen *AmpR*, para la selección de clones en *E. coli*.

4.5.8 pcDNA4 His/Max

Este plásmido (Invitrogen, CA, EUA) se utilizó para expresión controlada por el promotor pCMV, de la proteína VP6 de RV EC de manera recombinante en células de mamífero, fusionando un motivo polihistidina para permitir la purificación de la proteína recombinante. Además contiene el marcador de selección, en células eucariotas, Sh:ble que confiere resistencia a Zeocina, y el gen *AmpR*, para la selección de clones en *E. coli*.

4.5.9 pRSETA

Este plásmido (Invitrogen, CA, EUA) se utilizó para la expresión en *E. coli*, de la proteína MSP5 de *A. marginale* recombinante. Posee el promotor T7, fusiona en el extremo N-terminal un motivo que codifica para seis histidinas (6xHis) utilizadas para purificación por cromatografía en columnas de níquel. Posee el gen *AmpR*, para la selección de clones en *E. coli*.

4.5.10 pMAL-c2X

En este plásmido (New England Biolabs, Reino Unido) se clonó MSP5 de *A. marginale*, traduciéndose fusionada al extremo C-terminal de malE de *E. coli* (proteína de unión a maltosa = MBP), bajo el control del promotor *tac*, y el gen *AmpR* para selección de colonias recombinantes. Este sistema posibilitó la purificación de la proteína recombinante a través de resina con amilosa.

4.5.11 pgalk

Plásmido utilizado como molde para amplificar la galactocinasa (*galk*) tipo salvaje, se utiliza para la modificación genética de HSV-1 mediante inserción y delección de *galk* en dicho genoma viral (Warming y col., 2005).

4.6 Técnicas generales de biología molecular

Las técnicas de biología molecular se realizaron siguiendo las indicaciones de los fabricantes de los reactivos, y metodología estándar descripta en manuales específicos (Ausubel y col., 2007; Sambrook y col., 2001).

Los reactivos empleados fueron de grado analítico o de biología molecular, de Sigma-Aldrich (EUA), Merck Millipore (Alemania), GE Healthcare (EUA), y los productos utilizados en los protocolos de ADN recombinante, de New England BioLabs (Reino Unido), Promega (EUA) Invitrogen (EUA) y PB-L Products (Argentina).

4.7 Cepas de *Escherichia coli* utilizadas.

Para las estrategias de clonado y amplificación de ADN, se utilizaron las siguientes cepas de *E. coli*: **DH5 α** (*Genotipo*: F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1.*) y **DH10B** (*Genotipo*: F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 endA1 araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL nupG* λ - *rpsL nupG* /pMON14272 /pMON7124). Ambas cepas (Invitrogen, CA, EUA) están ingenierizadas para permitir la selección de colonias por medio de α -complementación del gen de la β -galactosidasa.

Para la preparación de proteínas recombinantes se utilizaron las cepas **BL21(DE3)pLysS** (*Genotipo*: F- *ompT hsdS_B*(r_B⁻, m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam^R)), y **Top 10** (*Genotipo*: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*, (Invitrogen, CA, EUA).

Para la metodología de modificación de genoma de HSV-1 por recombinación homóloga, se utilizó la cepa **SW102** (*Genotipo*: *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Δ *lacX74 deoR endA1 araD139* Δ (*ara, leu*) 7697 *rpsL recA1 nupG* Φ 80*dlacZ* Δ M15 *galU galK* [λ c1857 (*cro-bioA*) \leftrightarrow Tet] Δ *galk*) (Laboratorio Dr. Cornel Fraefel, Zúrich, Suiza).

4.8 Cultivo de *Escherichia coli*

En todos los cultivos bacterianos se utilizó el medio de cultivo “Lysogeny Broth (LB)” (Bertani, 2004, 1951), suplementado con antibióticos específicos dependiendo de la cepa y plásmidos utilizados, las concentraciones de trabajo fueron: Amp 50 µg/ml y cloranfenicol (Cam) 12,5 µg/ml (Ausubel y col., 2007; Sambrook y col., 2001). Para la selección de clones recombinantes, se realizaron los cultivos en placas de Petri conteniendo medio LB-Agar (1,5%), suplementado con los antibióticos correspondientes. La crío-preservación de los clones positivos (seleccionados por mapeos de restricción y secuenciación) se realizó a -80°C, a partir de cultivos agitados a 250 RPM, durante 16h a 37°C, adicionados por último con glicerol al 15% final (Sambrook y col., 2001).

4.9 Preparación de *Escherichia coli* competentes

El método químico que se utilizó para la transformación, está adaptado de la metodología desarrollada por Mandel y Higa (Mandel y Higa, 1970), alcanzando actualmente frecuencias de transformación entre 10^6 y 10^9 transformantes/µg de ADN súper-enrollado (Hanahan, 1983).

4.9.1 Preparación de bacterias químicamente-competentes

A partir de una colonia de la cepa de *E. coli* correspondiente, se realizó un cultivo en medio LB, se incubó a 37°C, agitando orbitalmente a 250 RPM, durante 16h. Luego se realizó una dilución de 4 ml de inóculo en 400 ml finales de medio LB, incubando nuevamente a 37°C y 250 RPM, hasta que se alcanzó una DO_{600} de 0,4, incubando luego el cultivo 10 minutos en hielo. Luego de centrifugó durante 10 minutos a $2700 \times g$, y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió suavemente en 120 ml de solución de $CaCl_2$, todo el proceso se llevó a cabo en recipiente con hielo, y luego las células se recuperaron nuevamente por centrifugación a $2700 \times g$ durante 10 min a 4°C. El ciclo de lavado se repitió una vez más, resuspendiendo el pellet obtenido, en 4 ml de solución de $CaCl_2$. Finalmente, en un recipiente con hielo, se distribuyó un volumen de 50 a 100 µl de suspensión en tubos de 1,5 ml. El congelado de las alícuotas de *E. coli* competentes se realizó inmediatamente por inmersión de los tubos con la suspensión bacteriana, en etanol enfriado previamente a -80°C, se retiraron del recipiente con etanol, y almacenaron a dicha temperatura en un ultrafreezer.

Solución de CaCl₂: 60 mM de CaCl₂, 15% Glicerol, 10 mM PIPES, pH = 7.0, esterilizar por filtración, almacenar a TA (Ausubel y col., 2007; Sambrook y col., 2001).

4.9.2 Preparación de electro-competentes

A partir de una colonia de *E. coli*, se realizó un cultivo de 3 ml de medio LB e incubó durante 16h a 37°C, en un agitador orbital a 250 RPM. Luego, se inoculó medio LB alcanzando una dilución 1:50, e incubó a 37°C y 250 RPM. Se midió la DO₆₀₀ cada 20 minutos, hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 0,55-0,60, en ese momento se colocó el recipiente en hielo durante 15-30 minutos, homogeneizando para asegurar el enfriamiento total. Para cada transformación, se centrifugaron de 10 ml de cultivo, en tubos previamente enfriados en hielo, a 2000 x *g* durante 15 min. a 4°C. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 1 ml de H₂O, luego agregar 9 ml de H₂O estéril para lavados. Se recuperaron nuevamente las células por centrifugación a 2000 x *g*, 20 min. a 4°C. Se repitió el proceso de lavado dos veces más, y se resuspendió el pellet en 0,1 ml H₂O estéril. Todo el proceso se realizó en baño de H₂O con hielo, y el agua utilizada durante el protocolo se mantuvo refrigerada con hielo (Ausubel y col., 2007; Sambrook y col., 2001).

4.10 Transformación de *Escherichia coli*

4.10.1 Choque térmico

Para cada transformación, se utilizó un vial de *E. coli* competentes. Luego de descongelar la suspensión en recipiente con hielo, se adicionó ADN plasmídico e incubó nuevamente en hielo, durante 30 min. Posteriormente se realizó el choque térmico a 42°C durante 90 seg., en un baño termostatizado. Se incubó en hielo durante 2 min, y seguido a esto se agregaron 800 µl de medio LB a cada microtubo, se incubó a 37°C, durante 1 hora. Luego la suspensión de bacterias transformadas, se distribuyeron en una placa pre-incubada a 37°C, con los antibióticos adecuados para la selección, se dejó secar la superficie del medio semisólido e incubó a 37°C durante 12-16 h (Ausubel y col., 2007; Sambrook y col., 2001).

4.10.2 Electroporación

Cada alícuota de 50 µl de bacterias electrocompetentes, se incubó con un número igual de cubetas de 0.2 cm, necesarias para las transformaciones. Una vez descongelada la suspensión bacteriana se adicionó el ADN a electroporar (un máximo de 50 ng), en un volumen de 1-2 µl para cada transformación, y se colocó cada tubo inmediatamente en

hielo. El equipo electroporador se preparó en 25 μ F de capacitancia, 2,5 kV de voltaje, y resistencia de 200 ohm. Cada suspensión de bacterias/ADN se colocó en la parte inferior de su cubeta respectiva, la cual se retira del hielo y se seca antes de colocarla en el equipo, donde se aplica un pulso de electricidad constante de 4-5 milisegundos en un campo de 12,5 kV/cm. Rápidamente se adiciona 1 ml de medio LB, lo que se transfirió a un tubo de 2,0 ml y se incubó en agitación durante 1 h a 37°C, para su recuperación. La suspensión de transformación obtenida se distribuyó en tres placas de Petri diferentes, 10, 50 y 200 μ l de la misma transformación, utilizando LB-Agar al 1,5% como medio de cultivo, adicionado con los antibióticos necesarios para la selección de colonias recombinantes, luego se incubó el cultivo a 37°C durante 12-16 h (Ausubel y col., 2007; Sambrook y col., 2001).

4.11 Preparación de ADN plasmídico

El aislamiento de ADN plasmídico, se realizó mediante lisis alcalina en combinación con el detergente SDS (Bimboim y Doly, 1979; Ish-Horowicz y Burke, 1981). Luego de que el material desnaturalizado ha sido removido por centrifugación, el ADN plasmídico nativo puede ser recuperado del sobrenadante del lisado, y purificado en formas y grados diferentes, de acuerdo a las necesidades (Sambrook y col., 2001). En este trabajo, se realizaron minipreparaciones para los clonados moleculares y maxipreparaciones para el material destinado a las transfecciones de células de mamíferos, las cuantificaciones de las preparaciones se realizaron por espectrofotometría UV.

4.11.1 Minipreparación

Para cada minipreparación de ADN plasmídico, el protocolo general fue el siguiente. Se realizó un pre-inóculo en 3 ml de LB, adicionado con Amp 50 μ g/ml, y se incubó 12-16 h, en agitación a 200 RPM y 37°C de temperatura, luego se centrifugó en un microtubo el volumen total durante 1 min. a 17.900 x *g*. El pellet obtenido se resuspendió en 200 μ l de la solución I, se adicionaron 200 μ l de solución II, homogeneizando suavemente, y se incubó a TA durante 5 min. Para la neutralización de la lisis se adicionan con 200 μ l de solución III, y luego de homogeneizar, se centrifugó 10 min. a 17.900 x *g*, 4°C. El sobrenadante se colectó en un tubo limpio, y se agregó igual volumen de isopropanol y, previa homogeneización por inversión, se incubó a TA durante 10 min. Posteriormente centrifugó 10 min. a 13.000 x *g* a 4°C, luego de

descartar el sobrenadante, se lavó el pellet con 500 μ l de etanol 70%, y se centrifugó durante 5 min. a 17.900 x *g*. El último lavado se realizó con etanol 100%, con un ciclo de centrifugado de 3 min. a 17.900 x *g*, y luego se descartó el sobrenadante y se incubó el tubo abierto en la mesada durante 15 min. a TA. Una vez que se evapora el etanol, se adicionan 20 μ l de H₂O ultrapura estéril. Esta suspensión se incubó 10 min. a 42°C, para favorecer resuspensión del ADN.

Soluciones utilizadas en el protocolo: I: 50 mM glucosa 25 mM Tris-Cl (pH = 8.0) 10 mM EDTA. La solución se esteriliza por medio de filtro 0.2 μ m, luego se adiciona ARNasa A [10 mg/ml], y se almacena a 4°C. **II:** 0,2 N NaOH (Diluido a partir de un stock 10 N) 1% (P/V) SDS (Diluido a partir de un stock 10% o 20%) Se prepara la solución en el momento y utiliza a TA. **III:** Se prepara de la siguiente manera, 60 ml de acetato de potasio 5M, 11,5 ml de ácido acético glacial, y 28,5 ml de H₂O. La solución resultante es 3M con respecto al ion acetato. Se almacena la solución a 4°C y se coloca en recipiente con hielo antes de usar (Sambrook y col., 2001).

4.11.2 Maxipreparación

Las maxipreparaciones de ADN se realizaron con los reactivos del kit Qiagen Plasmid Maxi Kit N° cat. 12162 (Qiagen, EUA). Brevemente, se realizó un preinóculo de 5 ml de LB suplementado con Amp a una concentración de 50 μ g/ml. Se cultivó el preinóculo durante 8 a 12 h, con una agitación de 200 RPM, a 37°C. Se transfirió 1 ml a un Erlenmeyer de 1 L conteniendo 200 ml de LB con Amp 50 μ g/ml, e incubó durante 16 h a 37°C en agitación. El cultivo se transfirió a tubos de centrifuga de 250 ml y se cosechó el *pellet* por centrifugación a 4.000 x *g* durante 10 min. a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante e invirtió el tubo en un papel absorbente por 2 min para drenar todo el líquido remanente. El pellet se resuspendió completamente en 10 ml de Solución I, luego se adicionó un volumen de 10 ml de la Solución II, se homogeneizó por inversión 4 a 6 veces e incubó 5 min. a TA. Luego se realizó el agregado de 10 ml de la Solución III, se homogenizó por inversión del tubo e incubó por 20 min en hielo. Luego el tubo se centrifugó 30 min a 16.000 x *g*, 4°C. Se filtraron los sobrenadantes con papel de filtro plegado, dentro de tubos de centrifuga de 30 ml, mientras tanto se equilibró la columna de Qiagen tip-500 con 10 ml de buffer QBT, dejando fluir por fuerza de gravedad. Transferir la solución filtrada a la columna Qiagen 500, dejando pasar por fuerza de gravedad a través de la resina. Se lavó dos veces con 30 ml de buffer QC, y eluyó el ADN,

con 15 ml de buffer QF a una temperatura de 65°C, colectando el eluato en tubos de centrífuga de 30 ml. Posteriormente el ADN, se precipitó con 10,5 ml de isopropanol, y centrifugó inmediatamente durante 30 min a 20.000 x *g*, 4°C. El sobrenadante se descartó cuidadosamente, y el pellet se lava finalmente con 5 ml de etanol 70%, centrifugando 5 min a 17.000 x *g*. Luego, se retira el sobrenadante, dejó secar el tubo a TA y cada pellet se resuspendió en 200 µL de buffer TE (pH 7,4).

4.12 Anticuerpos utilizados

Tabla 2. Detalle de los anticuerpos utilizados en esta tesis.

Anticuerpo	Procedencia	Características
Anti-RRV	Cedido por Dra. Graciela Glikmann, Laboratorio de Inmunología y Virología, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires.	Anticuerpo policlonal obtenido inmunizando conejos con rotavirus RRV inactivado. Utilizado en una dilución 1:1000.
Anti-VP6 UK	Producido en CEVAN, Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein – CONICET.	Anticuerpo monoclonal obtenido a partir de inmunizaciones de ratones con rotavirus UK. Utilizado en dilución 1:2000.
Anti-NSP4	Dra. Susana López, Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de México, México.	Anticuerpo policlonal, obtenido en conejo, utilizando como inmunógeno NSP4 recombinante, del virus RRV. Utilizado en una dilución de 1:800.
Anti-VP5 RRV	Dra. Susana López, Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de México, México.	Anticuerpo policlonal obtenido por inmunización de conejo con el fragmento recombinante VP5* , perteneciente a la proteína VP4 de RRV. Utilizado en dilución 1:400.
Anti-VP2	Cedido por Dra Catherine Eichwald, Institute of Virology, University of Zurich. (Arnoldi y col., 2007).	Anticuerpo policlonal, producido en cobayo por inmunización con VP2 SA11 recombinante. Utilizado en dilución 1:2000.
Anti-GFP	Producido en CEVAN, Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein – CONICET.	Anticuerpo policlonal producido en conejo, inmunizando con la proteína recombinante GFP-GST. Utilizado en dilución 1:1000.
Anti-α-Tubulina-Alexa 488®	Life Technologies, N° cat.: 32-2588.	Anticuerpo monoclonal conjugado al fluoróforo Alexa 488®, que reacciona con alfa tubulina humana, de ratón y rata. Utilizado en dilución 1:10000.
Anti-actina	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA, N° cat.: A 2066.	Anticuerpo policlonal (de conejo), reconoce específicamente actina en muchas especies.

Anti-HA Clone HA-7	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA, N° cat: H 9658.	Anticuerpo monoclonal anti-HA, reconoce proteínas de fusión al N- y C-terminal. Expresadas en <i>E. coli</i> o células eucariotas. Utilizado en dilución 1:4000.
Anti-poliHistidina Clone HIS-1	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA, N° cat.: H1029.	Anticuerpo monoclonal anti-poliHistidina, reconoce formas nativas como desnaturalizadas de poliHistidinas fusionadas preferencialmente al N-terminal. Utilizado en dilución 1:4000.
Anti-ratón, Alexa 594	Molecular Probes, Life Technologies, CA, EUA, N° cat.: A-11062.	Anticuerpo policlonal (de conejo) conjugado al compuesto fluorescente Alexa Fluor 594® (el cual es espectralmente similar al Rojo Texas). Utilizado en dilución 1:2000.
Anti-conejo-Alexa 594	Molecular Probes, Life Technologies, CA, EUA, N° cat.: A-11037.	Anticuerpo policlonal (de cabra) conjugado al compuesto fluorescente Alexa Fluor 594®. Utilizado en dilución 1:2000.
Anti-GST	General Electric Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden, N° cat.: 27-4577-01.	Anticuerpo policlonal anti-GST, purificado a partir del suero de cabra inmunizada con la proteína GST de <i>Schistosoma mansoni</i> . Utilizado en dilución 1:1000.
Anti-β-gal	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA. N° cat.: B 0271	Anticuerpo monoclonal anti-β-galactosidasa de <i>E. coli</i> , conjugado a biotina. Utilizado en una dilución 1:2000.
Anti-Goat-HRP	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA. N° cat.: A5420.	Antisuero producido en conejo, utilizando IgG de cabra purificada como inmunógeno, conjugado a peroxidasa. Utilizado en dilución 1:4000.
Anti-Cobayo-HRP	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, EUA. N° cat.: A5545.	Antisuero producido en conejo, utilizando IgG de cobayo purificada, como inmunógeno, conjugado a peroxidasa. Utilizado en dilución 1:5000.
Anti-Conejo-HRP	Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza, N° cat.: A0545.	Anticuerpo policlonal producido en cabra, anti-IgG de conejo y conjugado a peroxidasa. Utilizado en dilución 1:5000.
Anti-Ratón-HRP	Dako, Dinamarca. N° cat.: P 0260	Anticuerpo policlonal producido en conejo, anti-Ig de ratón y conjugado a peroxidasa. Utilizado en dilución 1:1000.
Anti-Conejo-HRP	Dako, Dinamarca. N° cat.: P 0448	Anticuerpo policlonal producido en cabra, anti-IgG de conejo y conjugado a peroxidasa. Utilizado en dilución 1:5000.

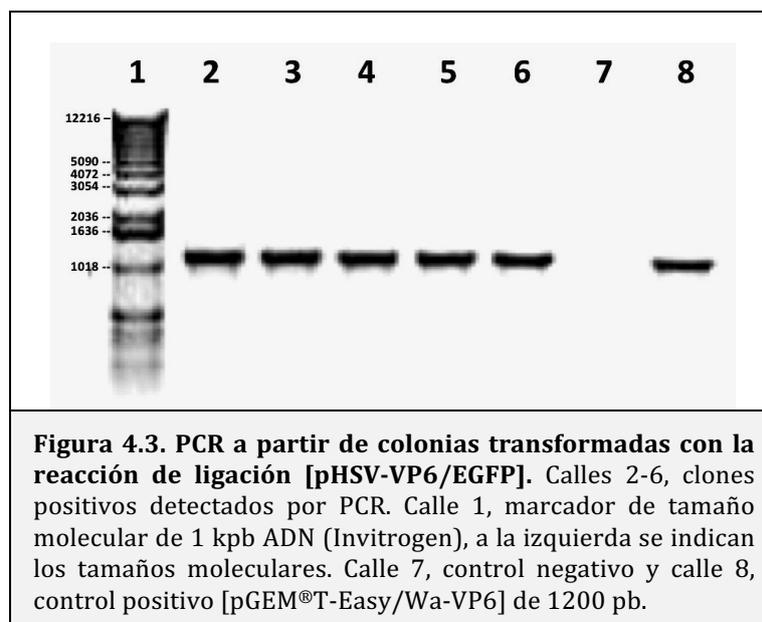
4.13 Obtención de los plásmidos amplicón que expresan genes de RVs de humanos

Esta sección incluye los plásmidos que codifican para una sola proteína (plásmidos simples), o para dos proteínas heterólogas (plásmidos dobles). Todas las construcciones expresan además el gen reportero EGFP.

El clonado de los genes se realizó en los plásmidos amplicón [pHSV-IRES-EGFP] y [pHSV-Doble-EGFP], para las construcciones bi-cistrónicas y tri-cistrónicas respectivamente. La obtención del plásmido [pHSV-Doble-EGFP] se describe en el Anexo I, apartado 2.

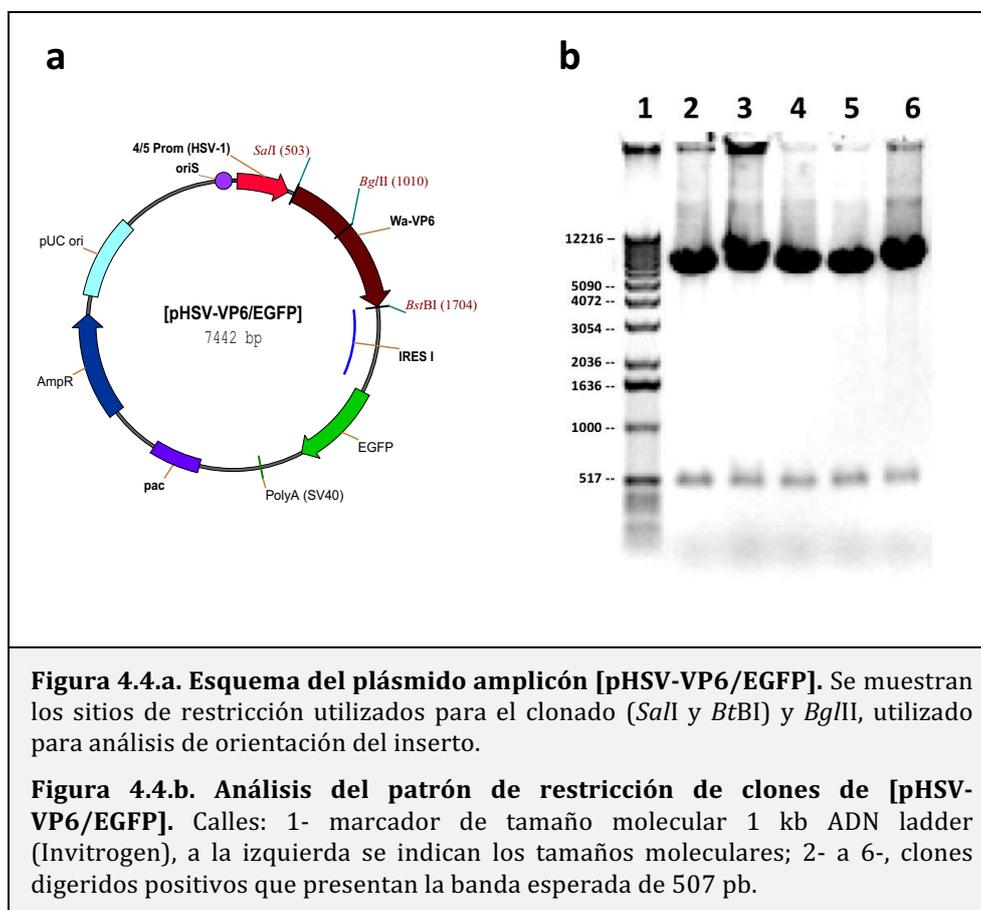
4.13.1 Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-VP6/EGFP]

Para esta construcción, se realizó el clonado molecular de Wa-VP6, utilizando como material de partida el plásmido [pGEM/Wa-VP6] (Anexo I, apartado 3.3.1) y el plásmido [pHSV-IRES-EGFP] (descrito en la sección 4.5.6), con la mezcla de la reacción de ligación se transformaron bacterias competentes DH10B. Para la detección de colonias positivas para [pHSV-VP6/EGFP], se realizaron reacciones de PCR a partir de colonias, amplificando el marco abierto de lectura completo (1194 bp), Figura 4.3. En la Figura 4.4.a, se muestran los sitios de restricción *Sall* y *BstBI* del plásmido amplicón [pHSV-IRES-EGFP] utilizados para el clonado.



El análisis de restricción de los clones recombinantes se llevó a cabo utilizando las enzimas *Sall* y *BglII*, como también se indican en la Figura 4.4.a, lo que resultó en la

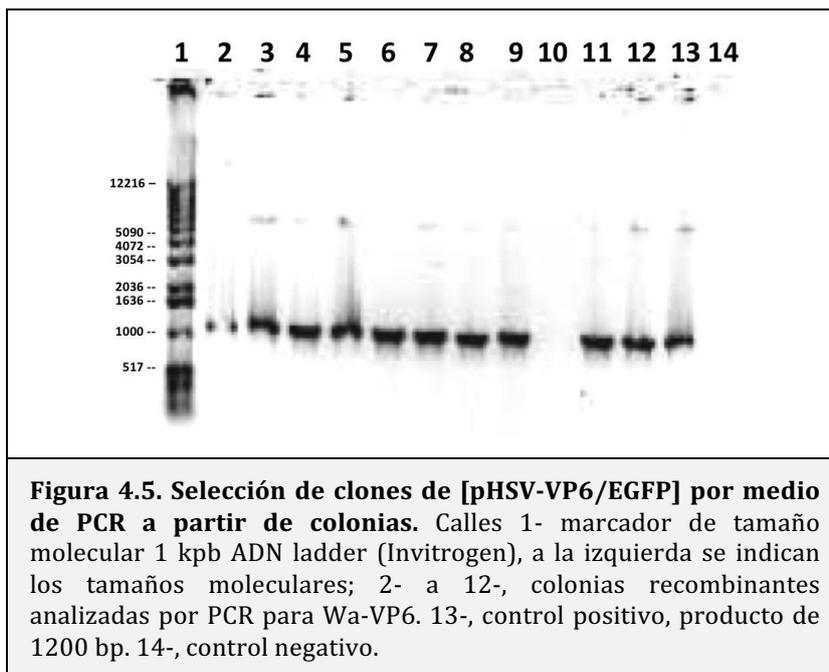
detección de un grupo de 5 clones positivos y con la orientación correcta del inserto, los cuales liberaron un fragmento de 507 pb, Figura 4.4.b.



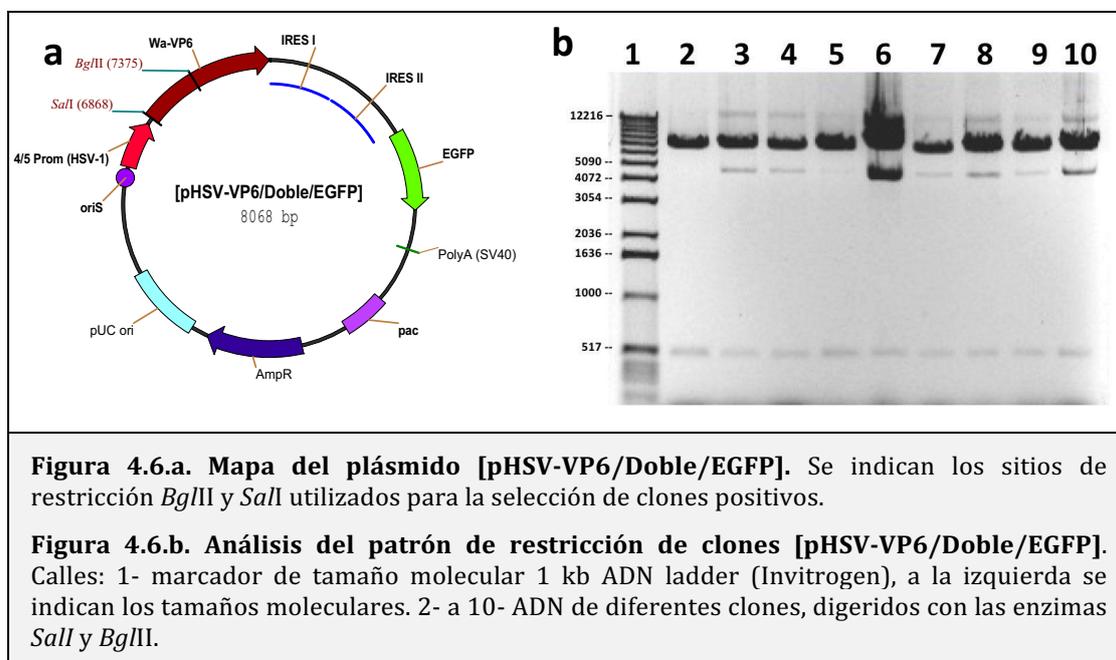
4.13.2 Construcción del plásmido amplicón doble [pHSV-VP6/VP2/EGFP]

4.13.2.1 Primera etapa: subclonado de Wa-VP6 en plásmido [pHSV-Doble-EGFP]

Para obtener esta construcción doble se realizó, en primera instancia, el clonado molecular de VP6 utilizando los sitios *SalI* y *BglIII*, utilizando como material de partida el plásmido de [pCR2.1TOPO/Wa-VP2] descrito en el Anexo I (apartado 3.3.2) y el plásmido [pHSV-Doble-EGFP] (Anexo I, apartado 2.1), luego se seleccionaron clones recombinantes mediante PCR a partir de colonias de bacterias transformadas con la construcción intermedia [pHSV-VP6/Doble/EGFP], Figura 4.5.



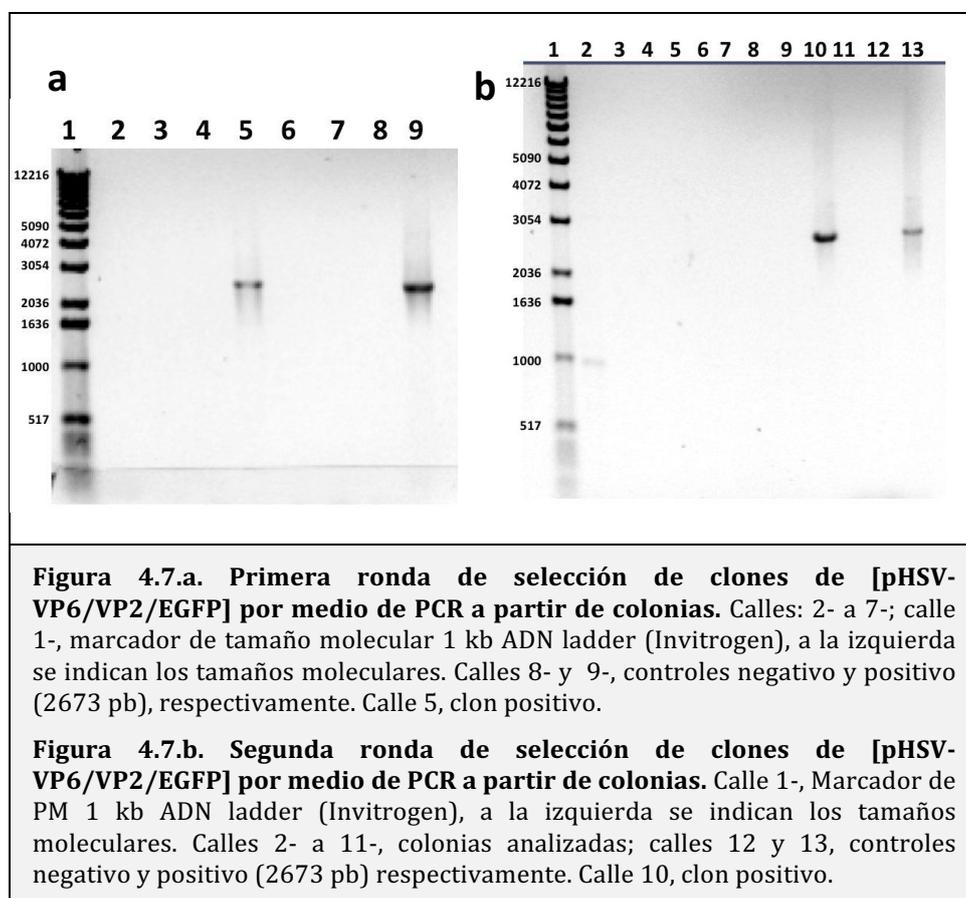
Luego se analizó el ADN plasmídico de un grupo de éstas colonias positivas, por medio de una digestión con las enzimas de restricción *Sall* y *BglII*, liberando un fragmento de 507 pb. Pudiendo determinar de esta manera, la presencia y correcta orientación de inserto VP6 (Figuras 4.6.a y 4.6.b), obteniendo de esta manera clones positivos para la construcción intermedia [pHSV-VP6/Doble/EGFP].



4.13.2.2 Segunda etapa: subclonado de WaVP2 en plásmido [pHSV-VP6/Doble/GFP]

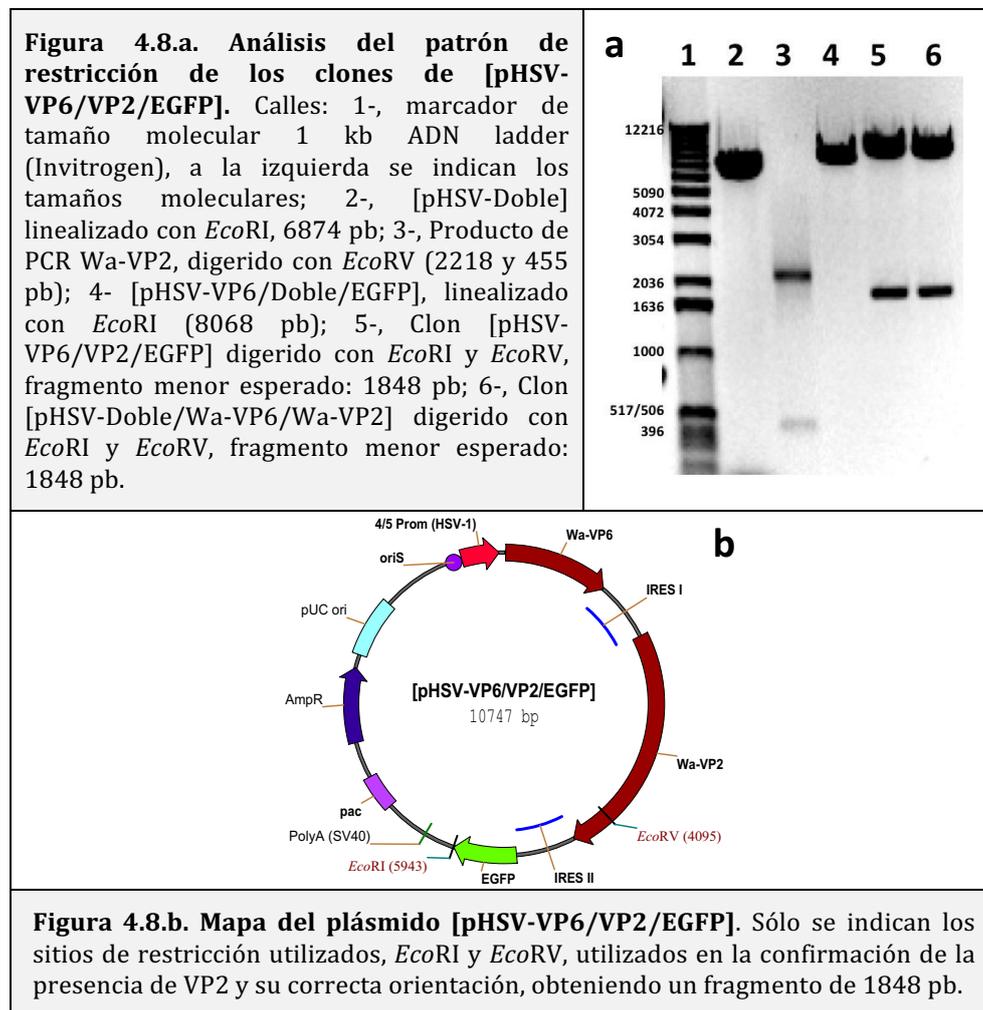
En segunda instancia, uno de los clones del plásmido [pHSV-VP6/Doble/EGFP], luego de ser confirmado por secuenciación, se digirió con la ER *ClaI*, al igual que el marco abierto de lectura Wa-VP2, obtenido del plásmido [pCR2.1TOPO/Wa-VP2] descrito en el Anexo I (apartado 3.3.2). Ambos fragmentos se ligaron, y con esa la mezcla de ligación se transformó una suspensión de *E. coli* competentes.

La selección por PCR a partir de colonias se realizó con 16 colonias, resultando dos positivas para Wa-VP2, amplificándose productos de 2673 pb (Figuras 4.7.a y 4.7.b).



Para analizar los dos clones positivos de [pHSV-VP6/VP2/EGFP] obtenidos (Figura 4.7.a y 4.7.b), se digirieron con las ER *EcoRI* y *EcoRV*. Como controles de digestión, se utilizó el plásmidos [pHSV-Doble-EGFP] (Anexo I, apartado 2.1), el producto purificado de una PCR de Wa-VP2, y la construcción intermedia [pHSV-VP6/Doble/EGFP]. En la Figura 4.8.a, se pueden observar los resultados de este control.

En las calles 5 y 6, se obtuvo un fragmento de 1848 pb, confirmando la correcta orientación e identidad de Wa-VP2 en la construcción final, Figura 4.8.b.



4.13.3 Construcción del plásmido amplicón doble [pHSV-VP7/VP4/EGFP]

4.13.3.1 Primera etapa: subclonado de Wa-VP7 en el plásmido [pHSV-Doble-EGFP]:

En un primer paso, se realizó el clonado molecular de Wa-VP7, para eso se digirió por un lado, el inserto a partir del plásmido de subclonado [pCR2.1 TOPO/Wa-VP7] (Anexo I, apartado 3.3.3) con la ER *NruI*, y por separado el plásmido [pHSV-Doble-EGFP] con la ER *SalI* seguida del tratamiento con la polimerasa Klenow (Promega, WI, EUA). Ambos plásmidos se describen en el Anexo I (apartados 2.1 y 3.3.3, respectivamente). Con la reacción de ligación se transformó una suspensión bacterias DH10B competentes, y se realizó la selección de colonias positivas para Wa-VP7 por medio de PCR. Figuras 4.9.a y 4.9.b.

Una vez que se detectaron colonias VP7-positivas, el ADN plasmídico provenientes de las mismas, se analizó por medio de digestión con la enzima de restricción *SalI*. El tamaño de los fragmentos que debe liberar un clon positivo para VP7, debe ser de 397 pb para el caso de orientación correcta, y en caso negativo de 608 pb (Figuras 4.10.a y 4.10.b).

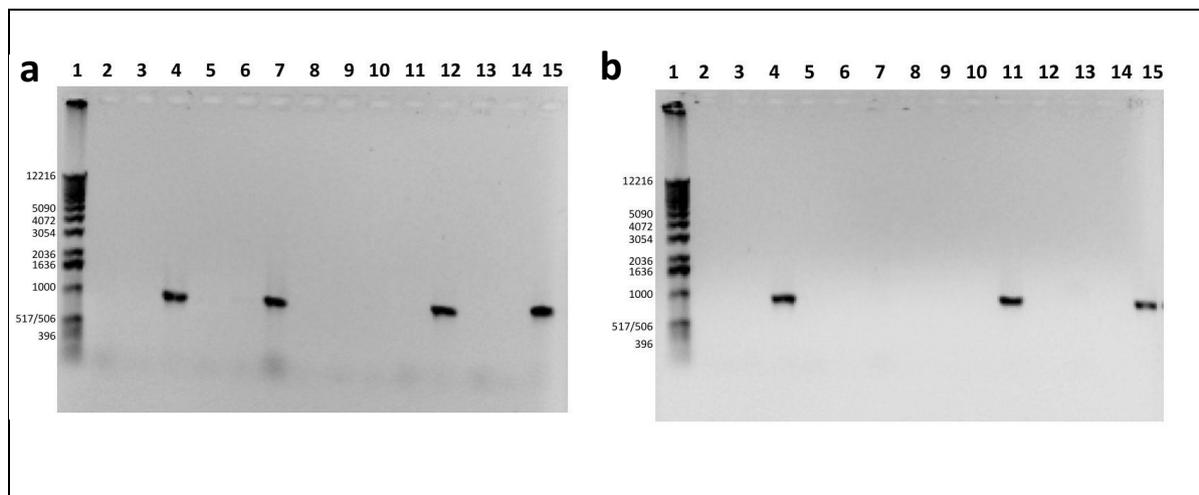


Figura 4.9.a. Selección de clones de [pHSV-Doble/VP7] por medio de PCR a partir de colonias primera ronda. Calles: 1-, marcador de tamaño molecular 1 kb (Invitrogen), a la izquierda se indican los tamaños moleculares; 2- a 13-, PCR de colonias para Wa-VP7; 14- y 15-, controles negativo y positivo, respectivamente. Las colonias positivas para VP7 se detectan en las calles 4, 7 y 12.

Figura 4.9.b. Selección de clones de [pHSV-Doble/VP7] por medio de PCR a partir de colonias segunda ronda. Calles: 1-, marcador de tamaño molecular 1 kb (Invitrogen), a la izquierda se indican los tamaños moleculares; 2- a 13-, PCR de colonias para Wa-VP7; 14- y 15-, controles negativo y positivo, respectivamente. Las colonias positivas para VP7 se detectan en las calles 4 y 11.

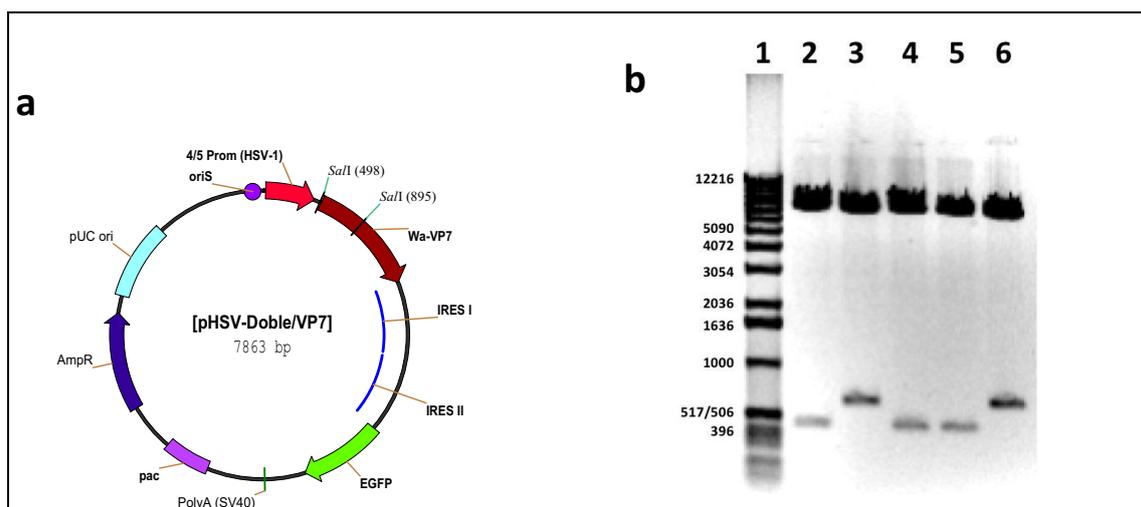


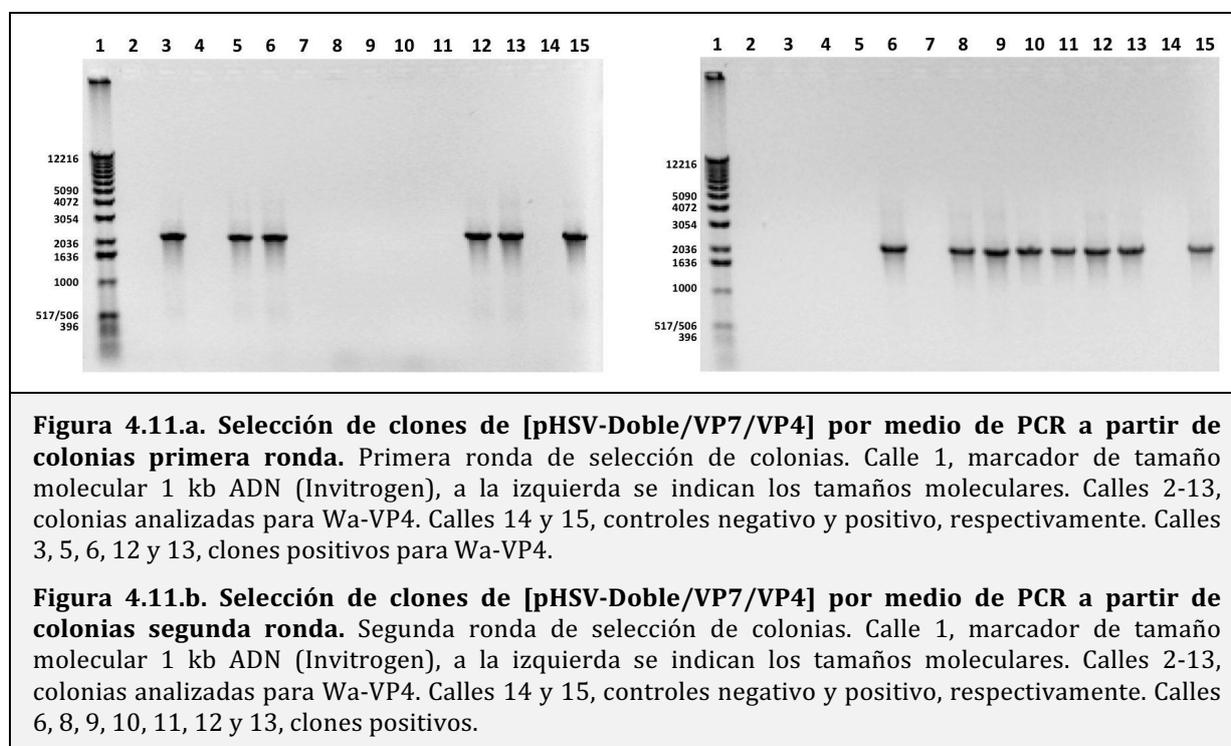
Figura 4.10.a. Mapa del plásmido amplicón [pHSV-Doble/VP7]. Se indican los sitios de restricción *SalI* utilizados para el análisis.

Figura 4.10.b. Análisis del patrón de restricción de clones de [pHSV-Doble/VP7]. Se utiliza la ER *SalI*. Calles: 1-, Marcador de tamaño molecular 1 kb ADN (Invitrogen) a la izquierda se indican los tamaños moleculares; 2-, 4- y 5-; clones positivos, liberan un fragmento de 397 pb.

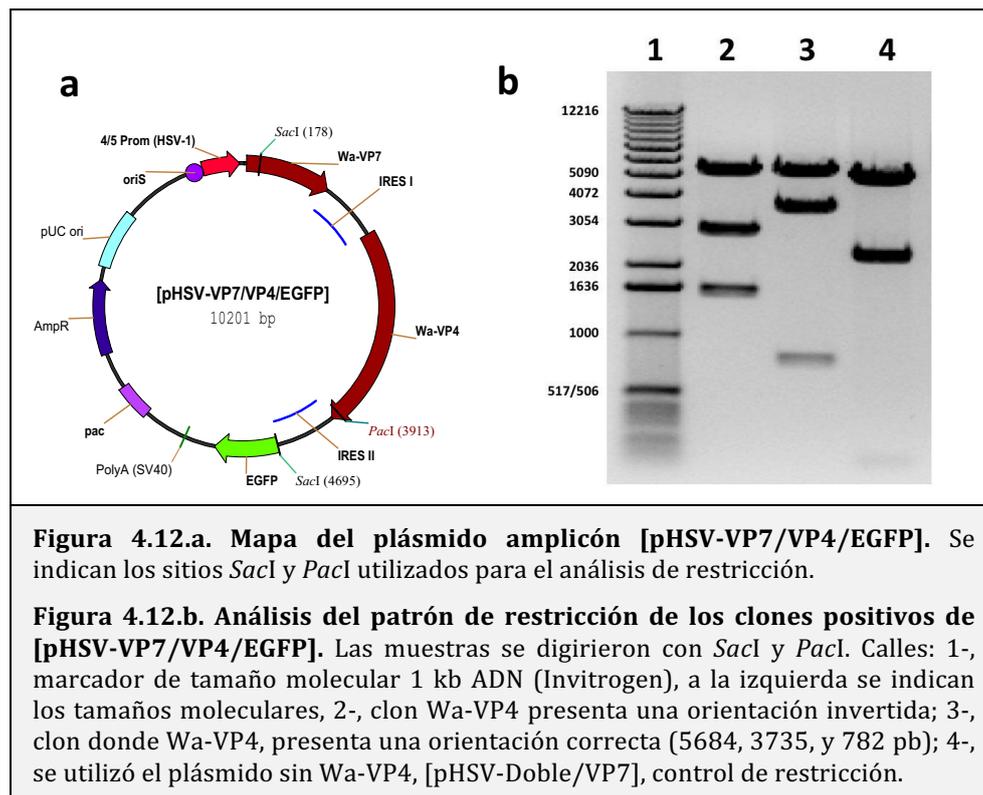
4.13.3.2 Segunda etapa: subclonado de Wa-VP4 en el plásmido: [pHSV-Doble/VP7]:

Una vez que se seleccionó el clon del plásmido [pHSV-Doble/VP7], se trató con las ER *NotI* y *BclI*, por otro lado se obtuvo el fragmento correspondiente a Wa-VP4 por digestión, con las mismas enzimas, del plásmido [pGEMT-Easy/Wa-VP4] (Anexo I, apartado 3.3.4), luego de la reacción de ligación, se transformó una suspensión de bacterias *E. coli* DH10B competentes.

Se realizó una selección de colonias positivas para VP4, dividida en dos rondas, por medio de una PCR específica para Wa-VP4. Se detectaron 12 colonias positivas. (Figuras 4.11.a y 4.11.b).

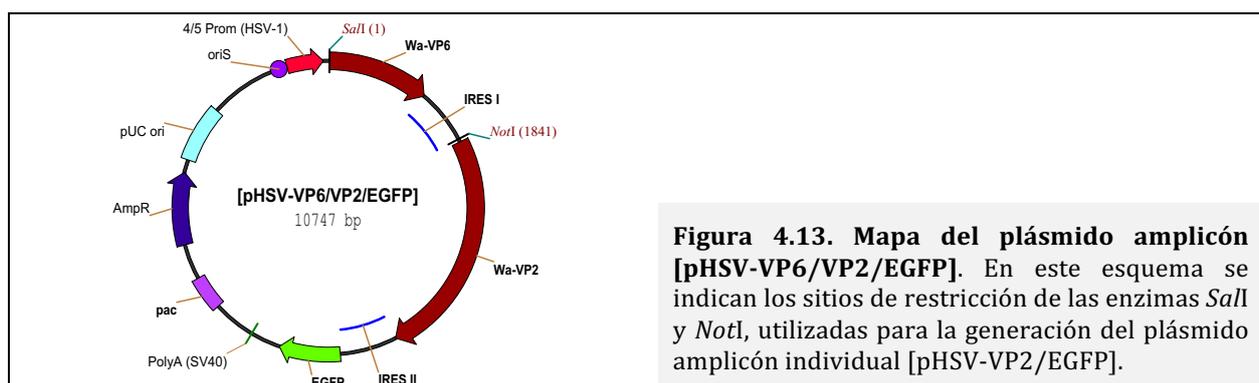


Se preparó ADN plasmídico de dos de los clones positivos para [pHSV-VP7/VP4/EGFP], una alícuota se trató con las enzimas *SacI* y *PacI*, utilizándose [pHSV-Doble/VP7] como control, Figura 4.12.a. En la Figura 4.12.b, se muestra el resultado de, los fragmentos esperados para la construcción con VP4 en la orientación correcta (5684, 3735, y 782 pb); con orientación invertida (5684, 2916 y 1593 pb), y el patrón esperado para [pHSV-Doble/VP7] (5689 y 2174 pb).



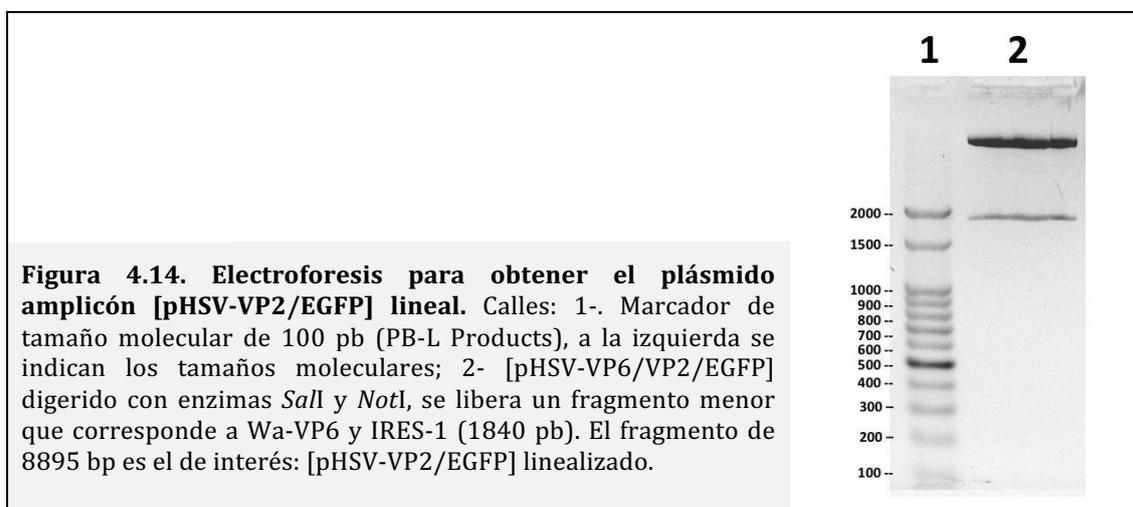
4.13.4 Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-VP2/EGFP]

Para obtener esta construcción simple, se digirió el plásmido amplicón doble [pHSV-VP6/VP2/EGFP] con las ER *Sall* y *NotI*, y se eliminó la secuencia que codifica para VP6 y el IRES-I, que le sigue a la misma. Los fragmentos esperados en esta digestión tienen un tamaño de 1840 pb y 8895 pb, en la Figura 4.13, se puede observar el detalle de los sitios de restricción utilizados.



Luego de la digestión, los productos se trataron con el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I de *E. coli*, para generar enzimáticamente extremos romos, se purificó el fragmento mayor, correspondiente al plásmido amplicón que codifica de manera individual a VP2, [pHSV-VP2/EGFP] linealizado, que corresponde a la banda de ADN superior en la separación electroforética que se muestra en la Figura 4.14. Este

fragmento se circulariza nuevamente con T4 ADN ligasa, y se transforman *E. coli* DH10B competentes.



De las colonias recombinantes obtenidas, se extrajo ADN plasmídico, y éste se analizó por medio de su patrón de restricción utilizando las enzimas *EcoRV* y *NruI*. En caso de encontrar un clon positivo, se espera obtener fragmentos de 2597 pb y 6298 pb, en la Figura 4.15.a se observa el detalle de los sitios de restricción mencionados y en la Figura 4.15.b, se observa el resultado del análisis por medio de electroforesis en gel de agarosa, observando la presencia de tres clones positivos.

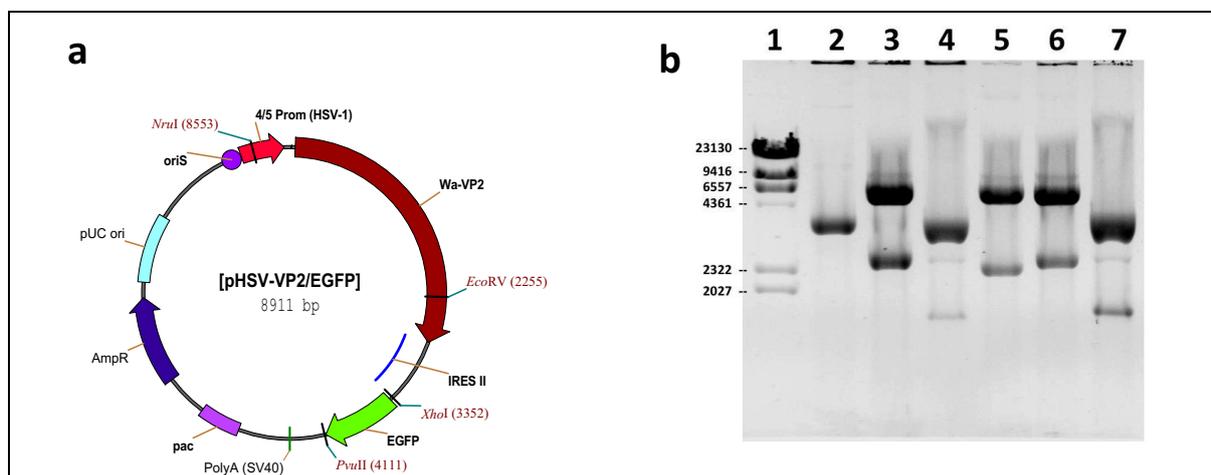
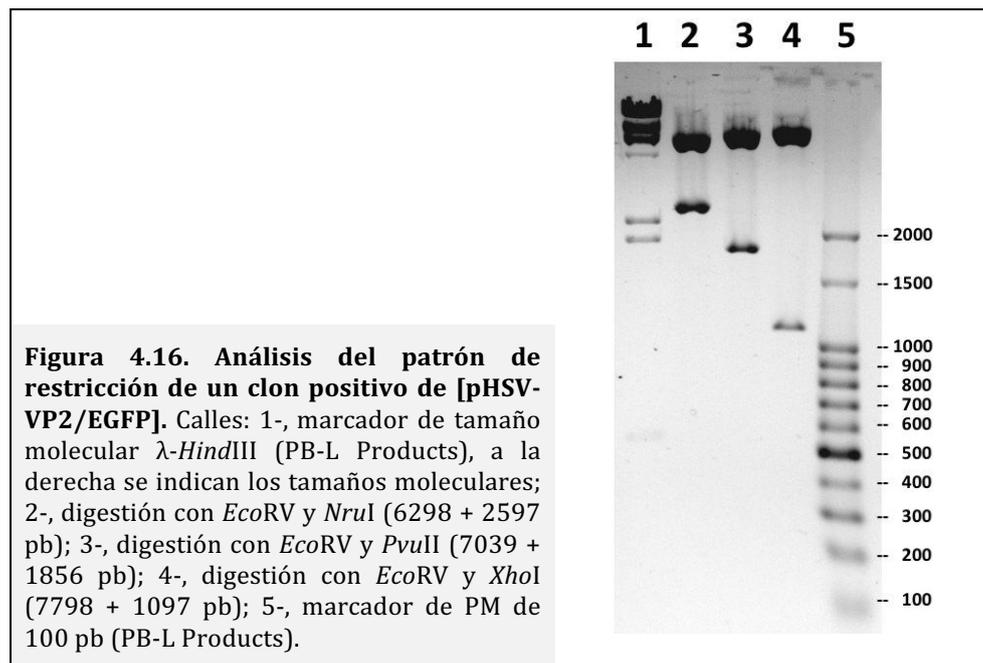


Figura 4.15.a. Mapa del plásmido amplicón [pHSV-VP2/EGFP]. Se indican los sitios de digestión de las enzimas *EcoRV*, *XhoI*, *PvuII* y *NruI*, utilizadas para confirmar obtención del plásmido amplicón [pHSV-Wa-VP2-IRES-EGFP].

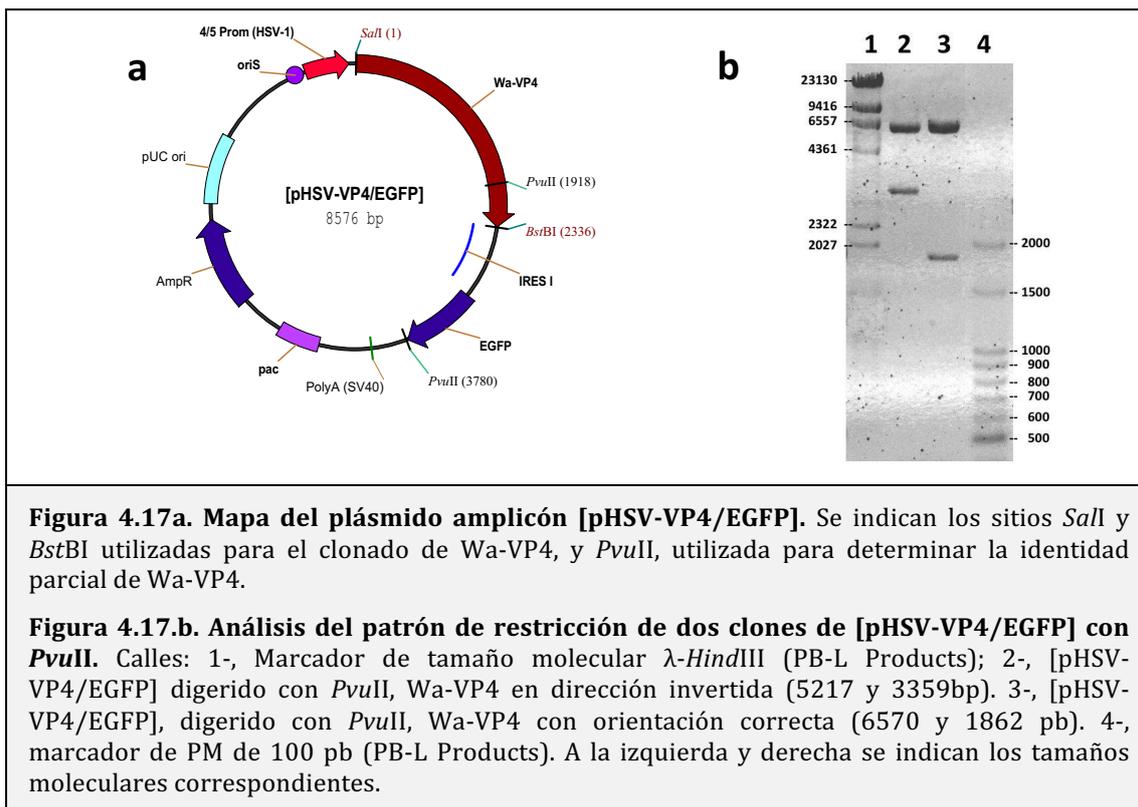
Figura 4.15.b. Análisis del patrón de restricción de clones de [pHSV-VP2/EGFP]. Calles: 1-, marcador de tamaño molecular λ -*HindIII* (PB-L Products), a la izquierda se indican los tamaños moleculares; 2-, 4-, y 7-, clones negativos; 3-, 5- y 6-, clones positivos de [pHSV-VP2/EGFP] los cuales liberan los fragmentos esperados de 2597 y 6298 pb, generados con las ER *EcoRV* y *NruI*.

Adicionalmente, para confirmar la obtención de la construcción [pHSV-VP2/EGFP], se analizó uno de los clones positivos con las enzimas *EcoRV* y *PvuII*, generando fragmentos de 7039 y 1856 pb, con *EcoRV* y *XhoI*, resultando en un patrón de tres bandas de 7798 y 1097 pb y finalmente con las mismas enzimas utilizadas anteriormente, *EcoRV* y *NruI*, 6298 y 2597 pb. En la Figura 4.15.a se puede observar el detalle de los sitios de restricción en el plásmido amplicón y en la Figura 4.16, se muestra el resultado del análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.



4.13.5 Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-VP4/EGFP]

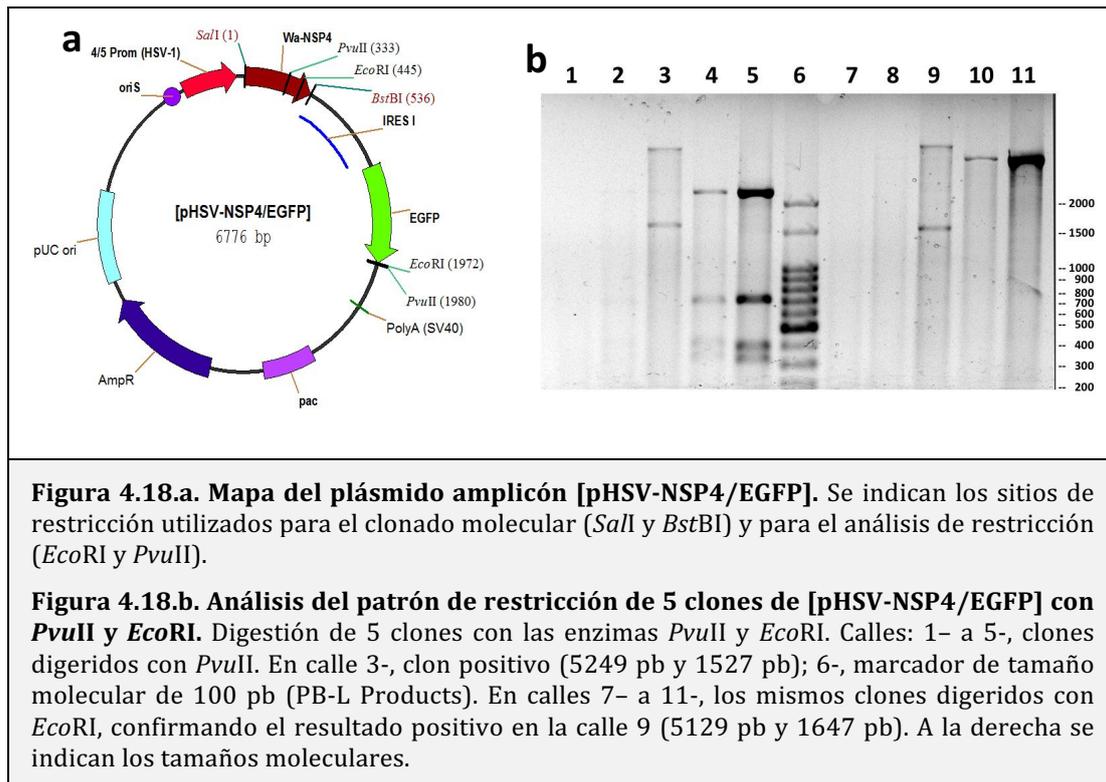
Se realiza la digestión de [pHSV-IRES-EGFP] y [pGEM[®]-T Easy/Wa-VP4] (Anexo I, apartado 3.3.4) con las ER *SalI* y *BstI*. Los productos desfosforilados se separan y purifican por medio de electroforesis en gel de agarosa, se realiza la reacción de ligación y se transforman bacterias competentes DH10B. Posteriormente, se analizó el ADN plasmídico perteneciente a dos clones recombinantes, utilizando la ER *PvuII*, y uno de ellos presentó un patrón de restricción esperado, presentando dos fragmentos de aproximadamente de 6570 y 1862 pb (Figuras 4.17.a y 4.17.b).



4.13.6 Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-NSP4/EGFP]

La construcción del plásmido amplicón se realizó mediante subclonado de NSP4 a partir del plásmido [pGEM®-T Easy/Wa-NSP4] (Anexo I, apartado 3.3.5), en los sitios *SalI* y *BstBI* del plásmido amplicón [pHSV-IRES-EGFP]. Ambas construcciones se trataron con las enzimas *SalI*, *BstBI* y fosfatasa CIP, cada uno de los fragmentos de interés se purificó a partir de gel de agarosa, y con el producto de la reacción de ligación, se transformó una suspensión de bacterias competentes.

La selección de clones positivos para Wa-NSP4, se realizó por medio de PCR a partir de colonias, seguida de una selección por medio del análisis de los fragmentos obtenidos con las ER *PvuII* y *EcoRI*, por separado. En la Figura 4.18.a, se indican los sitios de restricción utilizados en la selección de clones. Un clon positivo de [pHSV-NSP4/EGFP], se detectó y confirmó al ser digerido con las dos ER mencionadas, resultando un patrón de 5249 pb y 1527 pb con *EcoRI*, y 5129 pb y 1647 pb con la ER *PvuII*, Figura 4.18.b.

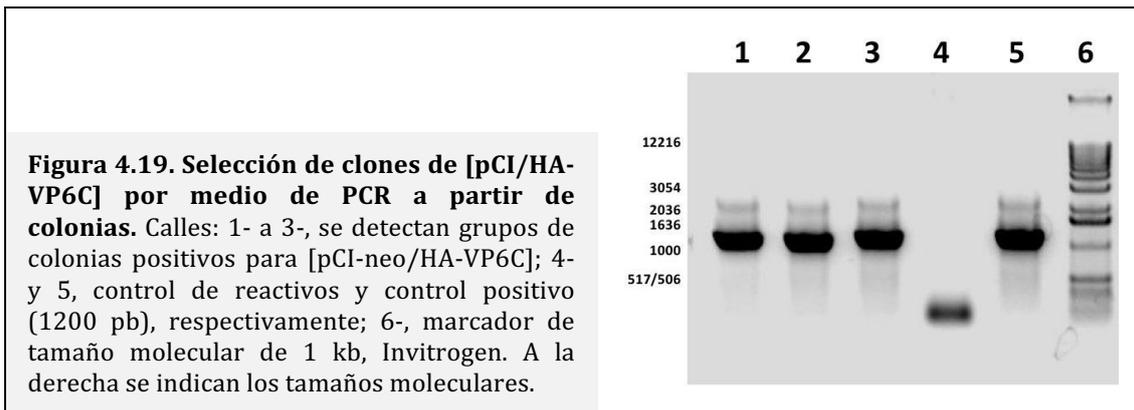


4.13.7 Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-VP6C-EGFP]

Este plásmido amplicón se utilizó en colaboración con el Laboratorio de la Virología e Inmunología de la Universidad de Quilmes, y fue gentilmente cedido por la Dra. Rosana Rota. Con el objetivo final de realizar ensayos de inmunizaciones de ratones BALB/c y compararlo con una vacuna a ADN que codifica para el mismo antígeno, descripto en la sección 4.14.

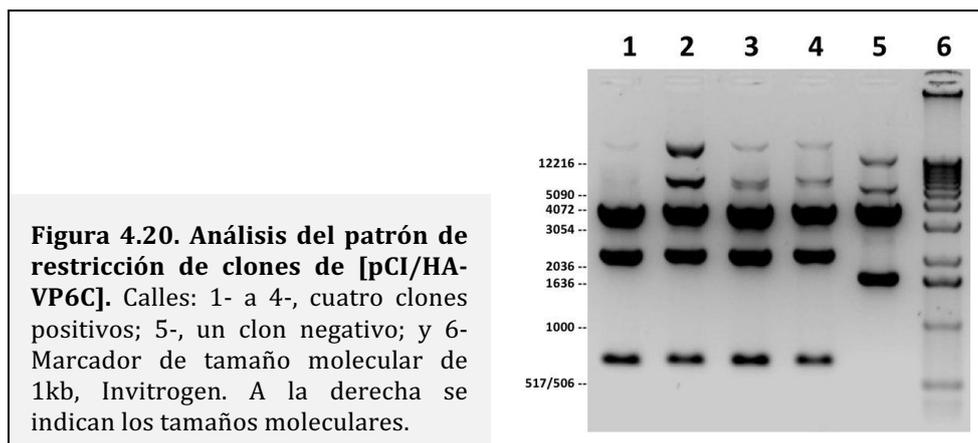
4.14 Construcción de plásmidos para expresión de VP6 de rotavirus del grupo C

Para obtener la construcción de [pCI-VP6C], se digirió el plásmido [pCI-neo], se con las enzimas *XhoI* y *HindIII*, para permitir el clonado molecular del inserto HA-VP6C, digerido con las mismas enzimas a partir de la construcción [pGEMTEasy/HA-VP6C] (Anexo I, apartado 5.2). La selección inicial de clones positivos para [pCI-VP6C], se realizó por medio de PCR a partir de colonias (Figura 4.19).



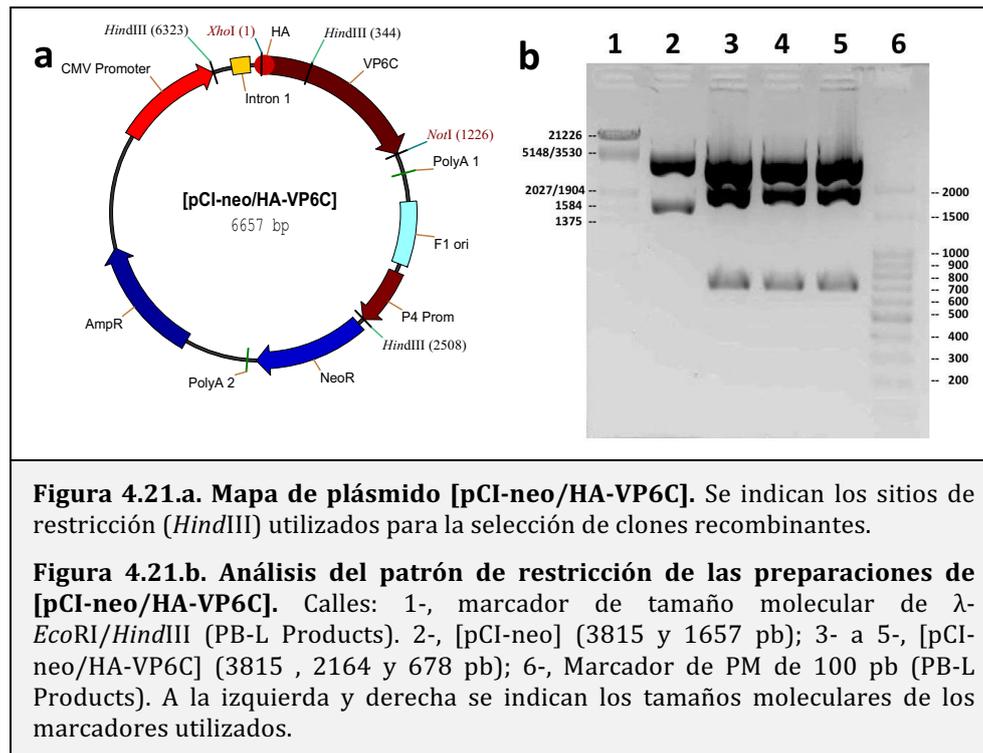
4.14.1 Análisis de colonias [pCI-neo/HA-VP6C] y [pCI-neo/VP6C-HA]

Una vez detectados clones positivos para VP6C, por PCR, se analizó el ADN plasmídico de esas colonias. Cada clon se digirió individualmente, utilizando la ER *Hind*III, resultando cuatro clones positivos que presentan el patrón de bandas correcto de 3815, 2164 y 678 pb (Figura 4.20).



4.14.2 Obtención de una vacuna a ADN para VP6C ([pCI/HA-VP6C])

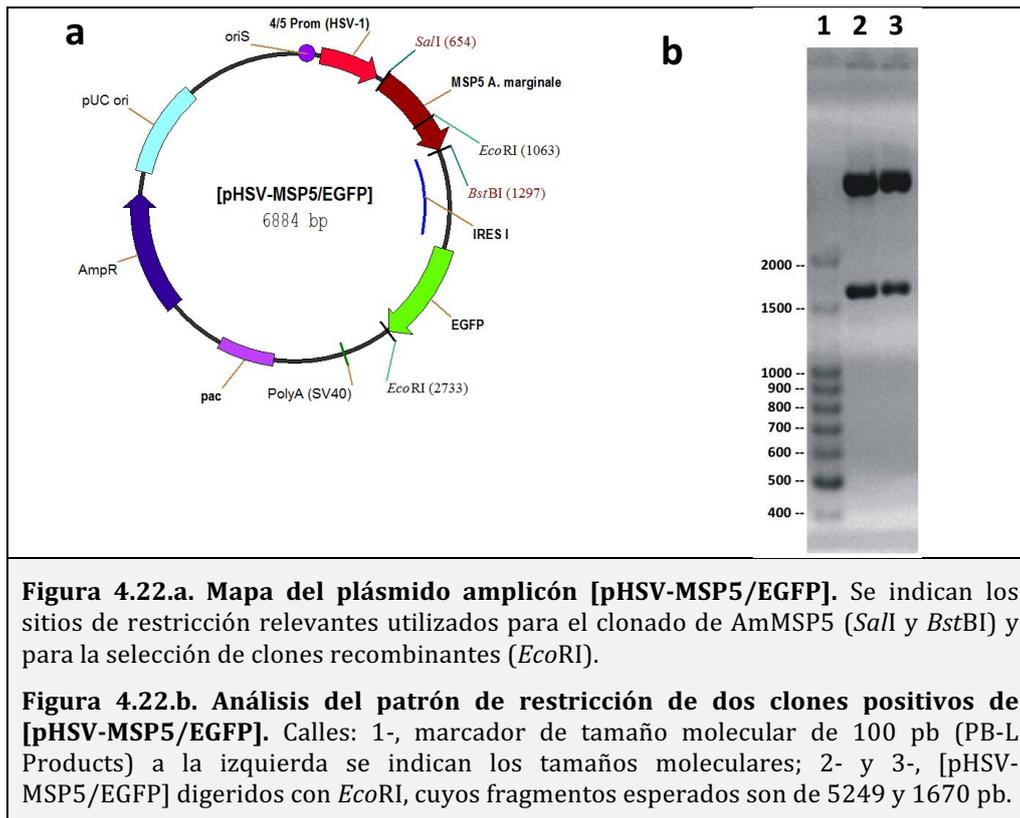
Uno de los clones de [pCI/HA-VP6C], se preparó en escala de maxipreparaciones de modo de tener material suficiente para utilizar en los experimentos de inmunización. Una alícuota de cada preparación de ADN plasmídico se analizó por su patrón de restricción con la ER *Hind*III, en la Figura 4.21.a se muestran los sitios de restricción en el mapa del plásmido analizado, y en la Figura 4.21.b se muestra el patrón resultante por medio de electroforesis en un gel de agarosa, donde también se compara al patrón obtenido con el plásmido [pCI-neo]. Los fragmentos esperados son de 3815 pb y 1657 pb, para [pCI-neo]; y 3815 pb, 2164 pb y 678 pb para [pCI-neo/HA-VP6C]. Posteriormente se envió al servicio de secuenciación para determinar la integridad del marco abierto de lectura completo de VP6C.



4.15 Obtención del plásmido amplicón para la expresión del antígeno MSP5 de *A. marginale*

4.15.1 Construcción del plásmido amplicón simple [pHSV-MSP5/EGFP]

Para construir el plásmido amplicón [pHSV-MSP5/EGFP], se utilizó el plásmido [pGEM® T-Easy/AmMSP5] (Anexo I, apartado 4) y el plásmido amplicón [pHSV-IRES-EGFP], ambos se digirieron con enzimas de restricción *SalI* y *BstBI*. Los fragmentos correspondientes a MSP5 y [pHSV-IRES-EGFP], se purificaron por separado y fueron sometidos a una reacción de ligación. Con el producto de esta reacción, se transformó una suspensión de *E. coli* DH10B. Posteriormente se realizó una selección de colonias, por medio del análisis del patrón de restricción con la enzima *EcoRI*, digiriendo como se indica en el mapa de la construcción [pHSV-MSP5/EGFP], Figura 4.22.a, y observándose por medio de electroforesis en agarosa las dos bandas esperadas, de 5429 y 1670 pb (ver Figura 4.22.b).



4.16 Producción de vectores amplicón

Como se mencionó en la Introducción en el apartado de “Vectores Herpéticos”, Pág. 2, el sistema de vectores amplicón basados en HSV-1 no portan genes virales, por lo tanto son no-replicativos y dependen de funciones colaboradoras para su producción. Estas funciones pueden ser provistas por genoma de HSV-1 defectivo clonado en cromosoma bacteriano artificial (BAC) o por un HSV-1 defectivo, pero que puede replicar en células específicas que lo complementan. A continuación se detalla la metodología empleada para la producción de las tres variantes de vectores basados en HSV-1, utilizadas en este trabajo.

4.16.1 Vector amplicón empaquetado con virus “helper”

4.16.1.1 Transfección con plásmido amplicón

Para realizar el primer pasaje de los amplicones, se sembró un frasco de cultivo celular de 75 cm² con 5x10⁶ células utilizando medio de cultivo DMEM suplementado al 10% SFB (Materiales y Métodos, sección 4.2), al día siguiente, por cada frasco de 75 cm², se combinaron en un microtubo estéril, 6 µg de ADN de plásmido amplicón, 750 µl de OptiMEM y 30 µl de Reactivo Plus, luego se homogenizó suavemente unos segundos. La mezcla se incubó 15 min a TA, y adicionó la mezcla de 45 µl de Lipofetamine y 750 µl de

OptiMEM, se homogeneizó suavemente, e incubó de nuevo durante 15 min a TA. Las células se lavaron con medio de cultivo OptiMEM, y se adicionó la mezcla de transfección en 10 ml del mismo medio a cada frasco. Se incubó durante 3 h a 37°C en estufa con 5% CO₂, luego se agregó 10 ml más de OptiMEM, y se incubó nuevamente, hasta el día siguiente.

4.16.1.2 Infección con HSV-1 LaLΔJ, Pasaje 0

Luego de la incubación post-transfección, se realizó un lavado de las células con DMEM sin SFB, se retiró el medio de lavado e infectó (la monocapa transfectada) en un volumen de 3 ml conteniendo el virus HSV-1 LaLΔJ, con una MOI de 0,3 UFP/ml. Para favorecer la infección, se colocó el frasco en agitación suave, durante 1 h 30 min, a 37°C. Luego de la adsorción viral, se descartó el medio, y se realizó un lavado de la monocapa con DMEM, finalmente se adicionaron al frasco 15 ml de DMEM 1% SFB. La incubación se realizó durante 48 h a 37°C en estufa con 5% CO₂. Transcurrido este tiempo de infección, la mayor parte de las células deben presentar un efecto citopático abierto típico de HSV-1. La cosecha incluye tanto al sobrenadante como a la monocapa infectada, las células se separaron del frasco por medio de una espátula estéril, se colocó la suspensión generada en tubo de 50 ml, y se centrifugó a 800 x *g*, durante 10 min a 4°C. El sobrenadante (SN1) se transfiere a un tubo de centrifuga *Oak Ridge* y almacenó en hielo, por otro lado el *pellet* se resuspendió en 1 ml de PBS 1X estéril, el lisado de estas células se favoreció por medio de tres ciclos de congelado-descongelado en freezer de -80°C, o alternativamente utilizando un sonicador (3 pulsos de 30" en baño de agua-hielo), finalmente se centrifugó a 800 x *g* durante 10 min. El *pellet* extraído se descartó y se conservó la suspensión viral que estaba asociada a dicho paquete celular (SN2). El sobrenadante SN1 se centrifugó a 18.000 x *g* durante 1 h 30 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió este segundo *pellet* utilizando el SN2. La suspensión final de partículas virales se almacenó a -80°C hasta su titulación.

4.16.1.3 Determinación de títulos de vector amplicon, virus helper y revertantes

Para determinar el título en cada producción, se preparó una placa de seis pocillos con 1x10⁶ células por pocillo de la línea celular Gli36, para titular el vector amplicón, una placa con 4,8x10⁵/pocillo de células Vero-7b para titular virus HSV-1LaLΔJ y una tercera placa se sembró con 4,8x10⁵/pocillo de células Vero para evaluar

la ausencia de virus revertantes. Las tres líneas celulares son propagadas en medio DMEM 10% SFB y los pocillos deben estar en una confluencia del 90% al momento de la titulación. Las diluciones se prepararon en medio DMEM 1% SFB, luego de lavó cada una de las placas con DMEM 1% SFB, se agregó 100 µl de cada dilución a un pocillo y 500 µl de medio. La adsorción se realizó durante 1 h a 37°C en estufa con 5% de CO₂, y se homogeneizó suavemente cada 15 min, luego de la adsorción se retiró el inóculo, y se cubrió la monocapa infectada con 3 ml de DMEM 1% SFB y Carboximetil celulosa (CMC) al 1%.

Determinación del título de los vectores amplicón

Luego de 24 h de infección, se realizó el cuentan las células Gli36 fluorescentes, y el promedio se multiplicó por 10 y la inversa de la dilución para determinar el título del stock viral, el cual es expresado en Unidades de Transducción por unidad de volumen, UT/ml.

Determinación del título de virus colaborador HSV-1 LaLAJ

A las 72 h post-infección, se realizó el recuento de las placas de lisis en la monocapa de células Vero-7b, y se utilizó el mismo cálculo que para los vectores amplicón, expresando el título en Unidades Formadoras de Placa, UFP/ml.

Determinación de la presencia de revertantes

En la monocapa de las células Vero, que no trans-complementan la replicación del virus colaborador, se analizó la presencia de efecto citopático característico de HSV-1, para la detección de posibles virus revertantes derivados de HSV-1LaLAJ.

4.16.1.4 Amplificado de stocks de Pasaje 0 a Pasaje 1

Por cada preparación de vector amplicón a amplificar, se cultivó en un frasco de cultivo de 175 cm², células Vero-7b en una confluencia cercana al 90%. Estas células se infectaron, utilizando el material obtenido en el *Pasaje 0*, con una MOI de 0,3, en un volumen de inóculo final de 5 ml (con DMEM - 1% SFB), y se incubó durante 1 h a 37°C. Luego de la adsorción del virus, las células se lavaron una vez con DMEM - 1% SFB, y se adicionó un volumen de 25 ml de DMEM - 1% SFB. Se incubó el cultivo infectado durante 48 h a 37°C, en la estufa con un 5% CO₂, se monitorearon por microscopía de campo claro, hasta que las células presentaron efecto citopático, y se cosechó la mezcla de vector amplicón y virus HSV-1LaLAJ, utilizando una espátula estéril *ad hoc* (Greiner,

BioOne, Alemania, N° cat.: 541070), luego se centrifugó a $800 \times g$, durante 10 min a 4°C , en un tubo de 50 ml. A partir de este momento, la extracción de las partículas virales y de vector amplicón se obtuvieron de la misma manera que para el *Pasaje 0*, apartado 4.16.1. Los stocks virales se titularon y almacenaron a -80°C hasta su concentración mediante colchón de sacarosa, como se describe para el sistema “*helper free*”.

4.16.2 Vectores amplicón empaquetados por el sistema “*helper free*”

4.16.2.1 Co-transfección de células y cosecha de vectores “*helper free*”

Por cada placa de cultivo de 60 mm, se sembraron con $1,2 \times 10^6$ células Vero 2-2. Al día siguiente, en un tubo de 15 ml, se combinó un volumen de 100 μL de Opti-MEM I (N° cat.: 31985070, Life Technologies, EUA), 0,6 μg de ADN de plásmido amplicón, 0,2 μg de pEBHICP27 y 2 μg del bácmido específico conteniendo el genoma modificado de HSV-1 (HSV-BAC), por último lentamente se adicionaron 10 μL de Reactivo Plus (N° cat.: 11514-015, Life Technologies, EUA). En otro tubo, adicionar 12 μL de Lipofectamine (N° cat.: 18324-012, Life Technologies, EUA) a 100 μL de OptiMEM I. El contenido de los tubos se combinó e incubó durante 45 min. a TA. Luego de la incubación cada placa se lavó con 2 ml de OptiMEM I, se adicionó 1,1 ml de OptiMEM I al tubo con la mezcla de transfección y se colocaron en la placa de cultivo, luego de retirar el medio, inmediatamente se incubó en estufa de cultivo durante 5 h 30 min. a 37°C , 5% CO_2 . Luego de la incubación, se retiró la mezcla de transfección y se cada placa se lavó tres veces con 2 ml de OptiMEM I. Luego del último lavado, se agregaron 3,5 ml de DMEM 6% SFB e incubó 48 a 72 h, observando con microscopio de campo claro, el progreso de la infección. Las células se cosecharon utilizando una espátula en el mismo medio, toda la suspensión se transfirió a un tubo de 15 ml. En un baño agua-hielo, se favoreció una disociación celular por medio del sonicado durante 20 seg. con una energía de 20%, de este modo se favorece la liberación de partículas virales asociadas a células. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación 10 min. a $1.400 \times g$, a 4°C , y el sobrenadante se clarifica por medio filtro de jeringa de 0,45 μm . La suspensión de vector amplicón se distribuyó en alícuotas de 1 ml y una alícuota de 100 μl se reservó para la titulación de cada *stock*. Los tubos se congelaron rápidamente en baño de etanol-hielo seco, y fueron almacenados a -80°C .

4.16.2.2 Concentrado de vector amplicón

La concentración de las partículas de vector amplicón se realizó utilizando un colchón de sacarosa al 25%, para esto se colocó 1 ml de solución de sacarosa en cada tubo de ultracentrífuga (Beckman Ultra-Clear N° cat.: 344057, EUA), y adicionó lentamente 1 ml de suspensión de vector amplicón, completando el tubo con vaselina líquida estéril. La ultracentrifugación se realizó durante 4 h a aproximadamente 108.000 x *g*. Cada sobrenadante se descartó cuidadosamente y el *pellet* correspondiente resuspendió en 100 µL de PBS 1X estéril, los stocks concentrados se almacenaron a -80°C hasta su uso.

4.16.2.3 Titulación de vectores amplicón “helper free”

El título de cada suspensión se determinó de la siguiente manera: se sembró una placa de 24 pocillos con células Vero 2-2, 1×10^5 células/pocillo en 0,5 ml de DMEM 10% SFB, e incubó a 37°C, 5% CO₂. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y cada placa se lavó con PBS 1X, y luego se adicionó a cada pocillo un volumen de 250 µL de DMEM 2% SFB, a tres pocillos diferentes se les agregó un volumen de 0,1; 1; o 5 µL de suspensión de vector, e incubó la placa en estufa de cultivo durante 48 h más. Luego, se retiró el sobrenadante y se fijaron las células durante 20 min. a TA con 250 µL de paraformaldehído al 4%, pH 7,0. Se lavó la monocapa fijada tres veces con PBS 1X y procedió al conteo de células fluorescentes por medio de microscopio de fluorescencia invertido. El título de los *stocks* se determinó multiplicando por el factor de dilución, y se expresó como Unidades de Transducción por ml de suspensión (UT/ml).

4.17 Generación de virus recombinante para “Display” de epitopes

4.17.1 Recombinación BAC con cepa SW102 y selección con galK

En este apartado, se describe la metodología para la modificación del genoma de HSV-1 cepa 17 (N° de Acceso: NC_001806) clonado en el bácmido HSV-BAC2. El protocolo general de modificación y los plásmidos utilizados son los descritos por Warming y col., 2005.

4.17.2 Generación del fragmento de transferencia de galK y de RGD

Para construir el fragmento de transferencia, se diseñaron oligonucleótidos iniciadores, los cuales tienen aproximadamente 50 pb homólogos al sitio de recombinación de gC (UL44) del genoma de HSV-1, indicados en cursiva y subrayados, e

inmediatamente le sigue la secuencia con la que que hibridizan con *galk*, destacados en negrita (Warming y col., 2005). De esta manera al amplificar *galk*, se obtiene un casete que lleva en los extremos, las regiones de recombinación homóloga al genoma viral, en el extremo 5', la secuencia nucleotídica que corresponde la base 96.365 hasta la 96.413 y, como oligonucleótido de la hebra complementaria, la secuencia de HSV-1 contigua desde 96.414 a 96.463, en referencia al genoma de HSV-1 cepa 17. La secuencia de los oligonucleótidos resultantes son las siguientes, subrayado la que corresponde a fragmento de gC de HSV-1 y en negrita lo que corresponde a *galk*. Para el caso de RGD, lo mismo ocurre subrayado el fragmento correspondiente a gC y en negrita la secuencia correspondiente a RGD.

Oligonucleótido iniciador sentido gC-*galk*: 5'-CGGGGCGGGGTGTCCGGGGGCTCGGAAACTG
CCTCCACCGGGCCACGCGTGTGACAATTAATCATCGGCA-3'.

Oligonucleótido iniciador antisentido gC-*galk*: 5'-GACCCCGATGTGGGGGCTCGCTCGCGTT
CGTCACCGCTCCCGGGTGATTTCAGCACTGTCCTGCTCCTT-3'

Oligonucleótido iniciador sentido gC-RGD: 5'-CGGGGCGGGGTGTCCGGGGGCTCGGAAACT
GCCTCCACCGGGCCACGAGGTACAGCAGAAATGCTGTGCCC-3'

Oligonucleótido iniciador antisentido gC-RGD: 5'-GACCCCGATGTGGGGGCTCGCTCGCGT
TTCGTCACCGCTCCCGGGTGATAGGCAGCGTCCGTACCACCTTTTGA -3'

Las condiciones de reacción de PCR fueron las siguientes: 10 µM de cada primer, 10 µl 5X GC buffer, 3 µl DMSO, 10 µM dNTPs, 10 ng de molde de plásmido *pgalk* (para el caso de amplificar *galk*) o pCI-VP1 (cedido por Dra. A. D'Antuono, Instituto Dr. César Milstein, CONICET), 0,5 unidades de ADN polimerasa Phusion® (New England Biolabs, Reino Unido), H₂O csp. 50 µl; 94°C durante 15 s, 60°C por 30 s, y 72°C, 1 min, 30 ciclos de reacción. Luego de purificar el producto de reacción, se adicionó *DpnI* (10 U) e incubó por 2 h a 37°C. Los fragmentos finalmente se separaron por medio de electroforesis en gel de agarosa, y se purificó la banda correspondiente a *galk* y a fragmentos de ADN de gC.

4.17.3 Preparación de *E. coli* SW102 electrocompetentes

Para la preparación de la suspensión de *E. coli* SW102 competentes, se inoculó un cultivo de 5 ml de LB, e incubó hasta el día siguiente a 32°C en agitación. Se prepararon dos baños termostatzados, uno a 32°C, y el otro a 42°C; un baño de hielo-agua; 50 ml de H₂O estéril a 4°C; una centrífuga de mesada a 4°C. Luego se inocula con,

con 0,5 ml del preinóculo preparado el día anterior, un cultivo de 25 ml, en un Erlenmeyer de 50 ml, y se incubó a 32°C en agitación a 200 RPM, hasta alcanzar una DO_{600} de aproximadamente 0,6. Se transfirieron 10 ml del cultivo a otro Erlenmeyer de 50 ml e incubó durante 15 min a 42°C. Luego del shock térmico, se enfrió el cultivo en el baño de agua-hielo, transfirieron a tubos de 15 ml, donde se centrifugaron durante 5 min a $5.500 \times g$, a 0°C. Se descartó el sobrenadante, y el *pellet* resultante se resuspendió finalmente en 1 ml de H₂O, siempre manteniendo los tubos en el baño agua-hielo. Se realizó un lavado resuspendiendo en 9 ml de H₂O, y se centrifugó nuevamente (5 min, $5.500 \times g$, 0°C). Se retiró el sobrenadante invirtiendo los tubos y secando con papel absorbente, el *pellet* se resuspende en el líquido remanente (aproximadamente 50 µl) y se mantuvo el tubo en hielo hasta la electroporación.

4.17.4 Electroporación de HSV-BAC2 en E. coli SW102

Para la transformación de SW102, a 25 µl de una suspensión de bacterias competentes, se adicionaron 2 µl de ADN (~1 µg) de HSV-BAC, se transfirieron a una cubeta de 0,1 cm, y realizó la electroporación a 25 µF, 1,75 kV, y 200 ohm. La recuperación de las bacterias con 1 ml de LB, incubando en agitación, en un tubo de 15 ml, 1h a 32°C. Cada transformación se distribuyó en cuatro placas de LB-Agar y Cam (12,5 µg/ml). Los volúmenes analizados fueron de 1 µl, 10 µl y 100 µl, y el resto en la última placa. Las placas se incubaron a 32°C durante 18-48 horas, las colonias que se obtuvieron fueron clones denominados SW102 HSV-BAC2.

4.17.5 Electroporación del casete *galK*⁺ en el genoma de HSV-BAC2

Para introducir, por recombinación homóloga el casete de con *galK*, primero se inoculó un cultivo de 5 ml, con una colonia de *E. coli* SW102 HSV-BAC2, de LB suplementado con 12,5 µg/ml de Cam, el cultivo se realizó a 32°C. De dicho cultivo, se obtuvieron bacterias electrocompetentes, como se explicó arriba, manteniendo la selección con Cam. Para esta etapa se preparó el ADN del casete con *galK* flanqueado por las secuencias de gC para permitir la recombinación homóloga específica.

Al día siguiente, se prepararon dos baños termostatzados, uno a 32°C, otro a 42°C, y un recipiente con agua-hielo. Se diluyó el cultivo de SW102 HSV-BAC2 en una relación 1:50 con medio LB con Cam 12,5 µg/ml e incubó 3-4 h, en agitación a 32°C en un baño agitado hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6 aproximadamente. Se transfirieron 10 ml del cultivo a un tubo cónico estéril, y se incubaron en agitación a 42°C por

exactamente 15 min para inducir la expresión de genes pertenecientes al profago λ -Red que hacen posible la recombinación homóloga (Warming y col., 2005), el resto del cultivo se continuó a 32°C como control no inducido. Las dos muestras, inducida y no inducida, se enfriaron en el baño agua-hielo y se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml, y centrifugaron a 5.000 RPM a 0°C durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 1 ml de H₂O_{dd} estéril a 0°C, agitando suavemente en el baño agua-hielo, luego se agregaron 9 ml de H₂O_{dd} estéril a 0°C, se centrifugó nuevamente y se repite este lavado otra vez. Cada pellet obtenido, se resuspendió en aproximadamente 50 μ l de H₂O_{dd} estéril y se mantuvo en hielo hasta su electroporación. Para esto, se transfirieron 25 μ l de la suspensión en una cubeta, la cual se electroporó de la misma manera que se describe arriba. Se adicionó a cada muestra 1 ml de LB y se incubó cada cultivo a 32°C durante 1 h. Luego de la recuperación, las bacterias se centrifugaron 15 seg. a 17.900 x *g*, se resuspendieron en 400 μ l de buffer M9 1X, el lavado se repite una vez más, y se resuspenden las bacterias en M9 1X nuevamente, para cultivar 10 μ l y 100 μ l de una dilución 1:10 y 100 μ l de una dilución 1:100, en placas de medio mínimo M63 con galactosa, leucina, biotina, y cloranfenicol, los lavados eliminan los nutrientes presentes, para permitir la selección correcta en medio mínimos M63. Para el control no inducido, se analizó el crecimiento de bacterias directamente a partir de 100 μ l de suspensión e 1X M9. Las placas se incubaron durante 3 días a 32°C. Luego de la incubación, algunas colonias que crecieron, se estriaron en placas indicadoras McConkey conteniendo galactosa y 12,5 μ g/ml de Cam. Luego de 3 días de incubación a 32°C, las colonias rojas indicaron bacterias SW102 HSV-BAC2/*galK*⁺.

4.17.6 Inserción del casete gC-RGD en el genoma de HSV-BAC2/*galK*⁺

Para insertar el ADN conteniendo el epítopo RGD del VFA, 200 ng del ADN preparado por PCR, se transformó en las bacterias SW102 HSV-BAC/*galK*⁺ electrocompetentes de la misma manera que la descrita anteriormente, con la diferencia fundamental que la selección en esta etapa es de las colonias a las que por recombinación homóloga se le eliminó del báculo la secuencia de *galK*, por introducción del epítopo RGD. Entonces, luego de la electroporación, se recuperaron las bacterias en 10 ml de medio LB en Erlenmeyer de 50 ml, incubando 4,5 h a 32°C con agitación a 200 RPM. A 1 ml de células de la transformación, se las recuperó por centrifugación, y se lo lavó con M9 1X dos veces, y la resuspensión final en 1 ml de M9 1X se inoculó en placas de medio mínimo M63 con glicerol, leucina, biotina,

cloranfenicol y 2-deoxi-galactosa (DOG), utilizando 100 μ l de diluciones 1, 1:10, 1:100 y 1:1000. Se incubó durante 3 días a 32°C. Se analizaron 10 colonias que crecieron en el medio selectivo, para esto se preparó ADN de bácmido modificado en volúmenes pequeños y se digirió con la ER *Hind*III para analizarlo por su patrón de restricción.

4.17.7 Aislamiento y caracterización de ADN de clones de HSV-BAC2/RGD.

Para producir ADN suficiente para seleccionar clones positivos por medio de su patrón con enzimas restricción, con cada colonia a analizar, se inoculó un cultivo de 5 ml de LB, utilizando 12,5 μ g/ml de Cam para mantener la selección, en un tubo de 15 ml, se incubó durante 16 h a 32°C en agitación, luego se centrifugó durante 10 min a 2000 x *g*, a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 300 μ l de solución I, y transfirió a un microtubo de 2 ml, se adicionaron 300 μ l de solución II, y luego de homogeneizar suavemente, se incubó 5 min. a TA, posteriormente se agregaron 300 μ l de solución III, y previa homogeneización se incubó en hielo 5 min., se centrifugó durante 10 min. a 10.600 x *g*, 4°C. En un nuevo microtubo se precipitó el ADN con 800 μ l de isopropanol, incubando 5 min. en hielo y centrifugando 15 min a 10.600 x *g*, a 4°C. El *pellet* se lavó con 500 μ l de etanol 70%, se centrifugó 5 min. a 10.600 x *g*, a 4°C. El sobrenadante se descartó y se dejó secar el pellet a TA. El ADN se resuspendió en 40 μ l de buffer TE en baño termostático a 37°C, luego se utilizaron 10 μ L de ADN por cada análisis del patrón de restricción con la enzima de restricción *Hind*III, el cual se resolvió en gel de agarosa 0,5% buffer TAE 1X. Para confirmar la introducción correcta de la mutación, los fragmentos se separaron durante 16-20 h por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,5% aplicando un voltaje de 40V en buffer TAE 1X, utilizando un marcador de tamaño de alto peso molecular y el de 1kpb, y se comparan los fragmentos de restricción obtenidos, con el patrón esperado con la secuencia de HSV-1 publicada en la NCBI (McGeoch y col., 1988).

Los clones positivos se confirmaron por secuenciación de la región de interés. Las soluciones I, II y III, tienen la misma composición que para las minipreparaciones de ADN plasmídico, descritas en el apartado 4.10.

Luego de obtener un clon de HSV-BAC2/RGD adecuado, tanto por su patrón de restricción como secuenciación de la región donde se introdujo el epítopo RGD, se produjo ADN de los bácmidos en cantidad y calidad suficiente para transfectar células

Vero 2-2. Este procedimiento se aplicó también al bácmido HSV-BAC2 sin modificar, el cual se utilizó como control.

4.17.8 Preparación de ADN de HSV-BACs control y RGD+

El ADN de bácmidos se prepararon utilizando un kit comercial para aislamiento de ADN plasmídico de Qiagen, EUA, N° cat.: 12163, las soluciones utilizadas fueron las descritas por el fabricante.

Inicialmente se inoculó un cultivo de 5 ml (LB con Cam a una concentración de 12,5 µg/ml), con uno de los clones previamente analizados. La incubación se realizó durante 8 h a 37°C en agitación. Luego, por cada preparación de ADN de bácmido, se inoculó con 1 ml cada uno de 4 erlenmeyers de 2 L conteniendo 1 L de LB con Cam, se continuó la incubación por 16 h a 37°C, con una agitación de 200 RPM. Las bacterias se recuperaron distribuyendo en 4 tubos de 250 ml, y centrifugando 10 min. a 4000 x *g*, 4°C y descartando el sobrenadante, esta etapa se repitió hasta que se procesaron los 4 L de cultivo. Al finalizar la última centrifugación, se descartó el sobrenadante y se retiró el volumen remanente por inversión de los tubos sobre un papel absorbente, durante 2 min. Cada pellet se resuspendió en solución P1 y combinaron las seis alícuotas, en un volumen final de 160 ml, y se distribuyeron 40 ml en cada tubo. Luego se adicionaron 40 ml de solución P2 a cada tubo, y homogeneizó invirtiendo cuatro a seis veces, incubó 5 minutos a TA. Para neutralizar la lisis, se adicionó un volumen de 40 ml de solución P3, homogeneizó inmediatamente por inversión de los tubos cuatro a seis veces. Luego de incubar los tubos en hielo durante 20 min. se centrifugó 30 min. a 16.000 x *g*, 4°C. Los sobrenadantes se filtraron con papel de filtro (120 mm de diámetro), dentro de 4 tubos de 250 ml, donde se precipitó el ADN con 0,7 volúmenes (84 ml por tubo) de isopropanol, homogeneizó suavemente, y centrifugó 30 min. a 17.000 x *g*, 4°C. Cuidadosamente, se retiró el sobrenadante de cada tubo y marcó la localización del *pellet* de ADN en los tubos. Los *pellets* se lavaron con 20 ml de etanol 70% frío, y centrifugó durante 30 min. 16.000 x *g* 4°C. Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendió cada pellet en 2 ml de solución buffer TE (pH= 7,4). Los 8 ml finales de ADN resuspendido se cosecharon en un tubo de 250 ml y se adicionó un volumen de 52 ml de buffer QBT. Se equilibraron dos columnas *Tip 500* (Qiagen, EUA) con 10 ml de QBT, luego se transfirió el ADN resuspendido a través de papel de filtro, 30 ml cada columna, dejó pasar por fuerza de gravedad. Cada columna se lavó dos veces con 30 ml de buffer QC, la elución del ADN se realizó con 15 ml de QF precalentado a 65°C, colectando el

eluato en un tubo de centrífuga de 30 ml. El ADN se precipitó con 10,5 ml de isopropanol, homogeneizando y luego centrifugando 30 min. a $20.000 \times g$, 4°C . Cada *pellet* se lavó con etanol 70% en hielo, se retiró el sobrenadante y se dejó secar 5 min. a TA, luego se resuspendió cada pellet en 3 ml de buffer TE (pH= 7,4) durante 3 horas a 37°C . Mientras, se prepararon dos tubos de centrífuga 16x67 mm transparentes (OptiSeal™ N° cat.: 344057 Beckman, EUA), se adicionaron a cada tubo 3 g de CsCl, y 3 ml de suspensión de ADN. Una vez disuelto el CsCl, se agregó un volumen de 300 μl de bromuro de etidio (10 mg/ml en H_2O) a cada tubo. Cada una de las soluciones se cubrió con 300 μl de parafina líquida estéril, y los tubos se sellaron y centrifugaron inmediatamente durante 17 h a $234.600 \times g$, 20°C . Luego de la separación, utilizando luz UV se observaron dos bandas, la superior corresponde al ADN de HSV-BAC relajado (o “*nickeado*”), y la inferior al ADN de HSV-BAC super-enrollado (o “*supercoiled*”). La banda de ADN *supercoiled*, se retiró utilizando una jeringa descartable con aguja hipodérmica de 21-G, para esto se utilizó luz UV y se transfirió el ADN a un microtubo de 1,5 ml. Para extraer el bromuro de etidio de la solución de ADN, se adicionó un volumen igual de *n*-butanol, previamente saturado con TE/CsCl (3 g CsCl disuelto en 3 ml de TE, pH = 7,4), se mezclaron las dos fases y centrifugaron a $210 \times g$, 3 min., a TA. La fase acuosa se recuperó cuidadosamente en un tubo nuevo, y repitió el proceso de extracción cuatro a seis veces, hasta que el color rosa desapareció de ambas fases. Finalmente, a la fase acuosa se adicionó un volumen de isopropanol, homogeneizó y centrifugó a $210 \times g$, 3 min. a TA, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Para remover el CsCl, la suspensión de ADN se dializó durante 6 h a 4°C , en buffer TE (pH = 7,4), se realizó recambio de buffer y continuó dializando hasta el día siguiente. Para la diálisis, el ADN se inyectó con una jeringa de 1 ml y aguja de 34-G, en un casete de diálisis de 3 ml, con un poro de corte de 10K (*Slide-A-Lyzer 10K MWCO*, Pierce, EUA, N° cat.: 66380). Luego de dializar, se recuperó la solución de ADN en un microtubo, desde donde se tomó una alícuota para realizar la caracterización mediante cuantificación y mapeo con enzimas de restricción, y cada preparación se almacenó a 4°C . Utilizando el espectrofotómetro UV, se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm, evaluando de esta manera la calidad del ADN, y el mapeo con enzimas de restricción se realizó utilizando la enzima *HindIII* y *BstBI*, separando las bandas obtenidas por medio de electroforesis en gel de agarosa 0,5%. Para el análisis funcional se transfectaron células Vero 2-2, como se indica a continuación.

4.18 Producción de virus recombinantes

Cada semilla de virus recombinante defectivo, se propagó partir de un único foco, hasta alcanzar 2 o 3 frascos de cultivo de 175 cm², y se determinó el título de dicho *stock* semilla.

Para realizar la producción de cada virus, se prepararon 24 frascos de 175 cm² con células Vero-7b. Se sembró cada uno con 1×10^7 células por frasco, en un volumen final de 25 ml de DMEM 10% SFB, se incubó a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente, se descartó el medio, y las células se lavaron dos veces con PBS 1X, luego se adicionó una solución de tripsina 0,05% y EDTA 0,48 mM, las células se cosecharon con medio DMEM 10% SFB en un tubo de 50 ml, centrifugando durante 5 min. a 1.204 x *g*. Todas las células se colectaron en un mismo tubo, y se resuspendieron en 20 ml de DMEM 2% SFB, el cultivo se infectó en suspensión, a una MOI de 0,05-0,08 UFP/ml, durante 1h a 37°C. Luego de la incubación con el virus, se resuspendió la totalidad de las células en un volumen mayor de medio de cultivo, y se redistribuyeron a las botellas de cultivo, alcanzando con medio fresco un volumen de 25 ml finales. El cultivo se incubó hasta que todas las células presentaron efecto citopático (24-36 h post infección). Las células infectadas se cosecharon en el propio medio, utilizando un *scraper*, y se distribuyeron en tubos de 50 ml. Para separar el paquete celular, se centrifugó durante 15 min. a 1.024 x *g* a 4°C. Los sobrenadantes (SN1) se colocaron en tubos de centrífuga de 30 ml (Oak Ridge N° cat.: 3118-0030, Thermo Scientific, EUA), y cada *pellet* se resuspendió en aproximadamente 1 ml de sobrenadante, donde se homogeneizó enérgicamente utilizando un vortex, se sometió a tres ciclos de congelado-descongelado, homogeneizando con vortex cada vez que se descongeló, y por último se sonicó cada suspensión 3 veces durante 10-15 seg. con 10 seg. de pausa manteniendo los tubos en hielo. Los restos celulares ya extraídos, se separaron por centrifugación a 1.734 x *g*, 15 min., 4°C, y los sobrenadantes enriquecidos (SN2), se transfirieron junto al SN1, en tubos de centrífuga de 30 ml. Para recuperar las partículas virales, se centrifugó la suspensión a 48.384 x *g* durante 30 min. a 4°C. El sobrenadante se descartó cuidadosamente y se resuspendió cada *pellet* en 1 ml de DMEM, Las burbujas se eliminaron mediante centrifugación en un microtubo de 1,5 ml. Se tituló cada *stock* concentrado, y se continuó a la siguiente etapa de purificación por gradiente.

4.18.1 Titulación del stock viral por unidades formadoras de placa

Esta metodología de titulación es la que se utilizó para la determinación de la cantidad de partículas virales viables por unidad de volumen (UFP/ml), siendo elegida al momento de determinar el título de stocks utilizados para experimentos de inmunización. Brevemente, el día previo a la titulación, prepararon placas de 12 pocillos (N° cat.: 665 102, Greiner BioOne, Frickenhausen, Alemania), con $2,25 \times 10^5$ células/pocillo, tanto de células Vero como de Vero-7b. Por separado, se prepararon diluciones seriadas de los virus (10^{-2} a 10^{-7}) en un volumen final de 1 ml de DMEM 1% SFB. Se adicionaron 100 μ L de cada dilución, por duplicado, a la placa de cultivo. Se incubaron las placas durante 1 h a 37°C en estufa con 5% de CO₂ para favorecer la adsorción del virus, homogeneizando las mismas cada 15 min., luego se retiró el inóculo y colocó 1 ml de DMEM suplementado con SFB 1%, y carboxi-metil celulosa al 1,5%. Las placas se incubaron nuevamente durante 3-5 días hasta que se observaron placas de lisis bien definidas y separadas. El conteo se realizó en microscopio invertido directamente, o se fijaron y tiñeron las placas durante 1 min. con 500 μ L de solución de cristal violeta 1% (50:50 metanol:H₂O destilada). Con el número de placas por pocillo, se determinó y expresó el título como UFP/ml.

4.18.2 Titulación del stock viral por Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos del 50%

En la presente tesis, esta metodología de titulación por Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos del 50% (DICT₅₀) se utilizó para determinar el título en la puesta a punto de la replicación del virus recombinante TORRV-VP6, utilizados como primer recombinante a ser escalado en la producción. Para la determinación del título infeccioso DICT₅₀ del virus, se utiliza el efecto citopático sobre las células Vero-7b ejercido por diluciones del virus, luego de varios días de cultivo. El título está expresado por la inversa de la dilución donde el 50% de las células inoculadas están muertas. Se titulan dos muestras por placa. Las muestras de virus son almacenadas a -80° C, y se dejan descongelar en hielo, al momento de la titulación.

Brevemente, se tripsina un frasco confluyente de Vero-7b, (25 cm²). Resuspender las células en medio DMEM 10% SFB, obteniendo una suspensión de 245000 células/ml. Se realiza una dilución del stock viral en M199 1% SFB, en base 10, hasta 10^{-3} , cambiando la punta de la micropipeta en cada dilución. Preparar una placa para cultivo celular de 96 pocillos (N° cat.: 655 073, Greiner BioOne, Frickenhausen,

Alemania), colocando 150 μ l de M199 1% SFB en cada pocillo. En la columna 1 y por cuadruplicado, sembró un volumen de 50 μ l de la dilución 10^{-3} , y a partir de ese pocillo se realizaron diluciones en base 4 hasta la columna 10, resultando una dilución 10^{-9} , en la primera columna queda finalmente una dilución de $10^{-3,6}$. Tomando a las columnas 11 y 12 como controles negativos. Luego, se sembró 50 μ l/pocillo de suspensión celular (12250 células/pocillo), desde la columna 12 hacia la izquierda, sin cambiar las puntas de micropipeta. Las placas se incubaron en estufa a 37°C y atmósfera saturada de humedad y 5% CO₂, la observación con microscopio se realizó diariamente y se marcó en esquema de placa los pocillos positivos, donde se observó efecto citopático, a las 72 hpi en general no hay más variaciones de efecto entre un día y otro, y se procedió al revelado, retirando el medio de todos los pocillos, y se agrega una solución de cristal violeta, se incuba 30 minutos a TA y se lava con agua ultrapura eliminando el colorante remanente. Los pocillos que presentan efecto citopático, presentan espacios transparentes en los pocillos. Luego con los datos de pocillos positivos y negativos, se determina el título por medio del cálculo de Reed y Muench.

4.18.3 Purificación de stocks de virus recombinantes

Para separar los virus de restos celulares o proteínas, y obtener stocks de título más alto, el pellet viral se resuspendió en PBS y purificó con iodixanol. El siguiente protocolo se basa en la purificación con un gradiente de iodixanol, que es un compuesto que permite auto-generar gradientes (Optiprep™ N° cat.: 1030061, Axis-Shield, Noruega).

4.18.3.1 Preparación del gradiente de Optiprep™

En primer lugar se prepararon las soluciones B a F, de la siguiente manera: **Solución B**, 2,8 ml de NaCl 5M, 6 ml de HEPES 1 M (pH 7,3), 1,2 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0) en 100 ml de H₂O_{dd}. **Solución C**, 2,8 ml de NaCl 5 M, 1 ml de HEPES (pH 7,3), 200 ml de EDTA 0,5 M en 100 ml de H₂O_{dd}. **Solución D**, 5 volúmenes de OptiPrep™ en 1 volumen de solución B. **Solución E**, 2,4 ml de solución C, 500 μ l de virus en un volumen final de 2,9 ml. **Solución F**, 840 μ l de solución C; 660 μ l de solución D. Las soluciones B y C, se esterilizaron por filtración y todas las soluciones preparadas se almacenan a 4°C, durante la preparación.

Con pipeta estéril, tubos de ultracentrífuga OptiSeal™ (N° cat.: 362181, Beckman, EUA) se cargaron con un volumen de 4.4 ml de solución D, y agregaron lentamente 4.8

ml de solución E a cada tubo, evitando que queden gotas o burbujas en el cuello del tubo. Luego se completaron los tubos con solución F (aproximadamente 1,5 ml a cada tubo). El equilibrado de peso de los tubos se realizó en una balanza de precisión, adicionando solución F, y dejando una pequeña burbuja en la parte delgada del cuello para poder colocar correctamente la tapa, para esto se utilizó el soporte específico para tubos OptiSeal™ (N° cat.: 360538, Beckman, EUA). Los tubos equilibrados, se colocaron en el rotor y éste se cierra aplicando una fuerza de torque de 200 lb-pulgada, entonces se ultracentrifugaron a $296.516 \times g$ durante 4 h, a 4°C , aplicando máxima aceleración y sin freno durante desaceleración (como alternativa también es posible programar por 15 h si precisa colectar el virus al día siguiente). Al final de la corrida, los tubos se colocaron cuidadosamente en hielo, y se colectó de cada tubo la banda de virus, la cual se observa aproximadamente en la mitad del gradiente. Esto se realizó pinchando el tubo 2-3 mm por debajo de la banda con una jeringa y aguja de 18 G, aspirando el volumen mínimo necesario, evitando arrastrar restos celulares. El virus cosechado se colocó en tubos de centrifuga de 30 ml y se adicionó con PBS hasta llenar el tubo, diluyendo el iodixanol residual. Para concentrar las partículas virales purificadas, se centrifugaron los tubos a $48,384 \times g$, 30 min. a 4°C , cuando se procesaron varios tubos la colecta de virus purificado se realizó en dos tubos de 30 ml. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió cada *pellet* en 1 o 2 ml de PBS. Cuando el *pellet* se presentó firme, se incubó hasta el día siguiente en recipiente con hielo dentro de la heladera a 4°C . Para favorecer la resuspensión y disminuir la agregación de partículas virales, cada tubo se sonicó en sonicador de baño, aplicando dos pulsos de 5 seg., con 10 seg. de pausa en recipiente con hielo. Por último se dividieron pequeñas alícuotas de volúmenes 100 μl , y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

4.19 Producción de AmMSP5 recombinante

La proteína recombinante MSP5, se produjo fusionada a dos polipéptidos diferentes diferentes: MBP y 6xHis. Para esto se utilizaron los plásmidos pMAL-c2x (New England Biolabs, Inc., MA, EUA) y pRSETA (Invitrogen, CA, EUA), respectivamente. En ambos plásmidos se subclonó el marco abierto de lectura de MSP5, los oligonucleótidos iniciadores utilizados para obtener estas construcciones, se describen en el Anexo I, apartado 4.

El plásmido recombinante [pMAL/MSP5] se utilizó para producir MBP-MSP5 recombinante utilizando la cepa *E. coli* Top10, similar a una estrategia descrita en la bibliografía (Knowles y col., 1996), y la construcción [pRSETA/MSP5], se utilizó para producir 6xHis-MSP5 en la cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Palacios y col., 2014).

Brevemente, 3 ml de un cultivo de 16 h, se diluyen en 300 ml de medio LB conteniendo 100 µg/ml de Amp a una concentración, y adicionalmente 34 µg/ml de Cam para el caso de 6xHis-MSP5. Los cultivos se incubaron nuevamente en agitación a 200 RPM y 37°C de temperatura, hasta llegar a una DO_{600 nm} de 0,5. En ese momento se induce la expresión de las proteínas recombinantes, utilizando isopropil-β-galactopiranosido (IPTG). Las bacterias se incubaron 3 h más, en las mismas condiciones, y luego se cosechó cada cultivo por centrifugación a 3500 x g durante 20 min., y los pellets obtenidos se resuspendieron en 30 ml de buffer de unión a la resina correspondiente (20 mM de buffer de fosfato de sodio, 500 mM de Na Cl, 25 mM de imidazol, pH=7,8, para 6xHis-MSP5; o Tris-HCl 30 mM para el caso de MBP-MSP5). Posteriormente, las células se lisaron por sonicación en baño de agua-hielo, durante 2,5 min en pulsos de 30 segundos, a 90 W de potencia), se trataron con ADNasa (5 µg/ml) y ARNasa A (5 µg/ml) durante 20 min. a 4°C. El extracto clarificado se preparó por centrifugación a 12.000 x g, 4°C, y se filtró por filtro de 0,45 µm.

El proceso de purificación para 6xHis-MSP5 se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida de rápida performance, ÄKTA *purifier system*, utilizando columnas de 5 ml HisTrapFF, purificando la proteína recombinante por la afinidad a níquel de la misma (N° cat.: 17-5255-01, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia), siguiendo el protocolo tomado de Zimmerman y col., 2006. La proteína recombinante MBP-MSP5, se purificó por cromatografía de afinidad de amilosa (N° cat.: E8021S, New England Biolabs, Inc., MA, EUA), siguiendo el protocolo tomado de Knowles y col., 1996.

Durante la elución, se colectaron en microtubos, las alícuotas correspondientes a los picos de proteína recombinante en la elución, y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), y la concentración se determinó mediante el ensayo de Bradford (N° cat.: 500-0116, Bio-Rad, Hércules, CA, EUA) y la identidad de la proteína se determinó mediante análisis por medio de Western blot, para el caso de 6xHis-MSP5, utilizando un anticuerpo específico anti-histidinas (Tabla 2).

La proteína recombinante MBP-MSP5, se utilizó en los experimentos de inmunización de animales, y en el ELISA de inhibición competitiva (cELISA). Por otro lado, la proteína 6xHis-MSP5 purificada, se utilizó para los experimentos de linfoproliferación, y en los ELISAs para las determinaciones de anticuerpos totales específicos de MSP5.

4.20 Detección de proteínas mediante ensayos de inmunofluorescencia

Los ensayos para inmunofluorescencia (IF) se realizaron en placas de 24 pocillos, tanto para transfecciones con plásmidos recombinantes, como infecciones con los vectores virales y rotavirus, se utilizaron también diferentes líneas celulares dependiendo del vector analizado.

En cada pocillo se colocó un vidrio de montaje estéril de 12 mm de diámetro y 0,17 mm de espesor, se sembraron con $0,8 \cdot 10^5$ células por cada pocillo, y luego de 24 a 48 h de tratamiento, se lavó cada monocapa con PBS 1X y realizó la fijación con paraformaldehído 3,7% en PBS 1X, durante 15 min. a TA. La fijación se detuvo con glicina 0.1 M en PBS durante 5 min. a TA, luego se permeabilizaron las células durante 15 min. con 0,2% Triton X-100 en PBS. Los pocillos se lavaron nuevamente con PBS 1X, y se realizó una incubación para bloqueo con PBS-BSA 3% durante 15 min. a TA. Los anticuerpos primarios se prepararon en PBS-BSA, y cada muestra se incubó con el anticuerpo correspondiente, en cámara húmeda durante 1 h a TA, en un volumen de 25 μ l/vidrio. Luego de la incubación, las muestras se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min. a TA; se incubaron con el anticuerpo secundario, y posteriormente se tiñeron los núcleos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM en PBS, durante 5 min. a TA. Se repitió el lavado con PBS, se observó en microscopio de fluorescencia, y se montaron con 10 μ l por vidrio del reactivo FluorSafe™ (N° cat.: 345789, Calbiochem, EUA), luego de 30 min de incubación a TA, las muestras se observaron por microscopía confocal, o de epifluorescencia.

4.21 Detección de proteínas mediante ensayos de Western blot

Los ensayos de Western blot, se realizaron a partir de células cultivadas en placas de 12 pocillos e infectadas a una multiplicidad de infección de un valor de 1. Para esto, se incubó cada *stock* de vector viral a analizar, durante 1 h a 37°C, en un volumen

final de 500 µl con DMEM suplementado con 2% de SFB. Luego de la adsorción viral, se retiró el inóculo y se completó con 1 ml del mismo medio, incubando nuevamente durante 24 a 36 h, en estufa de cultivo a 37°C y 5% CO₂.

4.21.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

Al final de cada incubación, la monocapa se colectó utilizando buffer de muestra (Tris-HCl 100 mM pH=6.8, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,2% y DTT 50 mM), y se calentaron a 100°C durante 5 min., se centrifugó 2 min. a 10.000 x *g* en una microcentrífuga. Los geles utilizados son de poliacrilamida con SDS, es decir en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970), en general el porcentaje utilizado fue de 12,5%, y la corrida se realizó durante 60 minutos a 150 V constantes. Como referencia de tamaño molecular, en las corridas se utilizó el marcador de Fermentas "PageRuler Prestained Protein Ladder", N° cat.: SM0671.

4.21.2 Electrotransferencia sobre membrana de nitrocelulosa.

Una vez separadas por electroforesis, las bandas de proteínas se transfirieron a una membrana de de nitrocelulosa (Hybond ECL Nitrocellulose, N° cat.: RPN3032D, GE Healthcare, EUA), a 15V durante 45 min, utilizando procedimientos generales (Gallagher y col., 2008; Sambrook y col., 2001).

4.21.3 Detección de proteínas recombinantes sobre membrana de nitrocelulosa

Una vez finalizado el procedimiento de transferencia, la membrana de nitrocelulosa se coloreó con solución acuosa de Rojo Ponceau (1%), para evaluar la eficiencia del proceso. Se lavó con PBS 1X, e incubó durante 16 h a 4°C en solución de bloqueo, PBS-Tween 20 suplementado con leche descremada en polvo al 3%. (PBS-T/leche 3%). Posteriormente, se incubó el anticuerpo primario, preparado en solución de PBS-T/leche 3%, durante 2 h a TA. Seguido a la incubación con el anticuerpo primario, se lavó cada membrana 3 veces con PBS-T, e incubó con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti-conejo o anti-ratón, ver Tabla 2), durante 1 h a TA. Luego de esta última incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-T, y se realizó la detección de las bandas de proteínas marcadas mediante reactivos para quimioluminiscencia (Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, EUA, N° cat.: 32132), exponiendo sobre placas AGFA CP-BU New (AGFA, Bélgica). Los anticuerpos primarios, y diluciones utilizadas, se describen en la Tabla 2.

4.22 Análisis de la respuesta inmune humoral generada con el virus recombinante T0ZGFP

Para analizar la respuesta inmune generada con el virus recombinante control que expresa la beta-galactosidasa como gen heterólogo reportero, se realizaron experimentos utilizando grupos de 6 ratones Balb/c de 6 semanas de edad, las inmunizaciones se realizaron en las instalaciones del bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de Quilmes. Los animales se inmunizaron con dosis de 1×10^6 UFP/ml, y para realizar el estudio de la respuesta humoral lograda con el mismo, se administró el vector viral T0ZGFP, por cuatro vías diferentes: subcutánea (T0ZGFP s.c.); intraperitoneal (T0ZGFP i.p.); intragástrica (T0ZGFP i.g.), y oral (T0ZGFP oral). Los grupos recibieron dos dosis de virus recombinante T0ZGFP, aplicando el refuerzo a los 27 días del inicio del régimen de inmunizaciones. Para la administración del vector viral por la vía intragástrica, se utilizaron agujas de teflón flexible con punta de silicona (Cadence Inc., N° cat.: 9920), y cada ratón se inmunizó, previa neutralización del pH estomacal administrando 40 μ l de bicarbonato al 5% en PBS estéril. En el caso de la inoculación oral, el volumen de suspensión de vector se incluyó en pellets de gelatina sin sabor, luego de 4 horas sin alimentar los animales de dicho grupo. Las muestras de sangre se tomaron en los días 0, 7, 14, 21, 35 y 41, luego de comenzar el experimento.

4.22.1 Análisis de la respuesta humoral anti- β -galactosidasa

La variación del nivel de anticuerpos específicos para β -galactosidasa en el suero de los animales, se analizó mediante un ensayo de ELISA, desarrollado en el Laboratorio de Virología e Inmunología de la UNQ, determinando con esta técnica la respuesta generada en cada grupo.

4.22.1.1 ELISA para medición de anticuerpos específicos totales anti- β -gal

Para llevar a cabo la determinación de anticuerpos anti- β -gal, se utilizaron placas para ELISA de 96 pocillos, Maxisorp™ (N° cat.: 3855, Thermo Scientific, EUA), éstas placas en un primer paso se sensibilizaron con proteína recombinante β -galactosidasa (Sigma-Aldrich, N° cat.: 48275) en solución buffer de bicarbonato, realizando una incubación a 4°C durante 12 h. Al día siguiente, se realiza la incubación con las diluciones 1/100 de los sueros a analizar, a 37°C durante 1 h. Posteriormente, cada placa se incubó en las mismas condiciones, con una suspensión de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Dako, Dinamarca. N° cat.: P 0260). Cada ensayo se

reveló con una solución de OPD (o-fenilendiamina) como cromógeno y 30% v/v de H₂O₂ como sustrato en buffer citrato pH=5,5. Entre cada incubación, las placas se lavaron tres veces con solución de 0,2% de Tween 20 en PBS 1X. En el último paso, con el OPD, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N y se mide la densidad óptica (DO) a 490 nm. Para la puesta a punto del sistema de detección, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-β-galactosidasa (Sigma-Aldrich, N° cat.: B 0271).

El cálculo de la respuesta de cada muestra se realizó por un promedio de los valores obtenidos a la DO_{490 nm} para cada individuo inmunizado y por duplicado, con los pocillos del control negativo se estimó un valor de ruido el cual se restó a los valores de DO_{490 nm} de las muestras. Los resultados se analizaron estadísticamente y representaron gráficamente.

4.23 Análisis de la respuesta inmune generada con el vector HSV_s[VP4]

Para analizar la respuesta inmune específica generada con el vector que expresa VP4 de RV cepa Wa, se utilizaron grupos de 4 ratones Balb/c de 6 semanas de edad, las inmunizaciones se realizaron en las instalaciones del bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de Quilmes. Los tres grupos de animales empleados, se inmunizaron con diferentes inmunógenos, tal como se muestra en la Tabla 3, la vía utilizada en las aplicaciones fue la intramuscular. El grupo utilizado como control negativo fue inmunizado con el vector amplicón HSV_s[EGFP], como control positivo se utilizó el suero de ratones inmunizados con dos dosis de RV completo (cepa Wa) aplicado por vía i.m. con adyuvante de Freund. El plan de inmunización fue de dos dosis, aplicando el refuerzo a los 21 días post vacunación (dpv). El muestreo de los sueros se realizó a los 21 y 42 días posteriores al inicio del protocolo de inmunización.

Grupos	Primera dosis (día 0)	Segunda dosis (día 21)	Dosis
1	HSV _s [VP4]	HSV _s [VP4]	10 ⁶ UT / 10 ⁶ UT
2	HSV _s [EGFP]	HSV _s [EGFP]	10 ⁶ UT / 10 ⁶ UT
3	RV Wa	RV Wa	20 µg / 20 µg

Tabla 3. Dosis de vectores utilizados en los experimentos con los vectores amplicón H_s[VP4] y H_s[EGFP]. En esta tabla se detallan las dosis administradas a los dos grupos, el día de vacunación (día 0) y el correspondiente refuerzo (día 21).

4.23.1 Análisis de la respuesta humoral anti-VP4

La presencia de anticuerpos específicos para VP4 en el suero de los animales, se analizó mediante un ensayo de ELISA, desarrollado en el Laboratorio de Virología e Inmunología de la UNQ, con el cual se determinó la respuesta generada en cada grupo.

4.23.1.1 ELISA para medición de anticuerpos específicos anti-VP4 de rotavirus Wa

Para la detección de anticuerpos específicos anti-VP4, se utilizaron placas para ELISA de 96 pocillos, Maxisorp™ (N° cat.: 3855, Thermo Scientific, EUA), éstas placas en un primer paso se sensibilizaron con una suspensión de RV Wa en solución buffer de bicarbonato, por incubación a 4°C durante 12 h aproximadamente. Al día siguiente, se realizó la incubación con las diluciones 1/100 de los sueros a analizar, a 37°C durante 1 h. Posteriormente, cada placa se incubó en las mismas condiciones, con una suspensión de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Dako, Dinamarca. N° cat.: P 0260). El revelado se realizó con una solución de OPD (o-fenilendiamina) como cromógeno y 30% v/v de H₂O₂ como sustrato en buffer citrato pH=5,5. Entre cada incubación, las placas se lavaron tres veces con solución de 0,2% de Tween 20 en PBS 1X. En el último paso, con el OPD, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N y se midió la densidad óptica (DO) a 490 nm.

El cálculo del título de cada muestra se realizó por un promedio de los valores obtenidos a DO_{490 nm}, en todos los pocillos del control negativo, se calculó el desvío estándar correspondiente y se sumó al valor promedio el valor de tres desvíos estándar. Este valor se tomó como límite de detección o valor de corte. El título de los anticuerpos se definió como la inversa de la mayor dilución que superó el valor de corte resultante.

4.24 Análisis de la respuesta inmune generada con el vector HSV_s[VP6C] y vacuna ADN [pCI-VP6C]

Los experimentos *in vivo*, se realizaron utilizando grupos de 5 ratones Balb/c. Los animales se alojaron en el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de Quilmes. Los grupos de animales, de 6 semanas de edad, se inmunizaron con diferentes combinaciones de inmunógenos, tal como se indica en la Tabla 4. Los grupos utilizados como controles negativos fueron los inmunizados con el vector amplicón HSV_s[EGFP] y la vacuna a ADN [pCI-neo]. Las vacunas a ADN se prepararon

junto con el adyuvante Montanide ISA50 v2 (Seppic® S.A., Paris, Francia), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las inoculaciones se realizaron por vía subcutánea, tomando muestras de sangre a los tiempos 0, 28, 42 y 56 días, momento en el que se finalizó el experimento.

Grupos	Primera dosis (día 0)	Segunda dosis (día 35)	Tercera dosis (día 42)
1	[pCI-VP6C]	HSV _s [VP6C]	HSV _s [VP6C]
2	[pCI/HA-VP6C]	[pCI/HA-VP6C]	[pCI/HA-VP6C]
3	HSV _s [VP6C]	[pCI/HA-VP6C]	[pCI/HA-VP6C]
4	HSV _s [VP6C]	HSV _s [VP6C]	HSV _s [VP6C]
5	[pCI-neo]	[pCI-neo]	[pCI-neo]
6	HSV _s [EGFP]	HSV _s [EGFP]	HSV _s [EGFP]

Tabla 4. Dosis y combinación de inmunógenos utilizados en los experimentos realizados con el vector amplicón HSV_s[VP6C] y la vacuna a ADN [pCI/HA-VP6C]. En esta tabla se detallan las dosis administradas a los diferentes grupos, tanto para los grupos que recibieron un tratamiento homólogo como heterólogo de inmunógenos. Las dosis de vectores amplicón HSV_s[VP6C] y HSV_s[EGFP] fue de 1×10^6 UT y las correspondientes a la vacuna a ADN es de 30 μ g por dosis.

4.24.1 Análisis de la respuesta humoral anti-VP6C

La presencia de anticuerpos específicos para VP6C en el suero de los animales, se analizó mediante un ensayo de ELISA de captura, desarrollado en el Laboratorio de Virología e Inmunología de la UNQ, con el cual se determinó, y pudo comparar la respuesta generada en cada grupo.

4.24.1.1 ELISA de captura para medición de anticuerpos anti-VP6C de RV grupo C.

La determinación de anticuerpos se realizó utilizando placas para ELISA Maxisorp™ (N° cat.: 3855, Thermo Scientific, EUA), las cuales se sensibilizaron con suero de rata anti-VP6C de RV de la cepa Cowden en solución buffer de carbonato-bicarbonato, pH=9,0 (Na₂CO₃ 10 mM, NaHCO₃ 90 mM, NaCl 140 mM). La placa se incubó 1 h a TA, lavó tres veces con PBS-T (PBS, 0,5 M NaCl, 0,2% v/v Tween 20), y luego se adicionó un lisado bacteriano conteniendo la proteína recombinante VP6C en una dilución al medio de solución dilución (SD: PBS 0,5 M NaCl; 0,2% v/v Tween 20 y 1% de caseína, pH 7,2). Luego de incubar 18 h a 4°C, se lavó tres veces con PBS-T, y se

adicionaron los sueros de ratones inmunizados, en una dilución 1/100 preparada con SD, siguiendo diluciones seriadas hasta 1/25.600, se incubó nuevamente a una temperatura de 37°C durante 1 h, se lava tres veces con PBS-T, y se incubó 1 h a 37°C con una dilución 1/2000 de suero policlonal anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Dako, Dinamarca. N° cat.: P 0260), preparado en solución de dilución. Se realiza nuevamente el lavado con PBS-T, e inmediatamente el ensayo se reveló con una solución de OPD (o-fenilendiamina) como cromógeno y 30% v/v de H₂O₂ como sustrato en buffer citrato pH=5,5. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N y se mide la DO a 490 nm. Los valores obtenidos de absorbancia, se corrigieron frente a los de los ensayos en blanco de cada placa. Como control negativo de reacción, se utilizó un pool de sueros positivos para RV del grupo A, y como control positivo un pool de muestras positivas para RV del grupo C.

El cálculo del título de cada muestra se realizó por un promedio de los valores obtenidos en todos los pocillos del control negativo, se calculó el desvío estándar correspondiente y se sumó al valor promedio dos desvíos estándar. Este valor se tomó como límite de detección o valor de corte. El título de los anticuerpos se definió como la inversa de la mayor dilución que superó el valor de corte resultante.

4.25 Análisis de la respuesta inmune generada con el vector HSV_S[MSP5] y la proteína recombinante MSP5.

Para realizar los experimentos *in vivo*, se utilizaron grupos de 6 ratones Balb/c en cada uno, los animales se obtuvieron del Bioterio del Laboratorio Pablo Cassará, durante los experimentos se mantuvieron en instalaciones de nivel de seguridad 2 *ad hoc*, con ventilación y temperatura controlada (Touch Slim Plus AHU, N° cat.: BOX110SS, Tecniplast). Los animales se inmunizaron aplicando diferentes combinaciones de los inmunógenos propuestos, siguiendo el esquema resumido en la Tabla 5. El grupo inmunizado con el vector HSV_S[EGFP] se utilizó como control negativo, la proteína recombinante se preparó con adyuvante Montanide ISA50 v2 (Seppic® S.A., Paris, Francia), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los refuerzos (2^{da} dosis) se administraron 35 días luego de la primera dosis, y los ratones se sacrificaron a las 23 semanas luego del refuerzo. Las muestras de sangre se colectaron 7 días luego de cada dosis y a diferentes tiempos durante un período de 4 meses, los sueros correspondientes se almacenaron a -20°C. Los animales se mantuvieron de acuerdo a

políticas institucionales indicadas por el Comité de Ética del Instituto Dr. Cesar Milstein-CONICET.

Grupos	Primera dosis (día 0)	Segunda dosis (día 35)	Adyuvante	Dosis
1	rMSP5	rMSP5	ISA50	10 µg/10 µg
2	rMSP5	HSV _s [MSP5]	ISA50/(-)	10 µg/10 ⁶ UT
3	HSV _s [MSP5]	rMSP5	(-)/ISA50	10 ⁶ UT/10 µg
4	HSV _s [MSP5]	HSV _s [MSP5]	(-)/(-)	10 ⁶ /10 ⁶ UT
5	HSV _s [EGFP]	HSV _s [EGFP]	(-)/(-)	10 ⁶ /10 ⁶ UT

Tabla 5. Dosis y combinación de inmunógenos utilizados en los experimentos realizados con el vector amplicón HSV_s[MSP5] y la proteína rMSP5. En esta tabla se detallan las dosis administradas a los diferentes grupos, tanto para los grupos que recibieron un tratamiento homólogo como heterólogo de inmunógenos.

Previamente a las inmunizaciones, se tomó una muestra de suero para ser analizada posteriormente por medio de ELISA. Los ratones fueron inmunizados, por la vía i.m. en ambos casos.

4.25.1 Análisis de la respuesta inmune humoral anti-MSP5

La respuesta inmune humoral se evaluó midiendo IgG total por medio de ELISA indirecto estándar, utilizando la proteína recombinante rMSP5, y por otro lado mediante ELISA de inhibición competitiva (cELISA), para un epítopo específico determinado en placas sensibilizadas mediante rMSP5-MBP. Estos ensayos se optimizaron en el Laboratorio de Inmunología de INTA-Rafaela.

4.25.1.1 ELISA para medición de anticuerpos anti-MSP5 de *A. marginale*.

Para este ensayo de ELISA, se sensibilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano MICROLON®600 (N° cat.: 655 061, Greiner BioOne, Frickenhausen, Alemania), con una dilución de la proteína recombinante 6xHis-MSP5, en solución buffer 0,05 M carbonato/bicarbonato pH=9,6. La concentración se ajusta de manera que en el ensayo genera la señal máxima de absorbancia, la dilución apropiada se determinó frente a un panel de sueros específicos. Luego de la incubación ON a 4°C, la placa se lavó 5 veces con PBS Tween-20 al 0,05% (PBS-T), y se adicionaron diluciones 1/100 de los sueros de ratones a analizar, preparadas en buffer PBS EDTA-EGTA 0,075M (pH=6,3)

suplementado con 10% de leche descremada, se incubó 1 h a 37°C. Se repitieron los 5 lavados con PBS-T, y se adicionan 50 µl a cada pocillo una dilución 1/1000 en PBS-T, del anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (N° cat.: 315-035-003, Jackson Laboratories, PA, EUA). Se lava nuevamente cada placa 5 veces con PBS-T, y finalmente se revela con ABTS/H₂O₂, durante 30 min., deteniendo la reacción con 50 µl de H₂SO₄ 2N, determinando posteriormente en lector de ELISA la DO a una longitud de onda de 405 nm.

4.25.1.2 ELISA de inhibición competitiva para medición de anticuerpos específicos para el epítipo anti-MSP5 de A. marginale.

El análisis de anticuerpos monoespecíficos, se realizó mediante el cELISA establecido en el Laboratorio de Inmunología de INTA-Rafaela. Este ensayo utiliza la proteína rMSP5-MBP como antígeno, y se realizó con modificaciones de la metodología previamente descrita (Knowles y col., 1996). Brevemente, rMSP5-MBP se diluyó de manera seriada en buffer de captura (0,05 M carbonato/bicarbonato, pH 9.6) y se incubó en placas de 96 pocillos de fondo plano MICROLON®600. La dilución apropiada de antígeno y monoclonal ANAF16C1, se determinó mediante titulación frente a un panel de sueros específicos. La suspensión de proteína rMSP5-MBP se realizó en PBS pH=7.2 conteniendo 20 mM de MgCl₂, se utilizó para cubrir pocillos individuales durante 1 hora a 37°C. Las placas sensibilizadas se bloquearon con 100 µl por pocillo de buffer de captura suplementado con 10% de leche descremada, durante 1 h a 28°C. Las placas bloqueadas se lavaron 5 veces con PBS-T (0.01 M PBS conteniendo 0.02% Tween 20). Los sueros de ratones se diluyeron 1:100 en PBS 0.075 M EDTA-EGTA (pH 6.3) suplementado con 10% de leche, y 100 µl de las muestras se adicionaron a cada pocillo, incubando durante 1 h a 28°C, luego se lavó cinco veces con PBS-T. En el siguiente paso, se adicionaron 0,2 µg de anticuerpo en un volumen de 100 µl por pocillo, del anticuerpo monoclonal ANAF16C1 conjugado a peroxidasa, e incubó durante 1 h a 28°C. Al finalizar la incubación se lavó la placa nuevamente 5 veces con PBS-T, y la detección de señal se reveló por la adición de 50 µl de solución de 0,04 M del sustrato ABTS [2,2'-azino-bis(ácido-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfónico)] y 3% H₂O₂, la reacción se detuvo luego de 30 min, mediante la adición de 50 µl de 2 N H₂SO₄, y la DO se determinó mediante lector de ELISA a 405 nm.

4.25.2 Análisis de la respuesta celular anti-MSP5

Para realizar el análisis de linfoproliferación, al final del plan de inmunización, se retiraron los bazos de los animales de cada grupo, y se procesaron para generar una suspensión de esplenocitos, los cuales se trataron individualmente. El cultivo se realizó en placas de cultivo de 96 pocillos (Greiner BioOne, Frickenhausen, Alemania, N° cat.: 655 180), utilizando 1×10^6 células por pocillo, en 100 μ l de medio de cultivo RPMI (N° cat.: 11875085, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), suplementado con SFB al 10% (SFB, N° cat.: 10091148, Life Technologies), estimulando durante 3 días, las células inmunocompetentes con rMSP5-H₆ (12,5 μ g/ml) o concanavalina A (ConA) (2,5 μ g/ml), e incubando en estufa de cultivo a 37°C y 5% de CO₂. La proliferación celular se midió por medio de contador de centelleo luego de 20 horas de adicionar 1 μ Ci de [metil-3H]-timidina. La respuesta proliferativa se calculó como el valor medio de pocillos triplicados y expresado como índice de estimulación (IE), el cual se calcula como cuentas por minuto (cpm) en la presencia del antígeno / cpm en ausencia del antígeno. El IE de cada grupo se expresó como la media aritmética \pm error estándar medio (SEM).

4.26 Análisis estadístico de datos

El análisis de datos y gráficos se realizaron utilizando los programas GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) o IBM SPSS Statistics software v17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). El análisis incluye la homogeneidad de varianzas por medio del test de Levene, y la distribución normal se analizó por el test Shapiro-Wilk. Las diferencias de los valores medios de cada grupo, se analizaron por medio del test de Tukey posterior al análisis de varianza. Los datos se expresan como el valor medio \pm SEM o SD. Para el caso de los ensayos en animales realizados con el vector amplicón VP4, se aplicó la prueba T de muestras independientes.

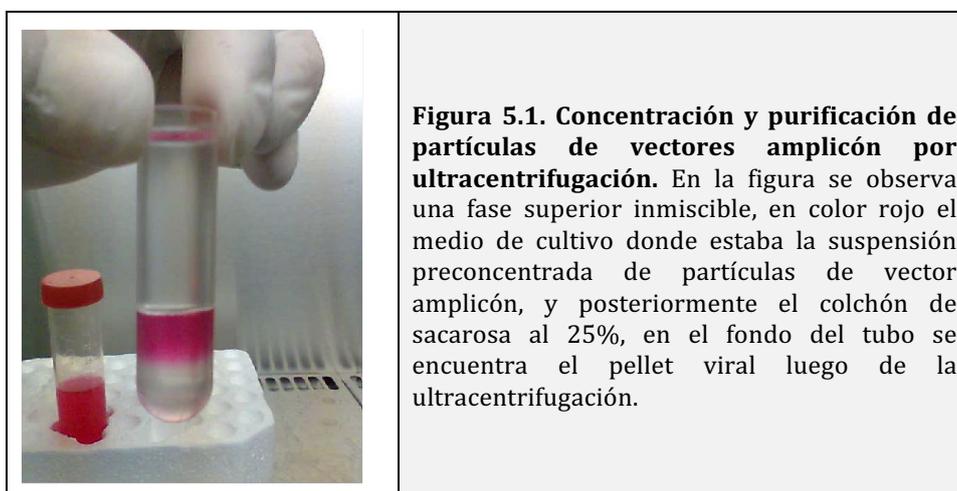
5 Resultados

Los resultados de esta tesis incluyen la construcción de vectores virales bicistrónicos, tricistrónicos y tipo *display*, y la producción de stocks de vectores de diferentes sistemas, incluyendo vectores amplicón y virus recombinantes. Por otro lado, incluye la evaluación de la expresión de genes heterólogos, y por último la descripción de la respuesta inmune desarrollada en animales inoculados con algunos de los vectores seleccionados para tal fin.

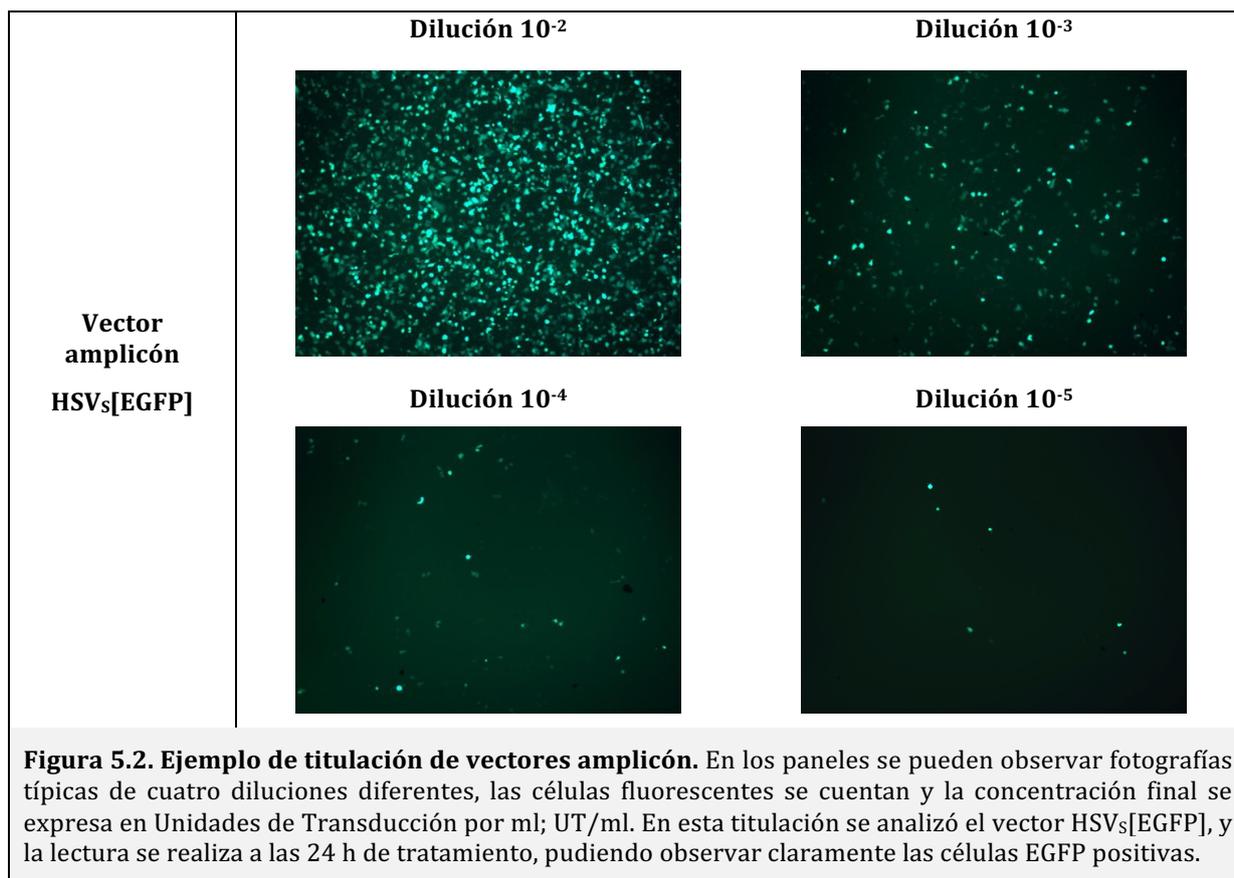
5.1 Purificación de stocks de vectores virales

5.1.1 Producción, concentración y titulación de Vectores Amplicón.

De manera general, las partículas de vectores amplicón se produjeron y concentraron por un colchón de sacarosa, según lo descrito en la Sección 4.16. Las partículas concentradas y purificadas se resuspendieron finalmente en PBS estéril, para su titulación, análisis de expresión de genes heterólogos, e inmunizaciones. En la Figura 5.1, se puede observar el aspecto de un tubo de ultracentrífuga, donde se realizó la purificación de partículas virales pre-concentradas, las cuales se obtuvieron a partir de frascos de cultivo de células Vero 2-2 (Sección 4.16.1). Luego se procedió a la titulación, análisis de expresión de los genes heterólogos o formulación para los planes de inmunización, dependiendo del vector utilizado.



La determinación del título de los vectores amplicón se realizó por medio del gen reportero EGFP. En los paneles se de la Figura 5.2, se observa un ejemplo típico de cómo se determinó el título de los vectores amplicón (Sección 4.16.2.3). Para esta figura, se registraron fotos de diferentes campos, en los pocillos correspondientes a diluciones de 10^{-4} a 10^{-7} , las cuales se analizan en microscopio de fluorescencia invertido, permitiendo el conteo de los focos fluorescentes en una dilución adecuada del stock a cuantificar.



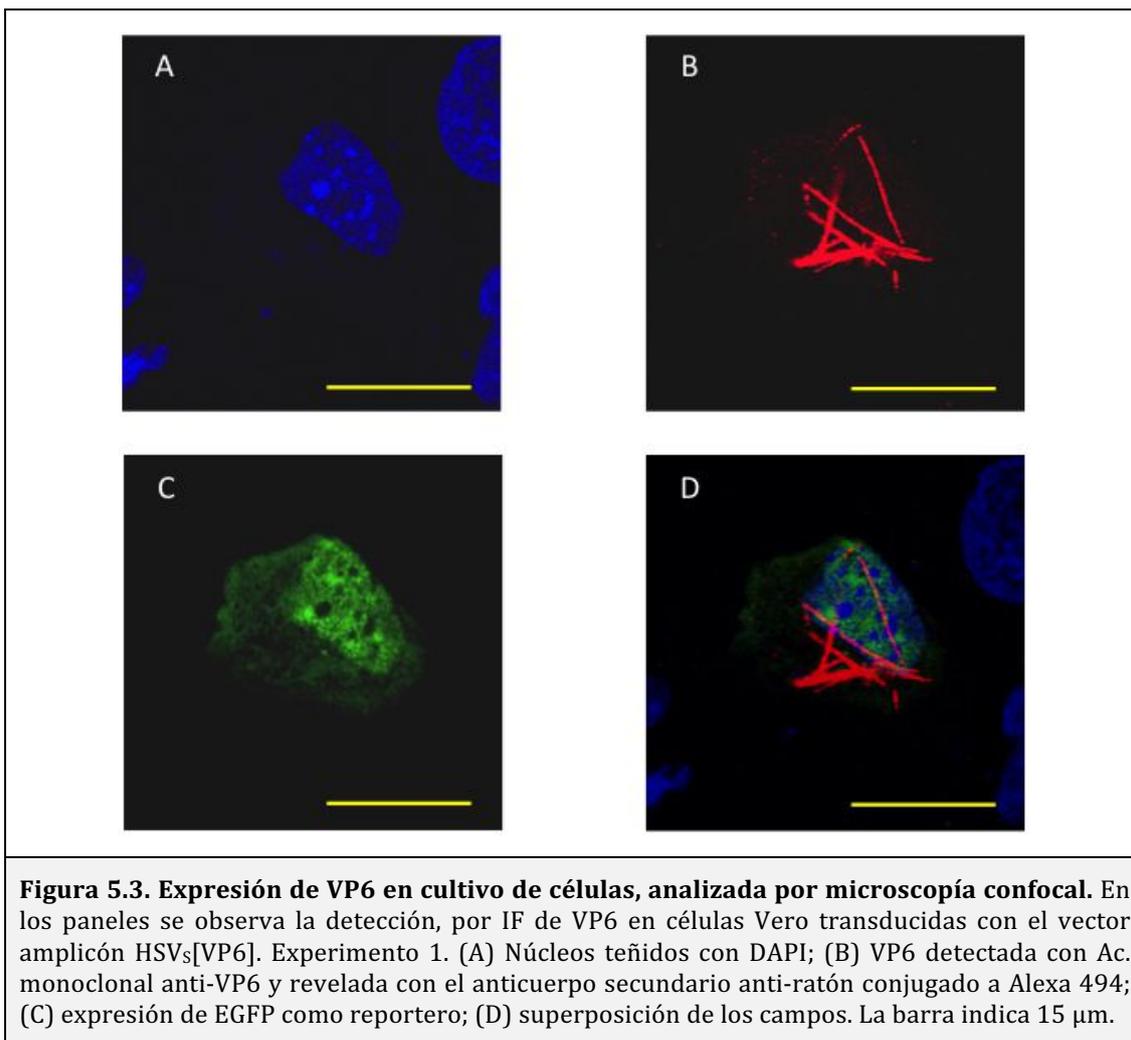
5.2 Análisis de expresión heteróloga de Vectores Amplicón en células eucariotas

Una vez generado y titulado los stocks de vectores amplicón correspondientes, se procedió a detectar la expresión de los genes heterólogos que en ellos están codificados, demostrando también la capacidad de este sistema de ingresar a una célula, y expresar diferentes antígenos *in situ*.

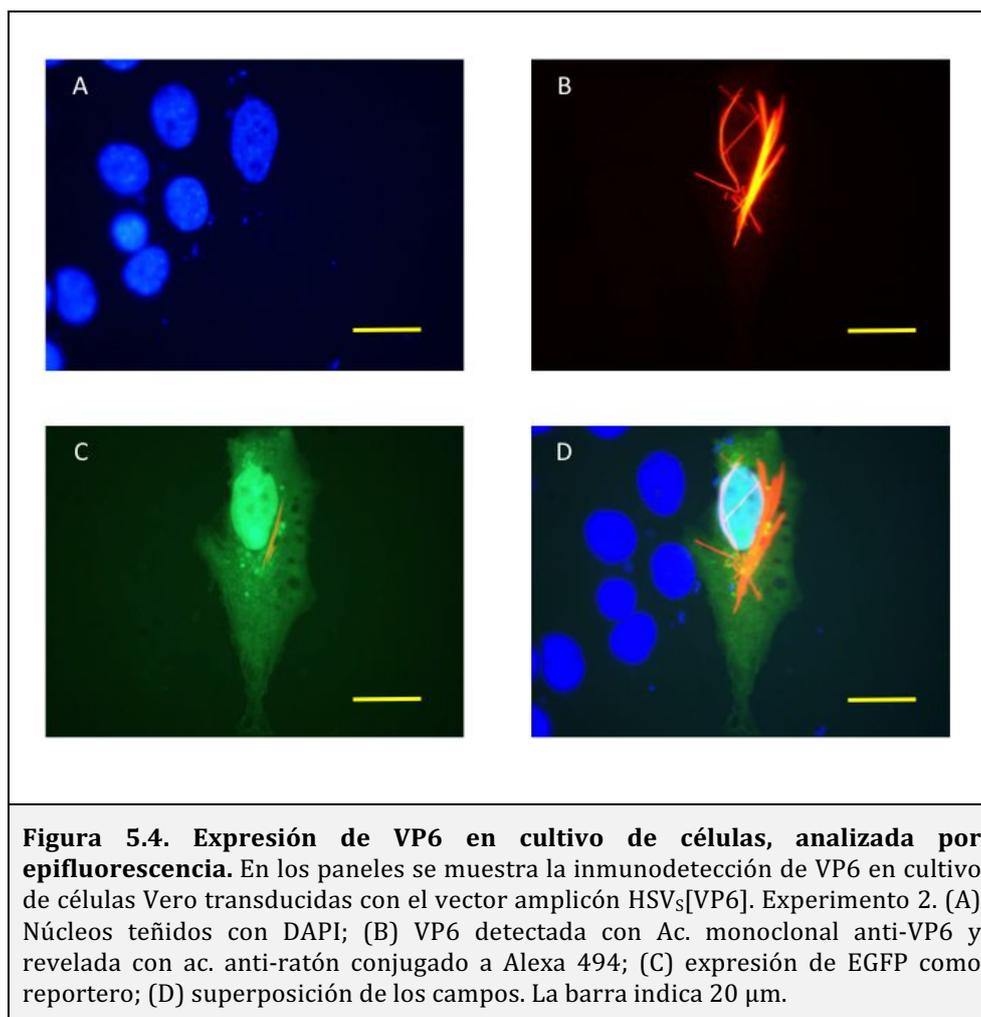
5.2.1 Expresión de Wa-VP6

5.2.1.1 Detección de VP6 por medio de inmunofluorescencia

Con el fin de evidenciar la expresión de VP6, monocapas de células Vero 2-2 se transdujeron con los vectores amplicón que expresan VP6 de RV cepa Wa. Luego de 24 horas se fijaron las células, y la expresión de las proteínas recombinantes se detectó mediante IF con anticuerpos específicos para los diferentes antígenos expresados.



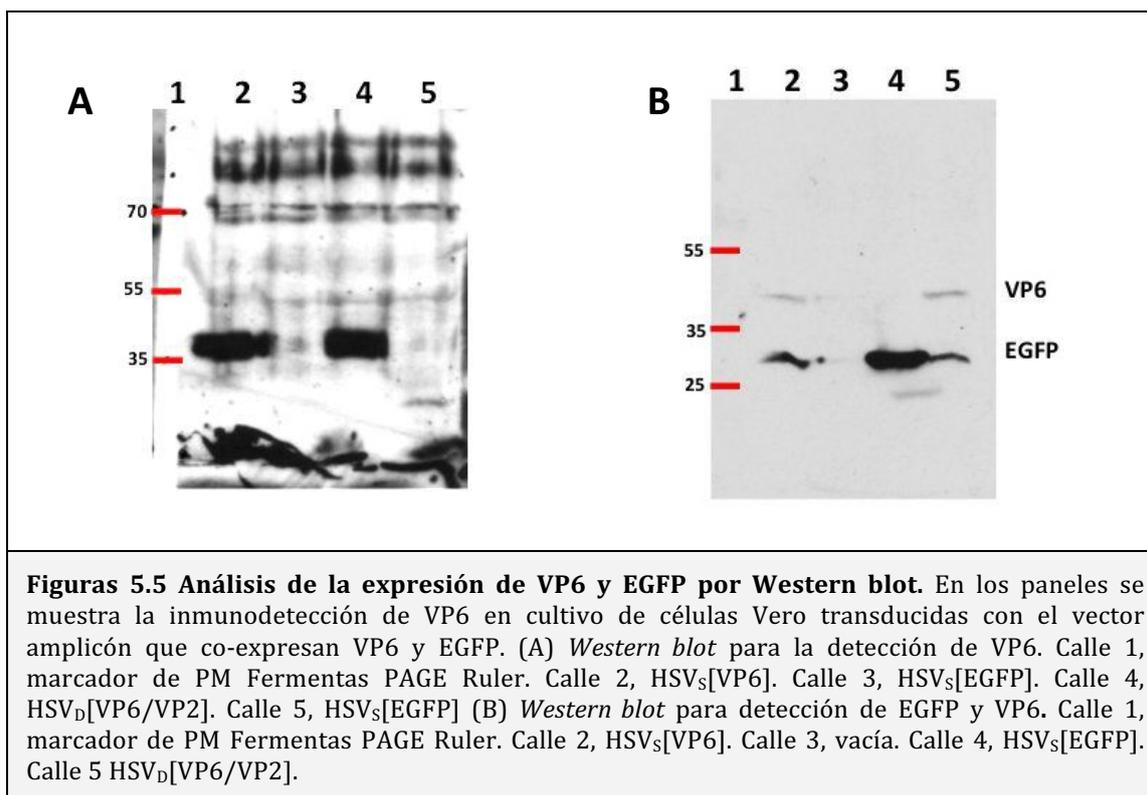
Los paneles de las Figuras 5.3 y 5.4, corresponden a dos experimentos en los que se utilizó el mismo vector amplicón HSV_s[VP6], para transducir monocapas de células Vero a una multiplicidad de infección de 0,1. Luego de realizar una reacción de inmunofluorescencia específica, se analizó cada preparado por medio de microscopía confocal (Fig. 5.3), y por epifluorescencia (Fig. 5.4). En ambos casos, se pudo observar dentro de las células transducidas la formación de las típicas estructuras filamentosas que forma la proteína VP6, análogamente a lo descrito en células infectadas por RV al silenciar transcripcionalmente NSP4 (López y col., 2005), y a lo observado con la proteína recombinante en diferentes sistemas de expresión (Estes y col., 1987; Mathieu y col., 2001; Rodríguez-Galván y col., 2008). Por microscopía confocal se pudo observar una distribución de dichas estructuras en todo el citoplasma incluso rodeando el núcleo de la célula.



5.2.1.2 Detección de VP6 por medio de Western blot

Adicionalmente, lisados de células transducidas, fueron analizados por Western blot, con anticuerpos específicos para los antígenos heterólogos expresados.

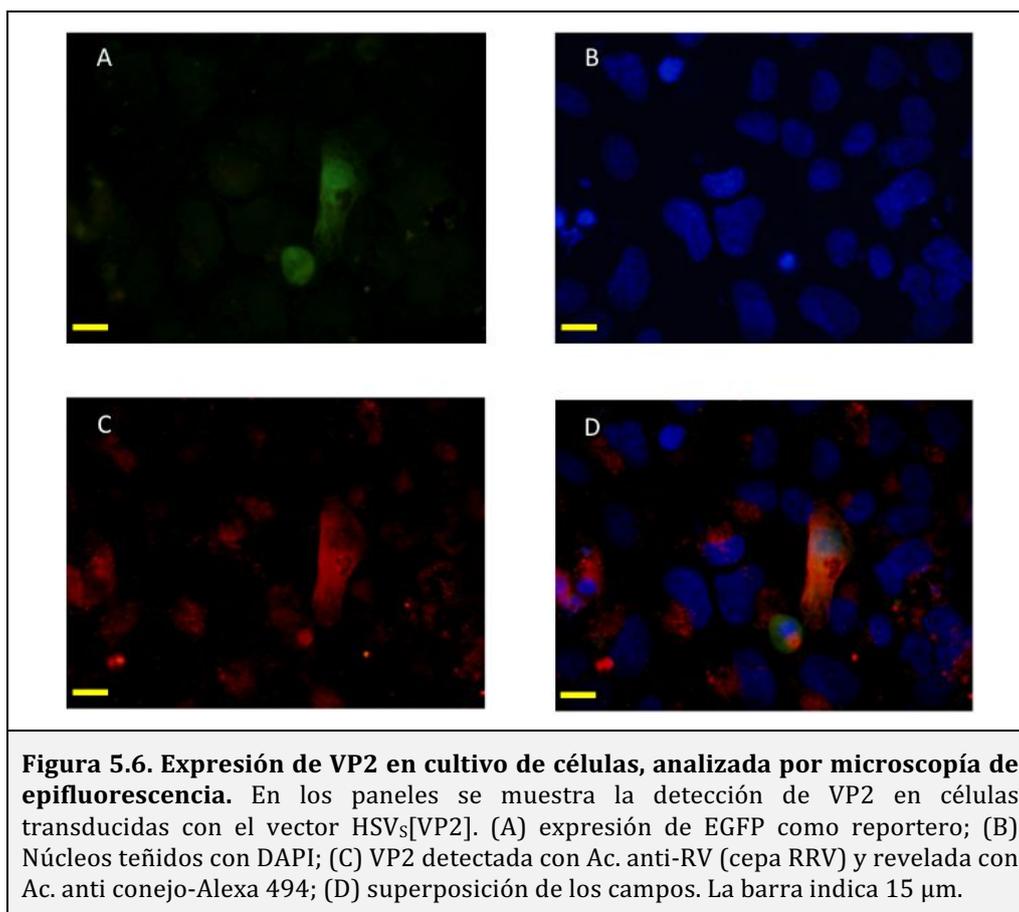
La detección de VP6 se realizó con un anticuerpo policlonal anti-RV (cepa RRV). Se demuestra que la proteína recombinante tiene el tamaño molecular esperado de aproximadamente 42 kDa. Simultáneamente se realizó un experimento para la detección de GFP y VP6, pudiendo detectar ambas proteínas y demostrando que GFP presenta el tamaño esperado (Figuras 5.5 A y B, respectivamente).



5.2.2 Expresión de Wa-VP2

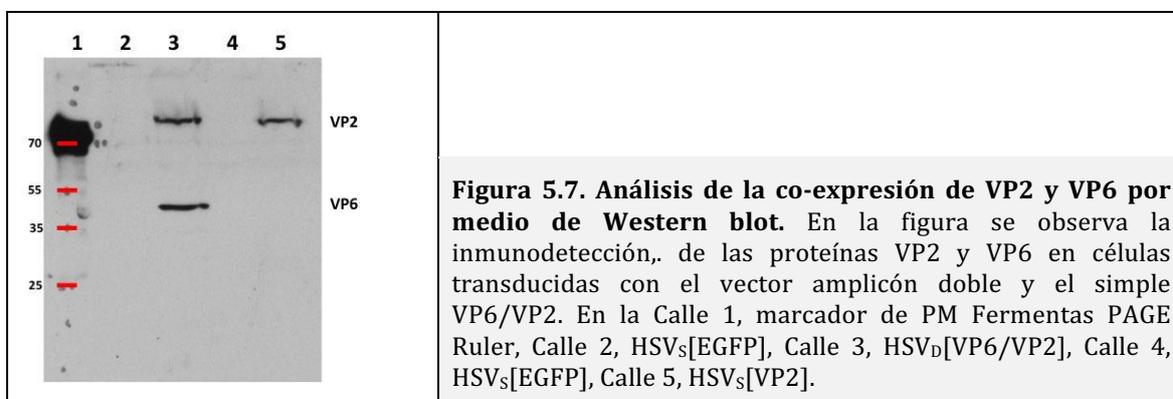
5.2.2.1 Detección de VP2 por medio de inmunofluorescencia

La expresión de VP2, se detectó por medio de inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal anti-RRV, demostrando la expresión y la detección cruzada con un suero policlonal obtenido en conejos inmunizados con otra cepa de rotavirus (RRV). La tinción específica se muestra en los paneles de la Figura 5.6.



5.2.2.2 Detección de VP2 por medio de Western blot

La detección de VP2 se realizó con un anticuerpo policlonal anti-RV (cepa RF). Mediante esta metodología, se demostró que la proteína recombinante expresada por HSV_S[VP2] presentó el tamaño molecular esperado de aproximadamente 102 kDa. Simultáneamente se detectaron VP2 y VP6 expresadas con el vector HSV_D[VP6/VP2]. Ambas proteínas se expresaron con el vector doble presentando los tamaños

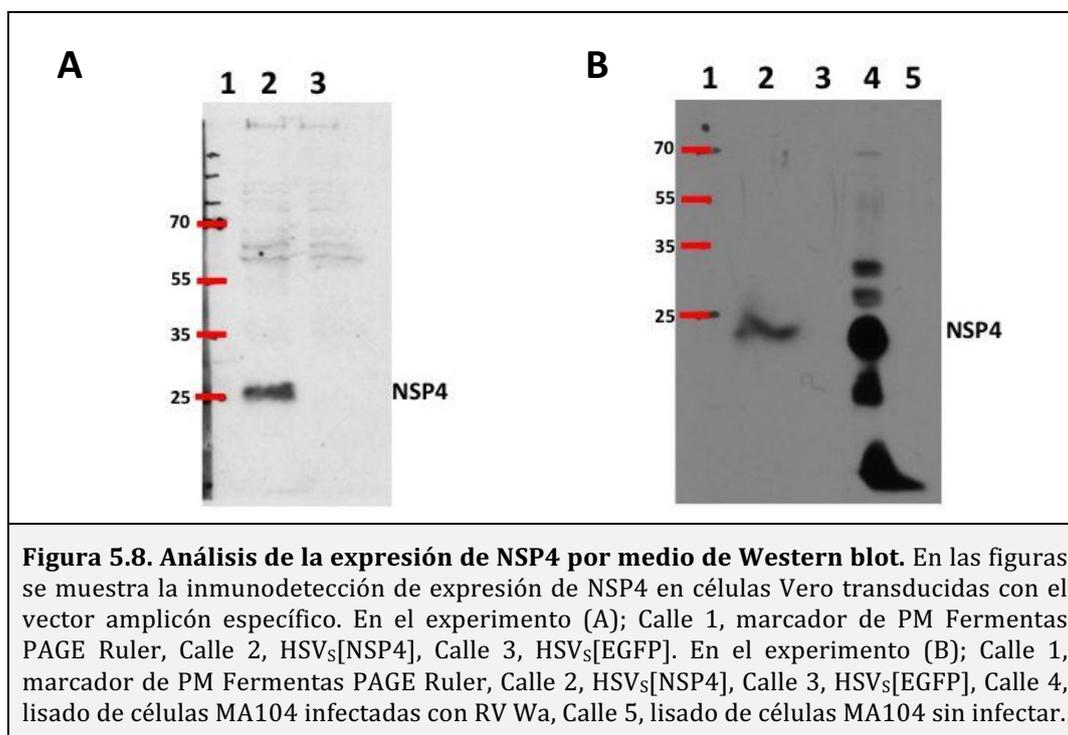


moleculares esperados (Figura 5.7).

5.2.3 Expresión de Wa-NSP4

5.2.3.1 Detección de NSP4 mediante Western blot

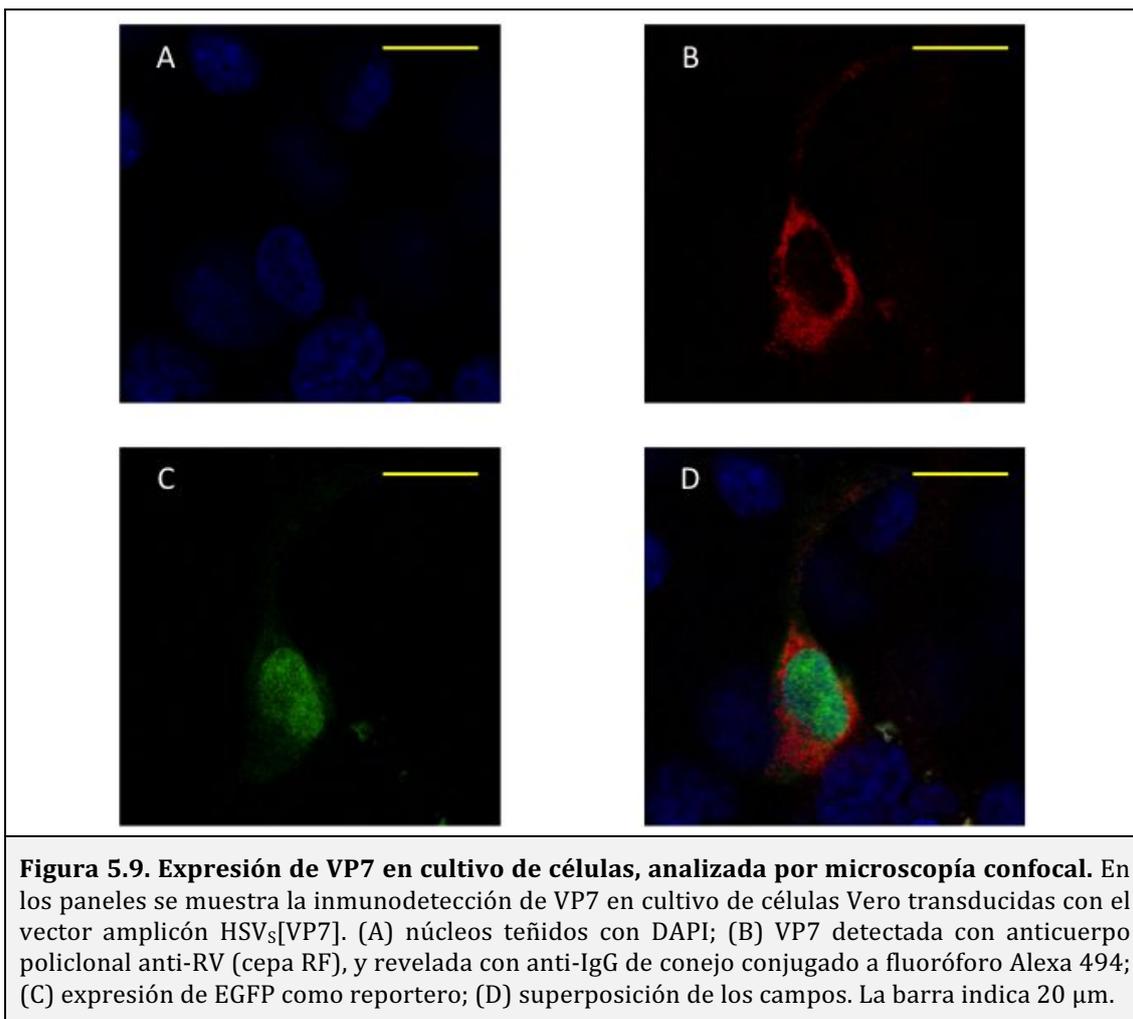
En los ensayos de expresión de NSP4, se muestran dos experimentos. En el primero la detección de NSP4 se realizó con el anticuerpo policlonal anti-NSP4 (cepa RRV), donde se observó que la proteína recombinante de un tamaño molecular esperado de aproximadamente 20 kDa (Figura 5.8.A). En el segundo experimento, se adicionó como control un lisado de células MA104 infectadas con RV cepa Wa, detectándose múltiples formas de NSP4, correspondientes a glicosilación doble, simple y sin glicosilación (aproximadamente 28, 24 y 20 kDa) indicando el procesamiento típico de esta proteína cuando se realiza en presencia de las demás proteínas de RV. Por otro lado, aproximadamente a los 16 kDa se aprecia el péptido producto del clivado de NSP4, en forma de dímero. En cambio, en el lisado de células transducidas con el vector amplicón HSV_s[NSP4] se observó una única banda correspondiente a la proteína recombinante de un tamaño aproximado de 24 kDa, indicando una glicosilación simple (Figura 5.8.B).



5.2.4 Expresión de Wa-VP7

5.2.4.1 Detección de Wa-VP7 por medio de inmunofluorescencia

La expresión de VP7 se analizó por IF 24h post-transducción de células Vero, utilizando el vector amplicón HSV_s[VP7] (Figura 5.9).

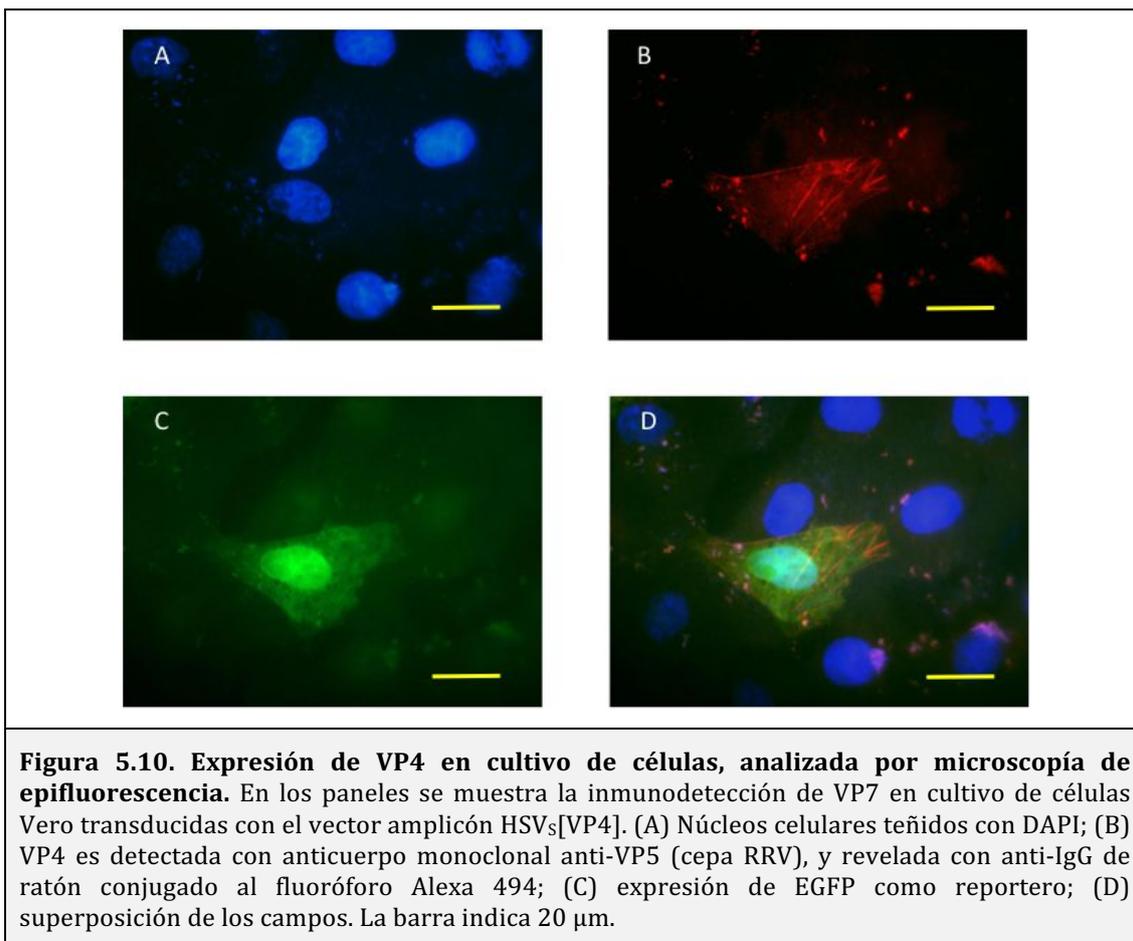


5.2.5 Expresión de Wa-VP4

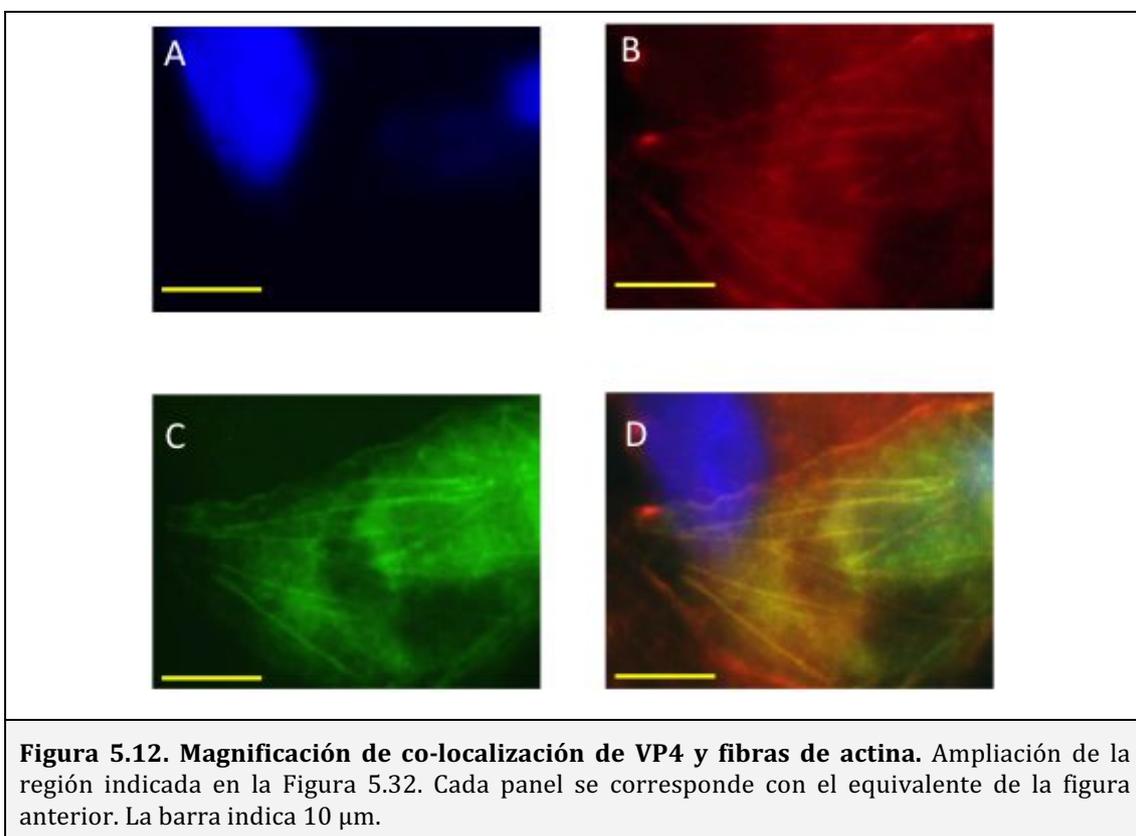
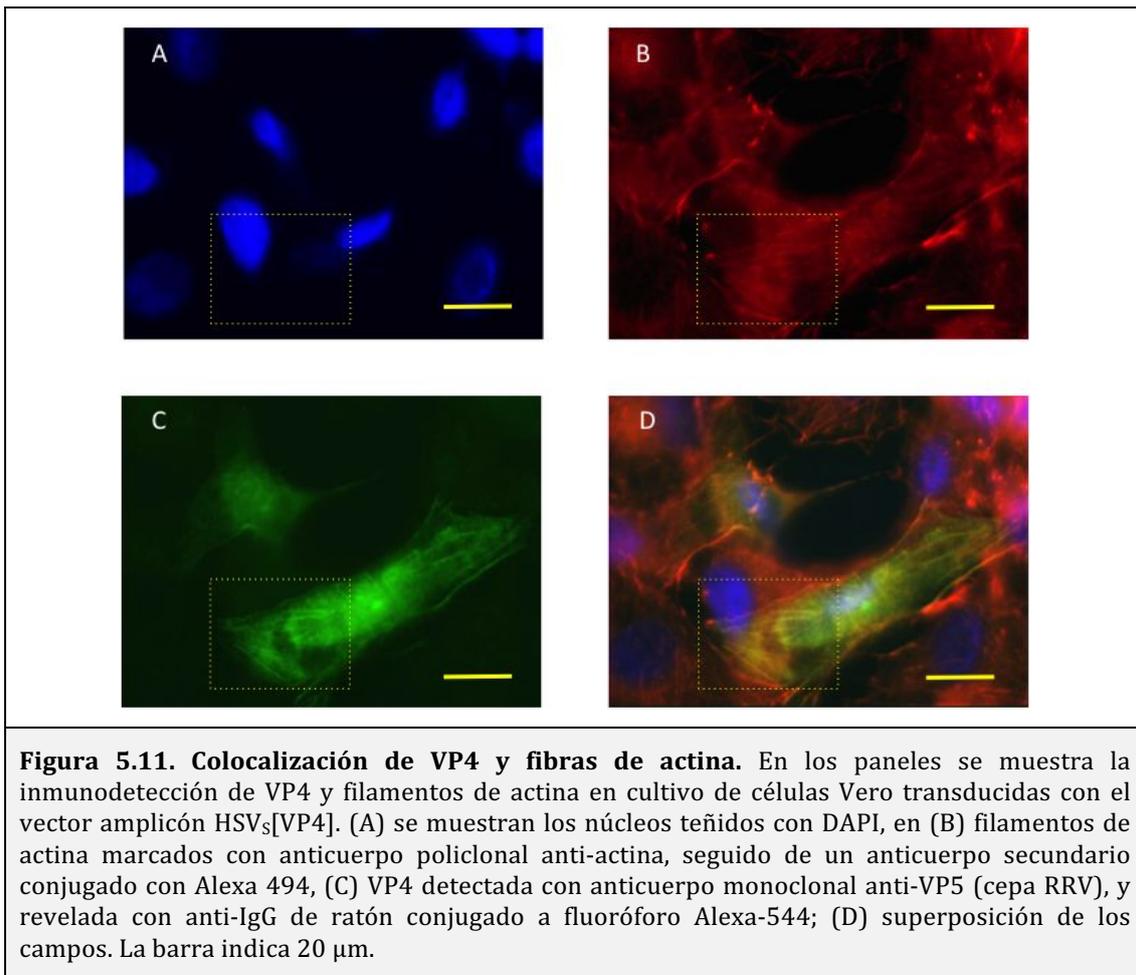
5.2.5.1 Detección VP4 por medio de inmunofluorescencia

La expresión de VP4 se analizó por IF 24h post-transducción de células Vero, con los vectores amplicón HSV_S[VP4] y HSV_D[VP7/VP4], en experimentos independientes.

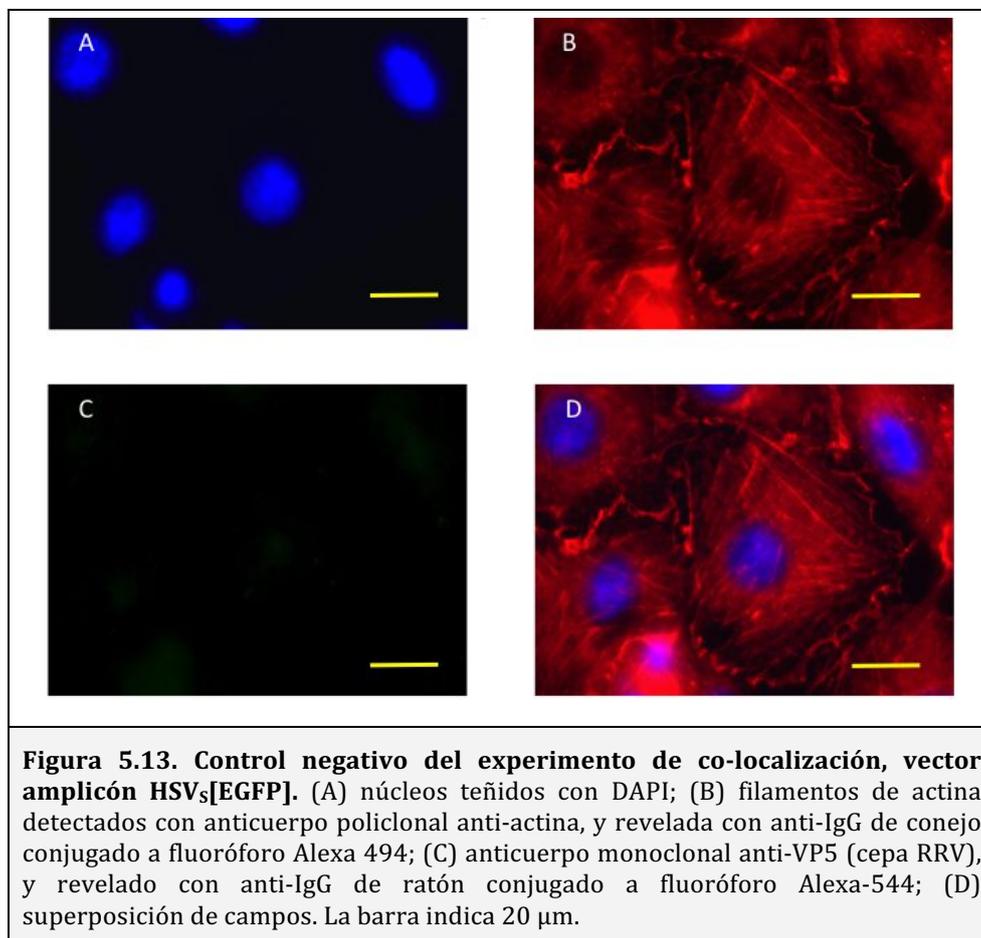
La IF se realizó en condiciones diferentes para poder teñir los filamentos de actina. En una de ellas, la fluorescencia del reportero EGFP no es afectada en el proceso de fijación (Figura 5.10), y en la otra, la fluorescencia de EGFP es inhibida por la fijación con acetona al 90%. De este modo se posibilitó la marcación de los filamentos de actina en la célula, utilizando un anticuerpo específico (Tabla 2), seguido de un anticuerpo secundario conjugado con FITC (Figura 5.11).



Para apreciar mejor la interacción de VP4 con filamentos de actina, se magnificó una región (indicada con un recuadro amarillo en la Figura 5.11), pudiéndose observar que las propiedades de la proteína VP4 recombinante (marcada en rojo), conserva la propiedad de la VP4 nativa, de interactuar con los filamentos de actina (marcada en verde), Figura 5.12.



Para comprobar que la señal del anticuerpo anti-VP5 (VP5* es una de las subunidades en que se cliva VP4) no tiene reactividad con los filamentos de actina, se realizó el mismo experimento con células no transducidas por el vector amplicón HSV_s[VP4] (Figura 5.13).



5.2.6 Expresión de VP6 de Rotavirus tipo C

5.2.6.1 Detección de VP6C por medio de inmunofluorescencia

Para evaluar la expresión de VP6C, se realizó la detección por inmunofluorescencia directa, en monocapas de células CV-1. El ensayo se realizó 24 h post-transfección con los plásmidos [pCI-neo/HA-VP6C] y [pCI-neo/VP6C-HA], los cuales tienen clonado VP6C en sus dos variantes (antecedida o precedida del epítopo HA). Finalmente para los experimentos de inmunización se utilizó la versión con el epítopo HA en el extremo N-terminal. En los paneles de la Figura 5.14, se puede observar la marcación de alfa-tubulina con un anticuerpo monoclonal anti-tubulina conjugado con Alexa 488® (verde), y la expresión de VP6C con el anticuerpo monoclonal anti-HA, revelados con anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa 594®. Los

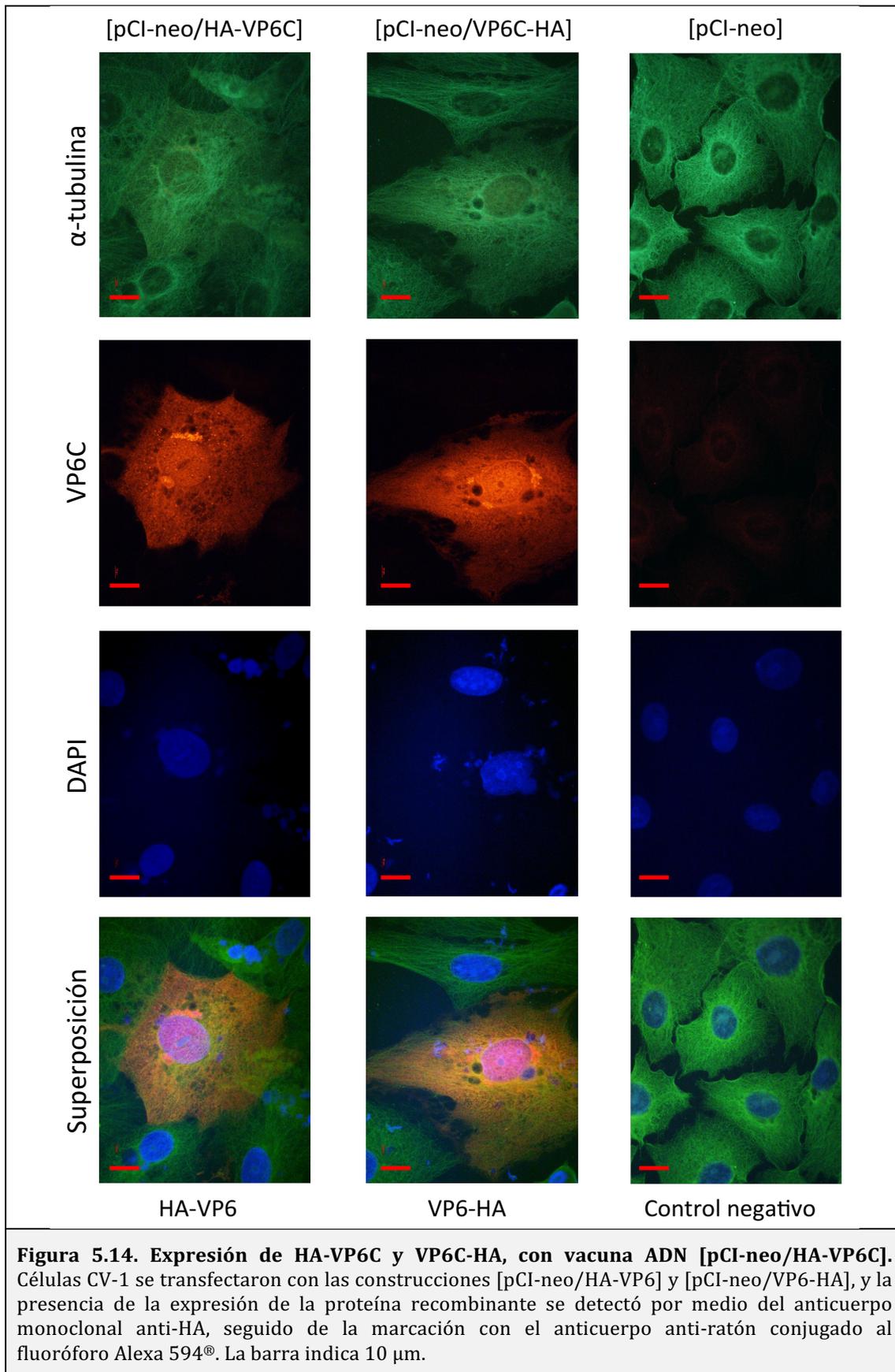
núcleos se tiñeron con DAPI. De este modo se pudo confirmar la expresión de la proteína recombinante.

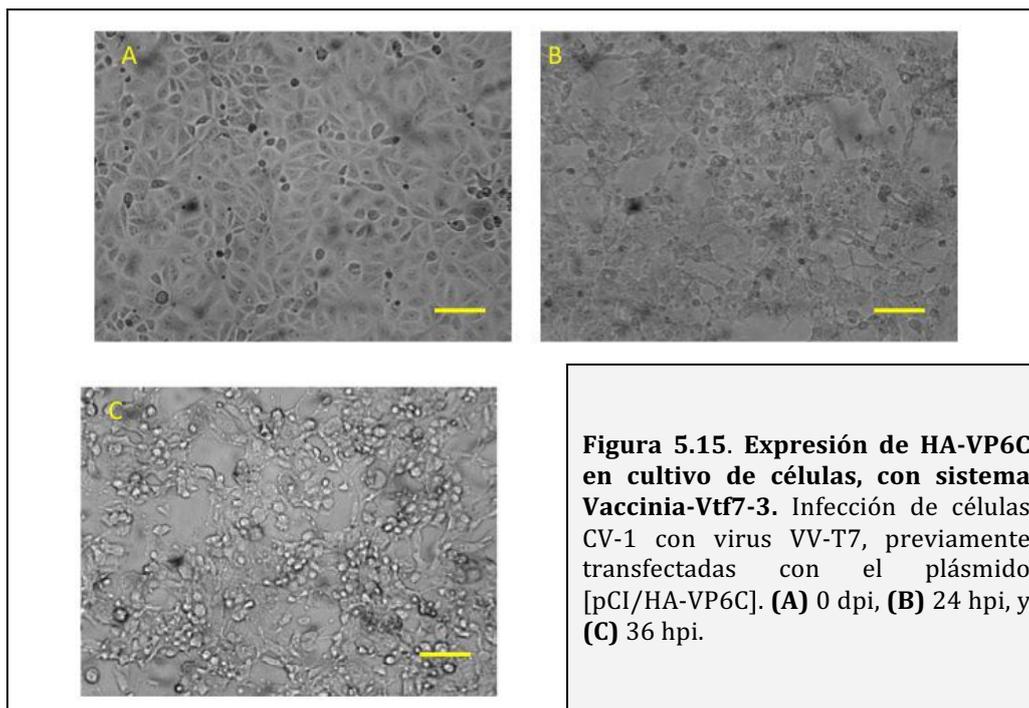
5.2.6.2 Detección de VP6C por medio de Western blot:

La expresión de la proteína HA-VP6C también se analizó mediante Western blot. Para esto se transfectó nuevamente, con el plásmido [pCI-neo/HA-VP6C], una monocapa de células CV-1, seguido de la infección con el *Virus Vaccinia Vtf7-3* (Figura 5.15), el cual expresa la T7-ARN polimerasa, provocando un aumento en la transcripción del gen HA-VP6C, y favoreciendo la sobreexpresión del mismo.

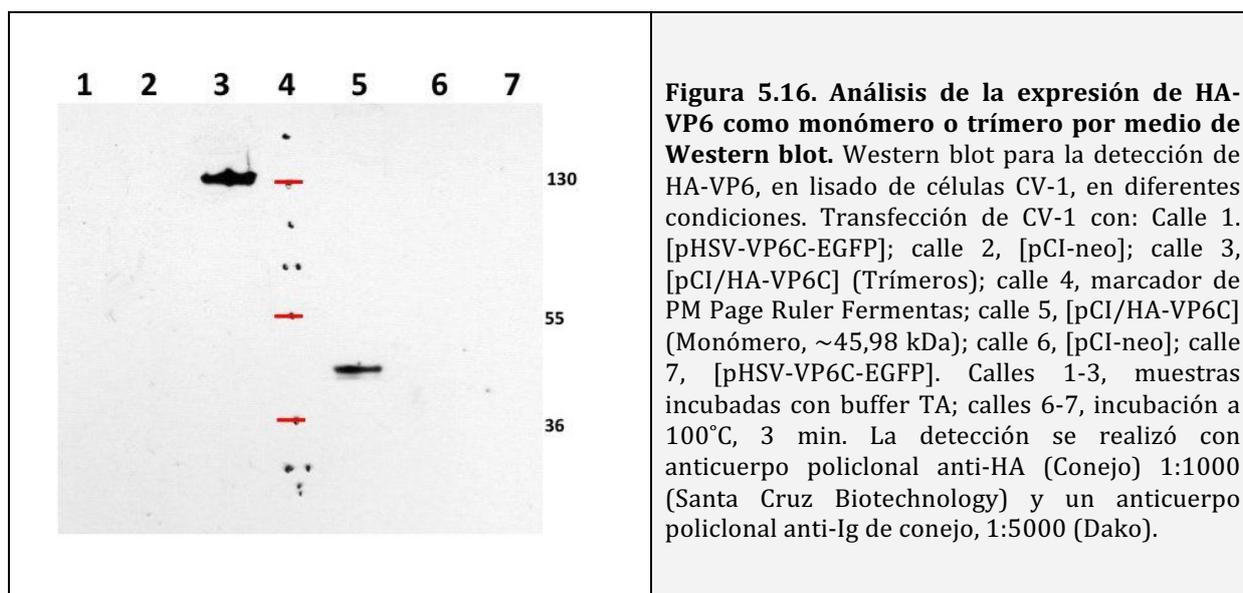
En este experimento se pudo evaluar también la propiedad de la proteína recombinante para generar trímeros.

Las imágenes se observan en la siguiente página.





Posteriormente la monocapa infectada, fue procesada para realizar la inmunodetección de la proteína HA-VP6C. Para esto se electrosepararon las proteínas de la muestra por medio de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Como se puede ver en la Figura 5.16, la proteína recombinante es detectada en sus dos formas, como trímero y monómero de acuerdo a la presencia o ausencia de tratamiento con calor, indicando que la trimerización de la proteína expresada se mantiene en el contexto de expresión de la célula eucariota huésped, y en las condiciones de la electroforesis empleada.



5.2.7 Expresión de AmMSP5.

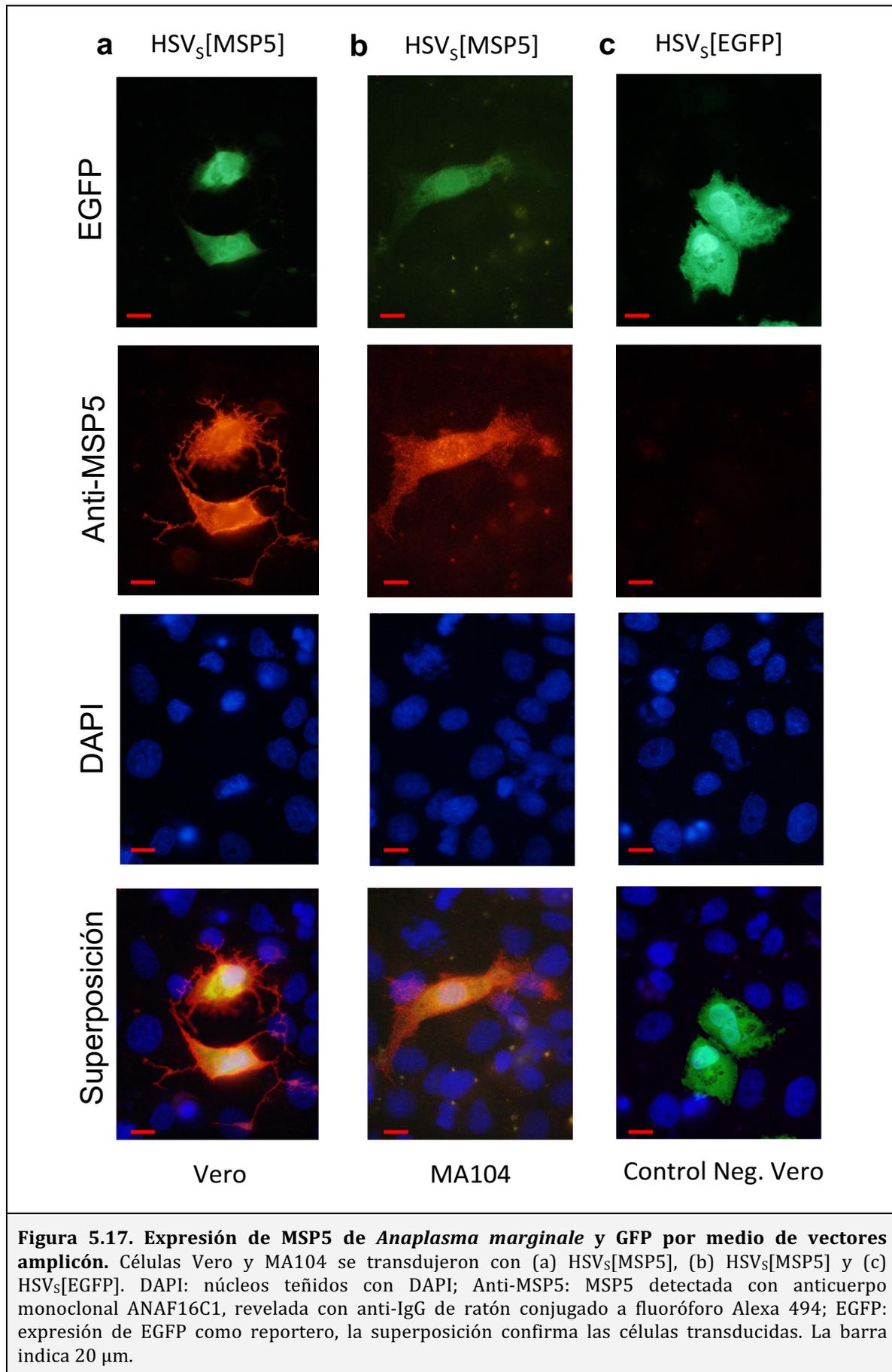
5.2.7.1 Detección de MSP5 por medio de inmunofluorescencia

La expresión de MSP5 se analizó por medio de inmunofluorescencia en monocapas de células Vero y MA104 transducidas con el vector amplicón HSV_s[MSP5]. La detección de MSP5 por IF, se realizó específicamente con el anticuerpo monoclonal ANAF16C1, y se reveló con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa 594®. Los preparados se observaron por medio de microscopía de fluorescencia (Figura 5.17).

Las células muestran un patrón de membrana particular comparadas con las células transducidas con el vector amplicón control HSV_s[EGFP], mostrado en los paneles de la derecha de la Figura 5.17. Esto podría indicar que la proteína MSP5 puede estar anclada/asociada en la membrana de las células, considerando que posee una región transmembrana. En dicha figura, la fluorescencia del gen reportero EGFP indica que las células fueron efectivamente transducidas por los vectores amplicón. Por otro lado, las células infectadas con el vector HSV_s[EGFP] que expresa sólo EGFP como transgén, no muestran inmunoreactividad con el anticuerpo monoclonal ANAF16C1.

5.2.1 Expresión *in vivo* de EGFP.

Para analizar la expresión del gen heterólogo *in vivo*, se transdujeron células de un ratón vivo. Para esto, luego de anestesiar un ratón Balb/c con isoflurano, se inocularon rápidamente partículas del vector HSV_s[EGFP] de manera subcutánea en la oreja del animal, el cual se sacrificó luego de 24 h post transducción. El área donde se inoculó el vector amplicón se extrajo, y se observó el tejido en diferentes aumentos, en la zona de inoculación. Los paneles de la Figura 5.18 (ver página 123) indican que a las 24 h de tratamiento es posible detectar la presencia de la expresión del transgén EGFP.



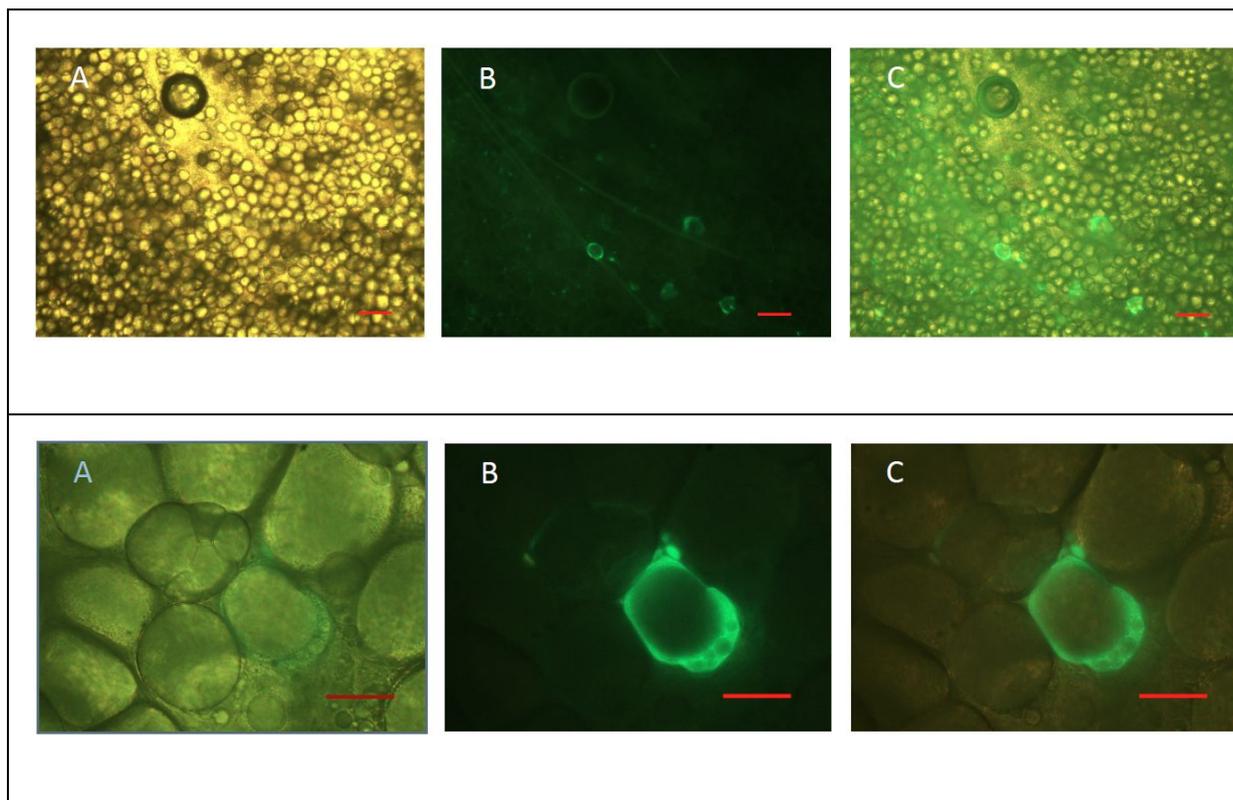


Figura 5.18. Expresión *in vivo* de EGFP en la oreja de ratones Balb/c. En los paneles se visualizan células transducidas y observadas a las 24 h, en una muestra fresca células epiteliales de la oreja de ratón, utilizando el microscopio de epifluorescencia. Se utilizan dos aumentos diferentes, de 40X en el panel superior (barra = 100 μm) y 100X en el panel inferior (barra = 20 μm), indicando la capacidad de los vectores construidos de expresar el reportero *in vivo*. (A) Campo claro, (B) Expresión de EGFP *in vivo*, (C) Superposición de campo claro y fluorescencia de EGFP.

5.3 Obtención de un virus HSV-1 recombinante para el “display” de un epítopo heterólogo en su superficie.

Para la construcción de HSV-1 defectivos presentadores o “display”, que exhiban un epítopo inmunodominante fusionado a la glicoproteína C, se utilizó un epítopo (denominado RGD) ubicado en un *loop* expuesto de la proteína VP1 del VFA. Este epítopo es capaz de generar anticuerpos neutralizantes contra el Virus de la Fiebre aftosa. En este trabajo, la inserción del péptido **RYSRNAVPNVRGDLQVLAQKVVRTL**P se realizó en la región perteneciente a un “*loop*” expuesto de la gC. La metodología de recombinación homóloga empleada, es la que se describe en la Sección 4.17.

5.3.1 Secuencia modificada de la gC de Herpes simplex virus tipo 1, cepa F.

Luego de realizar la selección de virus recombinantes, la región de inserción del péptido que contiene el epítopo RGD, se amplificó por PCR y se envió a secuenciar. La secuencia aminoacídica completa de la glicoproteína C modificada, es la que se detalla en la Figura 5.19. En azul y rojo se muestran los sitios sobre los cuales se construyeron

las secuencias flanqueantes para que ocurra la recombinación homóloga realizada con el sistema *galk*, descrito en la Sección 4.17.2.

```

MAPGRVGLAVVLWGLLWLGAGVAGGSETASTGPTRYSRNAVPNVRGDLQVLAQKVVRTLPITA
GAVTNASEAPTSSGSPGSAASPEVTPSTPNPNNVTQNKTPTEPASPPPTPKPTSTPKSPPTS
TPDPKPKNNTPPAKSGRPTKPPGPVWCDRRDPLARYGSRVQIRCFRNSTRMEFRLQIWRYSM
GPSPIAPAPDLEEVLTNITAPPGLLVYDSAPNLTDPHVLWAEAGPGADPPLYSVTGPLPT
QRLIIGEVTPATQGMYYLAWGRMDSPEHYGTWVRVRFPPSLTLQPHAVMEGQPFKATCTAA
AYYPRNPVEFDWFEDDRQVFNPGQIDTQTHEHPDGFTTVSTVTSEAVGGQVPPRTFTCQMTWH
RDSVTFSTRRNATGLALVLRPTITMEFGVRHVCTAGCVPEGVTFWFLGDDPSAAKSAVTA
QESCDHPGLATVRSTLPISYDYSEYICRLTGYPAGIPVLEHHGSHQPPRPDPTERQVIEAIEW
VGIGIGVLAAGVLVVTAIVYVVRTSQSRQRHRR*

```

Figura 5.19. Secuencia de gC modificada con epítopo RGD. En el panel se muestra la secuencia de la glicoproteína C, indicándose en rojo y azul las secuencias flanqueantes utilizadas para la recombinación homóloga, y en verde la secuencia del péptido RGD insertado en el dominio de unión a ácido siálico.

5.3.2 Selección de un clon recombinante HSV[Δ pac Δ 27/RGD]

La generación del b́acmido recombinante al cual se le ha insertado RGD, se realizó en dos etapas (Sección 4.16.3). En un primer paso en el sitio seleccionado de la glicoproteína C, se introdujo el marco abierto de lectura que codifica para la enzima *galk*, generando un intermediario que se seleccionó por su capacidad de metabolizar galactosa (Figura 5.20.A). Luego en una segunda recombinación, se retiró *galk* para ser reemplazado por la secuencia homóloga a gC que incluye la secuencia que codifica para el epítopo RGD (Figura 5.20.B). Ambos pasos ocurren por recombinación homóloga dentro de un sistema procaríota desarrollado para tal fin.

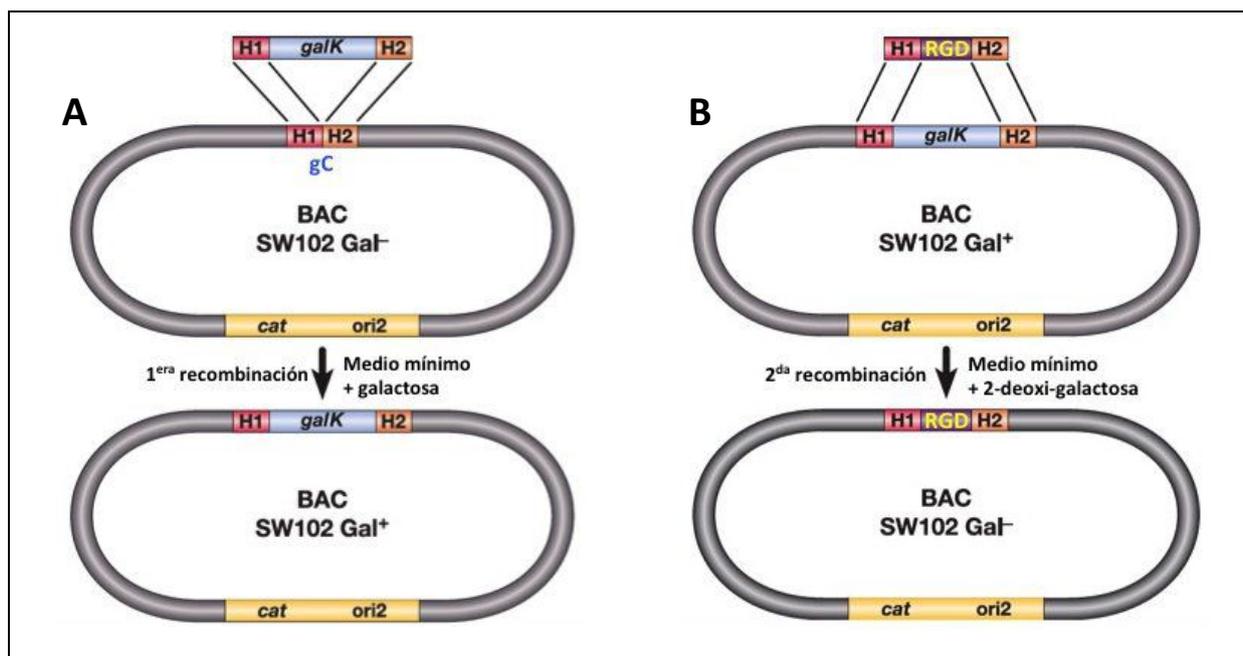


Figura 5.20. Esquema simplificado de selección *galK* para generar HSV-BAC modificado en *gC*, HSV[Δ pac Δ 27/RGD]. En (A) se muestra esquemáticamente el resultado del primer evento de recombinación, en el cual se realiza la inserción de *galK* en una posición definida. Dicho gen es activo constitutivamente en el HSV-BAC, permitiendo la selección de clones recombinantes en un medio mínimo conteniendo galactosa y Cam, la bacteria se convierte en un fenotipo *galK*⁺. En un segundo evento de recombinación (B), el casete es reemplazado por una secuencia de ADN correspondiente a RGD, flanqueado por la misma secuencia de *gC*, H1 y H2. Esto se logra por selección negativa utilizando un medio mínimo que contiene 2-deoxi-galactosa (DOG) con glicerol como única fuente de carbono, la bacteria que ahora es *galK*⁻. H1 y H2: secuencias homólogas a *gC*; *cat*: gen de cloranfenicol acetil transferasa; *ori2*: origen de replicación de HSV-BAC; *galK*: galactoquinasa de *E. coli* controlada por un promotor mínimo. Esquema adaptado de Warming y col., 2005.

5.3.3 Producción de ADN de HSV-BAC2 y HSV[Δ pac Δ 27/RGD]

La producción de ADN de cada uno de los bácmidos se realizó como se describe en la Sección 4.17.8. El ADN obtenido fue de una calidad suficiente para realizar las transfecciones y producir partículas virales defectivas de HSV[Δ pac Δ 27/RGD].

En la Figura 5.21.(A), se muestra la separación específica de las bandas de ADN de los HSV-BACs utilizados, las preparaciones se realizaron en gradiente de CsCl, como se describe en la Sección 4.17.8. Luego, cada ADN aislado se purificó y analizó por su patrón de restricción, utilizando las enzimas de restricción *Bst*BI y *Hind*III, como se observa en la misma Figura 5.21.(B).

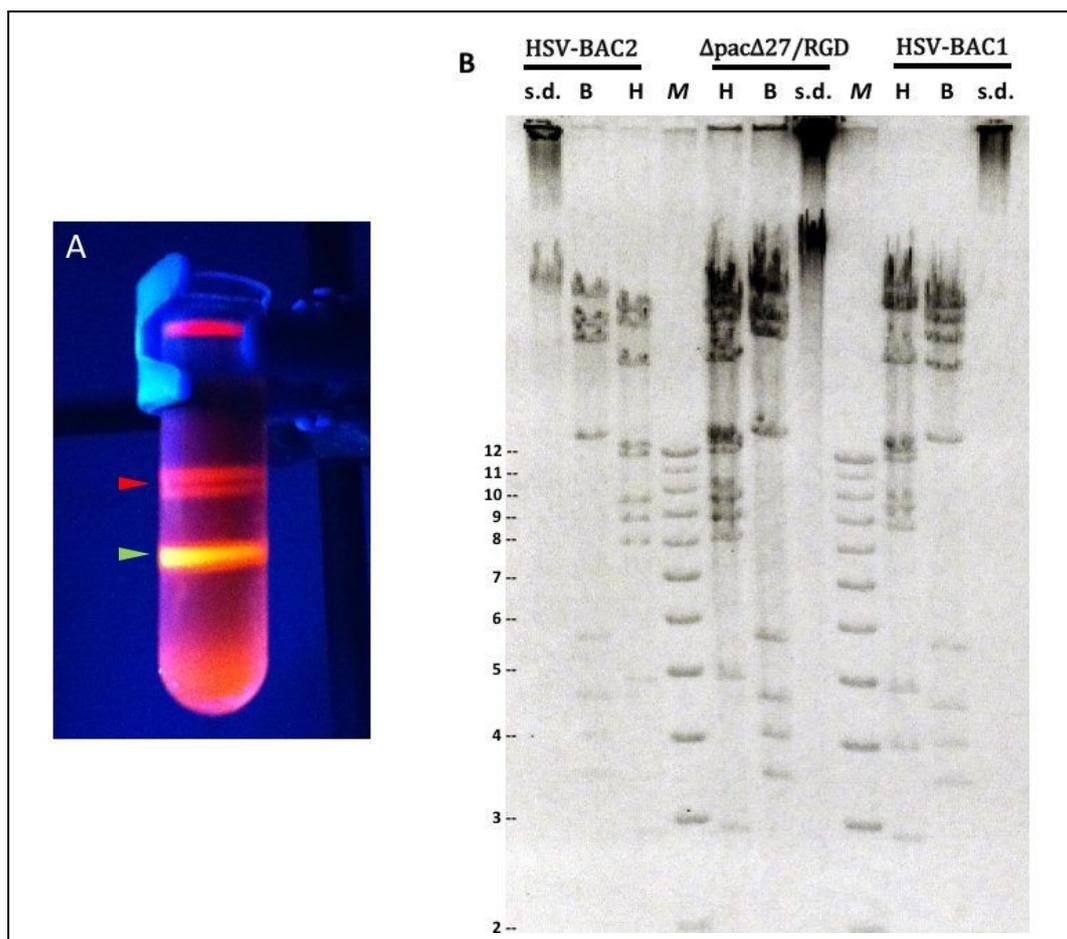
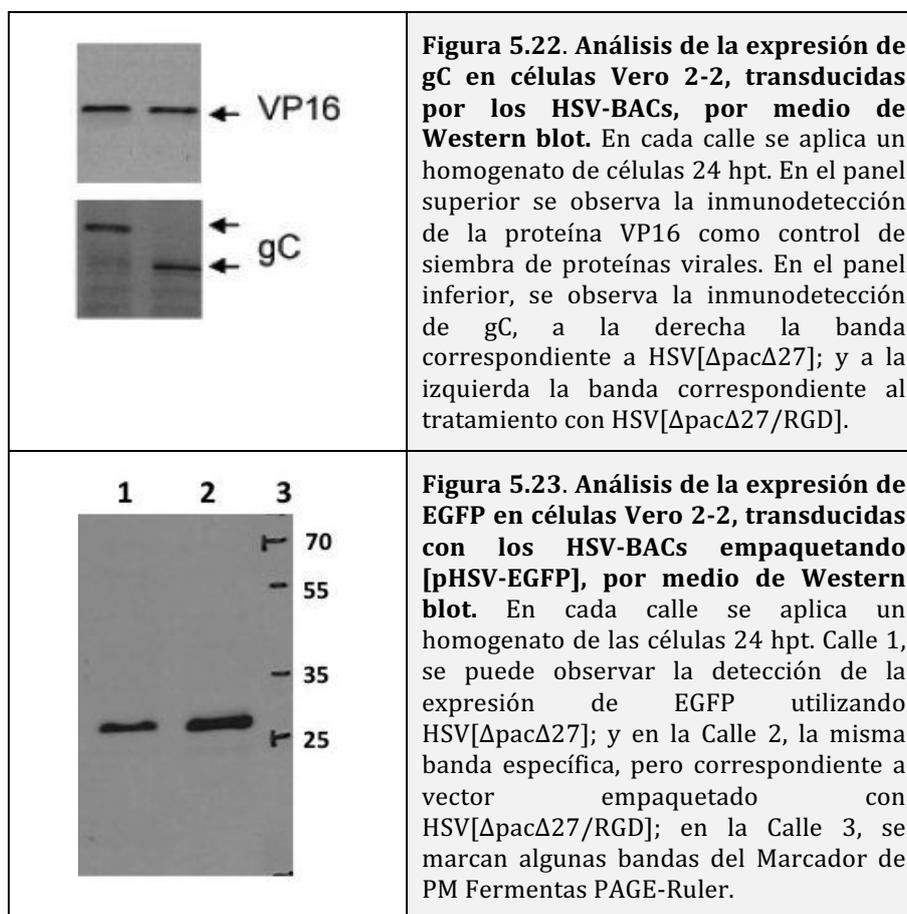


Figura 5.21. Purificación de ADN de HSV-BACs por medio de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. (A) Se muestra las bandas de ADN de báculo, siendo la inferior la banda de ADN superenrollado (flecha verde) utilizada para los experimentos, y las dos superiores las correspondientes a ADN "nickeado", que no se utilizan (flecha roja). **(B)** Se muestra la corrida de un gel de agarosa donde se observa el análisis de los báculos utilizados en la presente tesis el ADN parental HSV-BAC2, el modificado en gC, HSV[Δ pac Δ 27/RGD] y el HSV-BAC1 utilizado en las producciones de los vectores amplicón sin modificar. En la parte superior se indica el ADN digerido, B: *Bst*BI, H: *Hind*III, s.d.: sin digerir, y M: marcador de alto tamaño molecular, a la izquierda se indican los tamaños moleculares en kpb. El patrón observado es el esperado, la confirmación del inserto se realizó por medio de la secuenciación de la región del genoma de HSV-BAC involucrado en la modificación.

5.3.4 Análisis de expresión de gC en el virus derivado de HSV[Δ pac Δ 27/RGD]

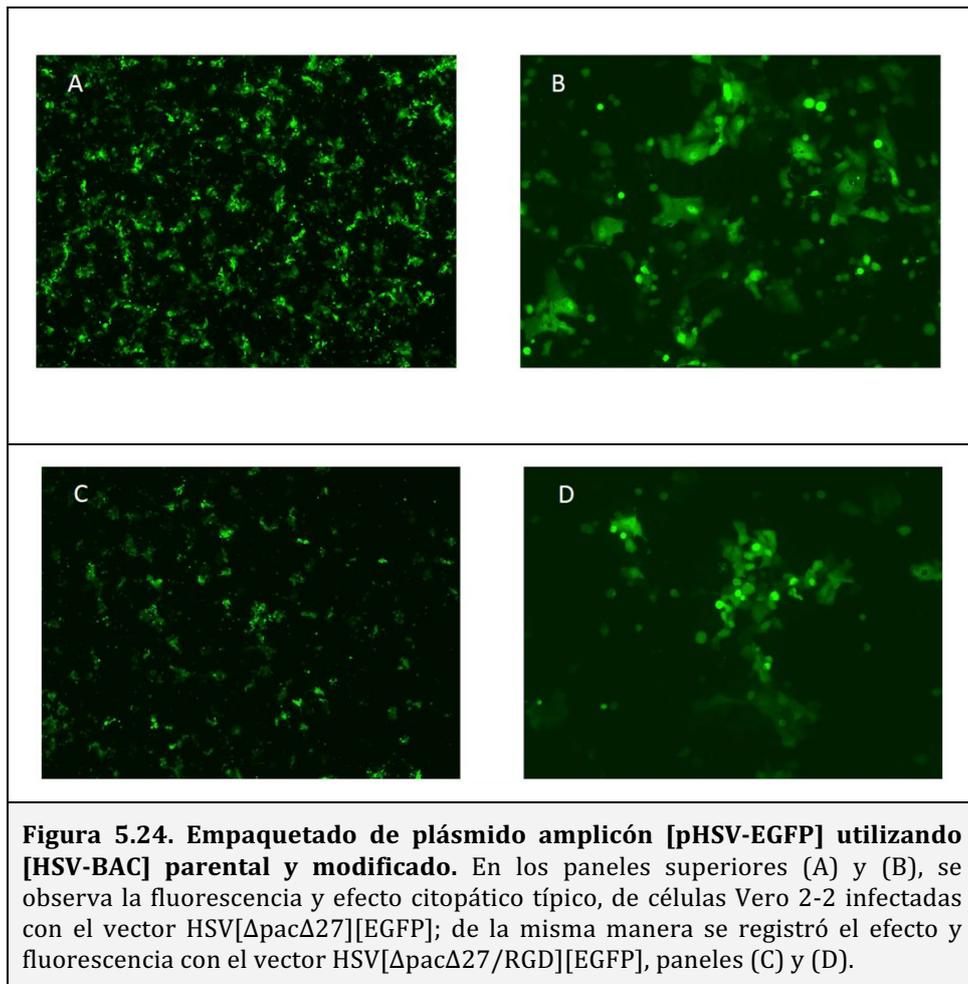
Para evaluar la expresión de la gC modificada, se cotransfectaron monocapas de células Vero 2-2, con (i) una preparación del plásmido amplicón [pHSV-EGFP], y el báculo control HSV-BAC2 por un lado y (ii) con el plásmido amplicón [pHSV-EGFP], y el báculo HSV[Δ pac Δ 27/RGD]. Una vez que se observó efecto citopático, se cosecharon las células Vero 2-2 infectadas, y el contenido de gC en el lisado se inmunodetectó por Western blot, detectando la forma nativa de la proteína en el caso del virus parental y la forma modificada en el caso del virus recombinante (Figura 5.22).

Adicionalmente, como el vector generado ha empaquetado el plásmido amplicón [pHSV-EGFP], se evalúa la expresión de EGFP en las células transducidas, Figura 5.23.



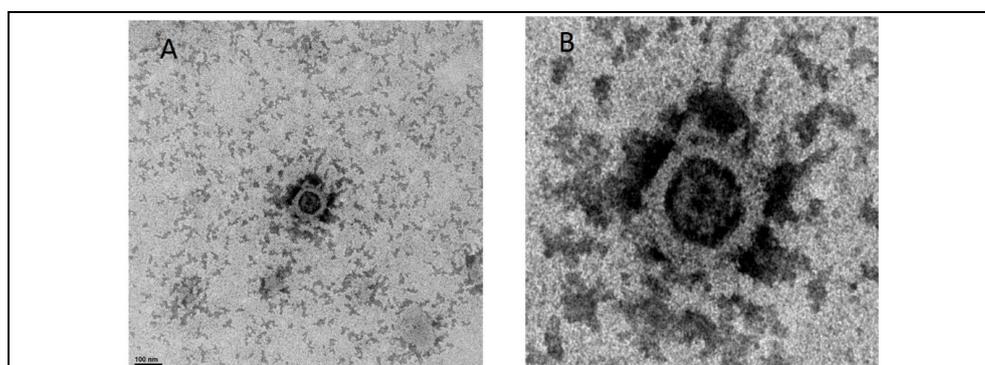
5.3.5 Preparación de partículas HSV-1 empaquetando plásmido [pHSV-EGFP]

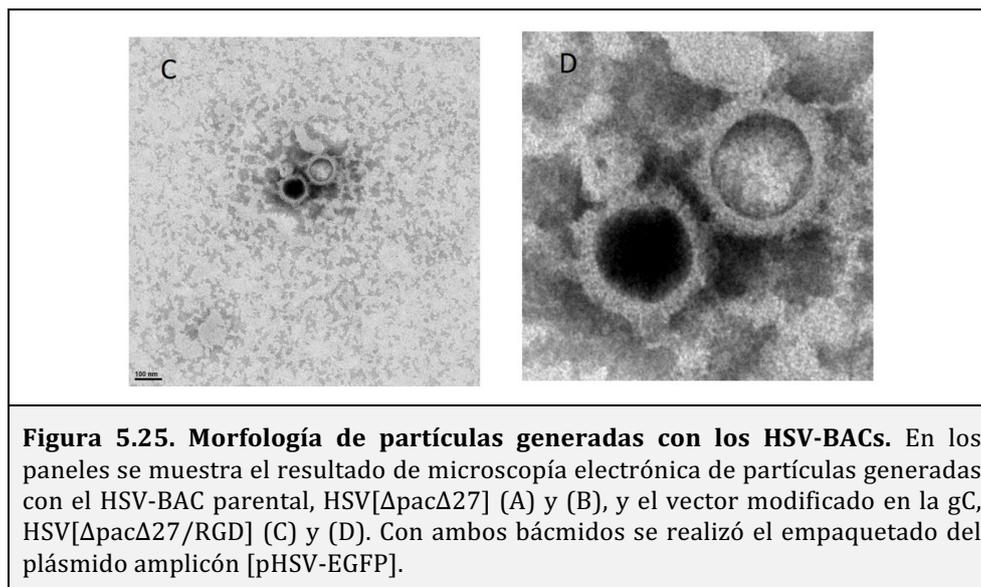
Adicionalmente a la detección por Western blot, se evaluó cualitativamente la capacidad de infectar las monocapas de células Vero 2-2. Se observó para esto, la expresión del gen reportero EGFP, y el efecto citopático alcanzado. Para esto se utilizaron partículas correspondientes al empaquetado del plásmido amplicón [pHSV-EGFP] con los bácmidos HSV-BAC2 y HSV[ΔpacΔ27/RGD] (Figura 5.24).



5.3.6 Análisis de la morfología de las partículas virales obtenidas.

Para realizar un análisis morfológico de las partículas obtenidas, una muestra de cada uno de los vectores virales HSV-BAC2 y HSV[Δ pac Δ 27/RGD], fue analizada por microscopía electrónica, previa concentración de las mismas (Figura 5.25).

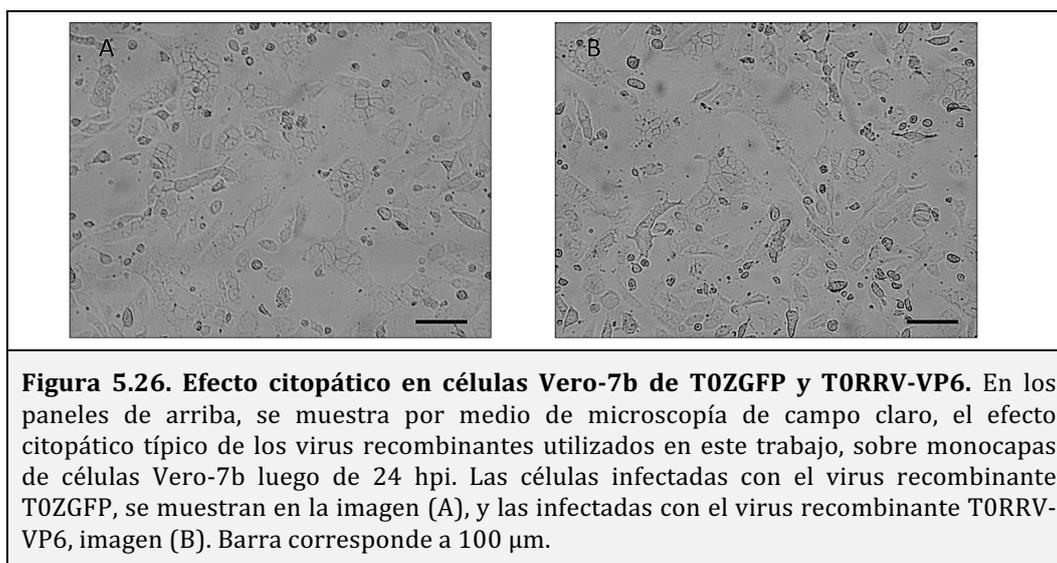




5.4 Producción de virus HSV-1 recombinantes

La metodología de producción y titulación de virus recombinantes se describió en la Sección 4.18. En esta sección se muestran los resultados obtenidos con la expresión de genes heterólogos, por parte de los vectores utilizados, y la concentración de este tipo de vectores virales a escala de laboratorio.

Los virus recombinantes se propagaron en monocapas de la línea celular Vero-7b, que complementa la replicación de estos virus defectivos. El efecto citopático de las infecciones es característico y permitió monitorear el avance de la infección por medio de la observación de la monocapa, además de la observación directa de la expresión de la proteína reportera EGFP mediante microscopía de fluorescencia.

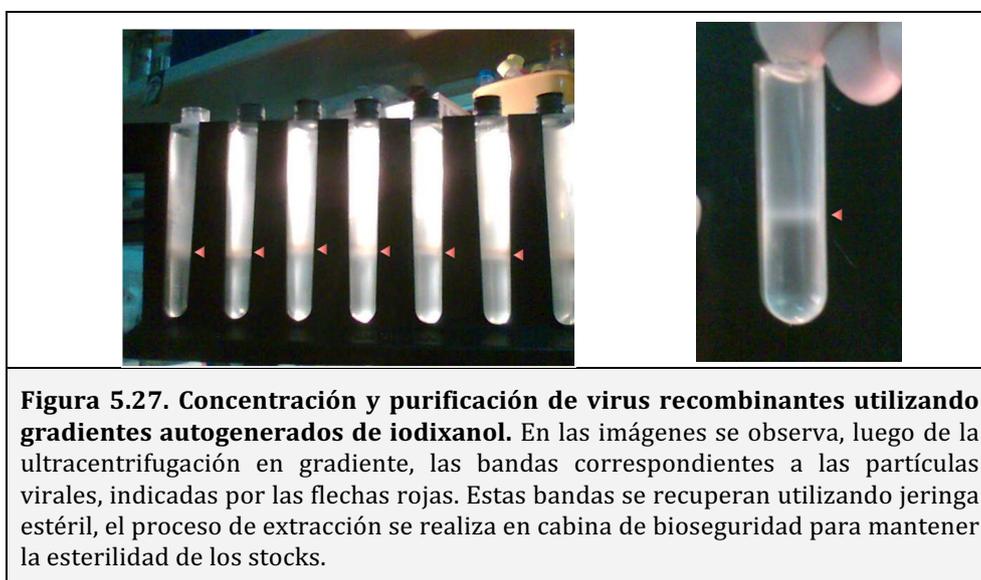


En la Figura 5.26, se muestra el efecto citopático típico de dos de los virus recombinantes utilizados, T0ZGFP y T0RRV-VP6.

5.4.1 Purificación de virus HSV-1 recombinantes.

La purificación de las partículas virales se realizó mediante el uso de un gradiente autogenerado (Sección 4.18.3.1), donde las partículas se acumulan en la región que corresponde a su densidad.

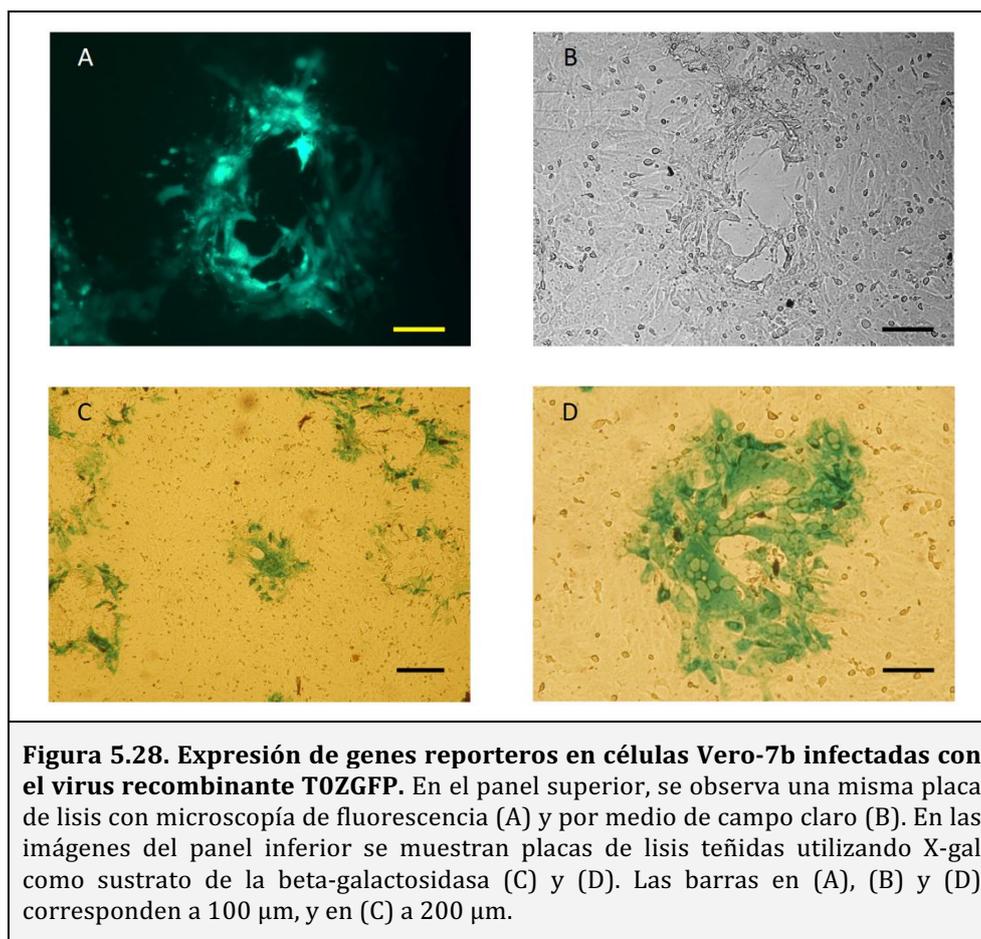
Las bandas generadas en estos gradientes de iodixanol (Figura 5.27) se colectaron utilizando una jeringa estéril, se lavaron para eliminar el resto de material proveniente de gradiente, y las partículas virales se resuspenden en buffer PBS 1X estéril, almacenándose los stocks a -80°C .



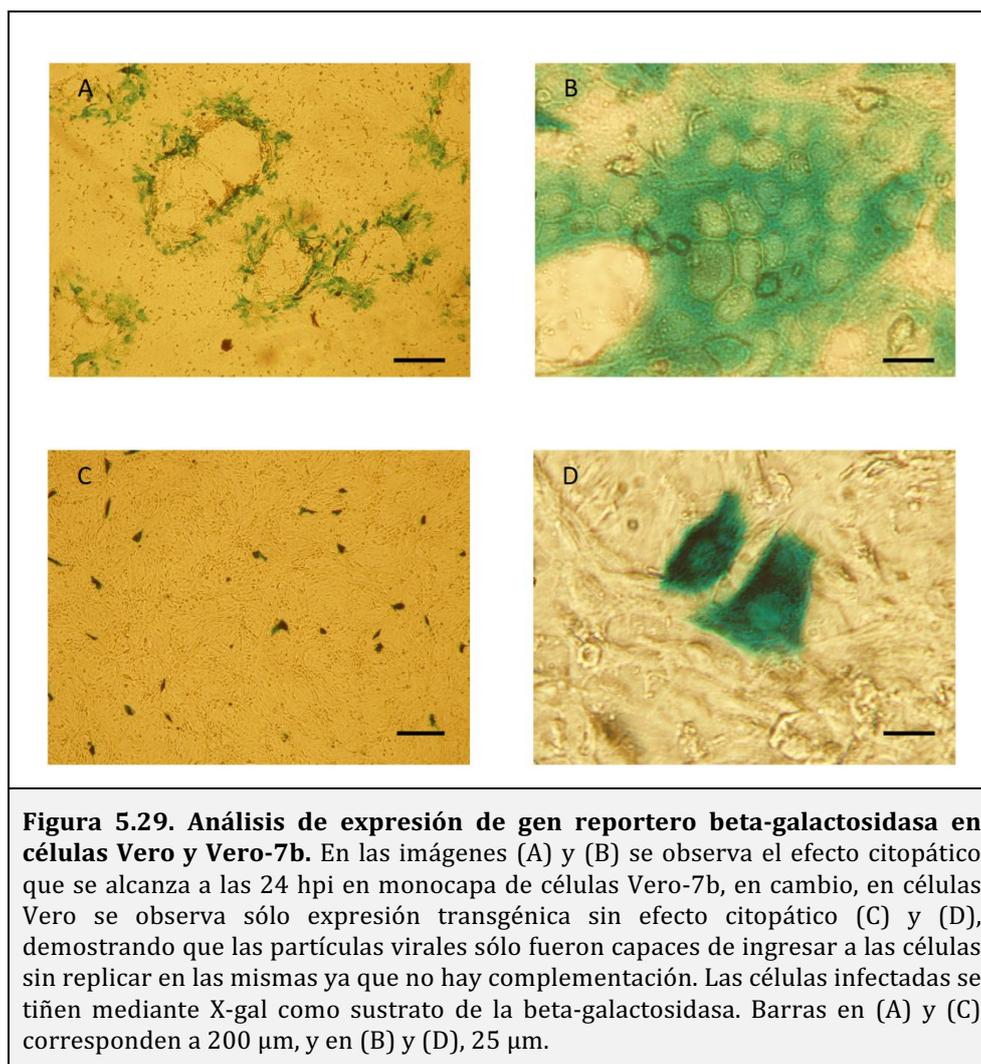
5.5 Análisis de expresión heteróloga de Virus Recombinantes en células eucariotas

5.5.1 Detección de la expresión de β -galactosidasa en cultivo de células.

Para estudiar la expresión de β -galactosidasa, se utilizaron monocapas de células complementantes Vero-7b, infectadas con el virus recombinante T0ZGFP. Luego de 24 h de infección, se observó la expresión de los genes reporteros EGFP y beta-galactosidasa, por medio de microscopía de fluorescencia y por tinción con X-gal, respectivamente. En la Figura 5.28, se muestran placas de lisis típicas de estos vectores virales en la línea celular Vero-7b.



Como se determinó anteriormente, cuando se infectaron células que complementan a estos virus defectivos, se observa efecto citopático, es el caso de las células Vero-7b (Figura 5.28 A - D), en cambio cuando se infectaron células que no complementan las delecciones, no se observó efecto citopático, pero si se puede detectar la expresión del transgén heterólogo (Figura 5.28 C y D). El ensayo con el virus T0ZGFP, que se muestra en la Figura 5.29, se observó el efecto citopático generado en células Vero-7b (A) y (B), y la expresión de transgén sin afectar la morfología ni viabilidad celular en células Vero, es decir el virus T0ZGFP no replicó en células Vero.



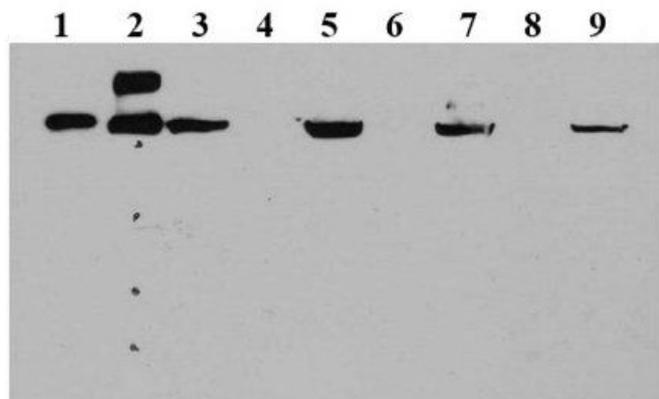
5.5.2 Detección de la expresión de RRV-VP6 en diferentes líneas celulares.

Utilizando el virus recombinante T0RRV-VP6, se transdujeron células Vero, Gli36 y MDBK, utilizando placas de 12 pocillos.

Posteriormente se colectó el lisado de las monocapas transducidas y los controles respectivos, para detectar la expresión de la proteína recombinante, por medio de Western blot, con un anticuerpo policlonal específico para rotavirus RRV.

Como controles positivos se utilizaron VP6 recombinante expresada en baculovirus (cedida por Dr. Diego González, INTA Castelar) y una suspensión de rotavirus RRV. En la calle 2, donde se realizó la siembra del marcador de peso molecular, se observan dos bandas que se marcan inespecíficamente, sin embargo al no aparecer en los controles positivos y negativos, por lo que consideramos que no interfieren con el análisis de los resultados, Figura 5.30.

Figura 5.30. Análisis de la expresión de RRV-VP6 por virus recombinante TORRV-VP6 en distintas líneas celulares. En el Western blot de la figura, se muestran dos controles positivos, uno de VP6 recombinante en la Calle 1, y VP6 detectada en células infectadas con RRV, Calle 9. Las muestras de células transducidas con virus recombinante TORRV-VP6, y sus controles negativos son: Calle 3, Vero TORRV-VP6; Calle 4, Vero; Calle 5, Gli36 TORRV-VP6; Calle 6, Gli36 MOCK; Calle 7, MDBK transducidas con TORRV-VP6. Calle 8, MDBK MOCK; Calle 2, marcador de PM, Bio-Rad N° cat.: 161-0318.



5.5.3 Detección de la expresión de EC-VP6 en diferentes líneas celulares.

La expresión de la proteína VP6 de la cepa de RV EC (EC-VP6) por el virus recombinante T0EC-VP6, se evaluó infectando diferentes líneas celulares, analizadas mediante IF 24 hpi. La detección de la proteína VP6 permite observar las macroestructuras típicas generadas por la polimerización de la proteína VP6, dependiendo del nivel de expresión, como se observa en las Figuras 5.31 y 5.32.

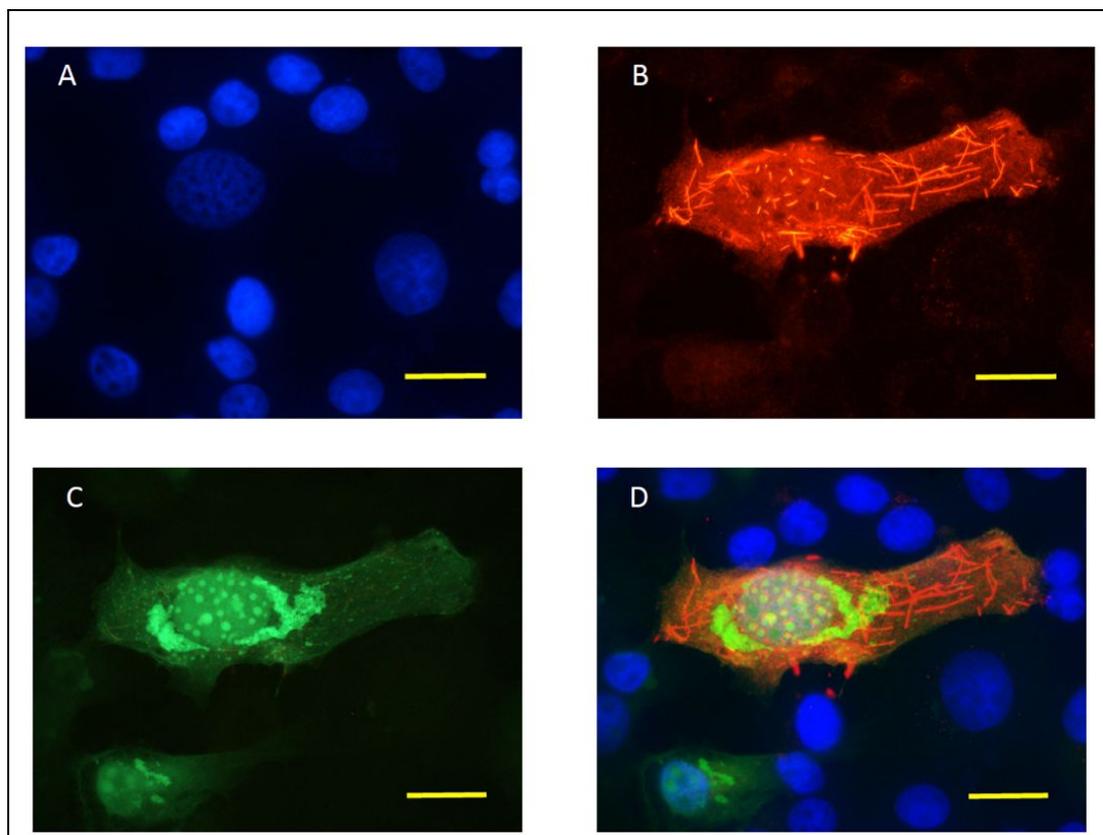


Figura 5.31. Expresión de EC-VP6 formando microfibras en cultivo de células MDBK. En los paneles se muestra la detección por IF de VP6 en células infectadas con el virus defectivo T0-ECVP6. (A) Los núcleos fueron teñidos con DAPI; (B) VP6 detectada en forma de microfibras con el AcM 2F anti VP6, seguido de anti-Alexa 594, que emite en color rojo; (C) Expresión de EGFP como reportero y (D) Superposición de los campos. Barra = 20 μ m.

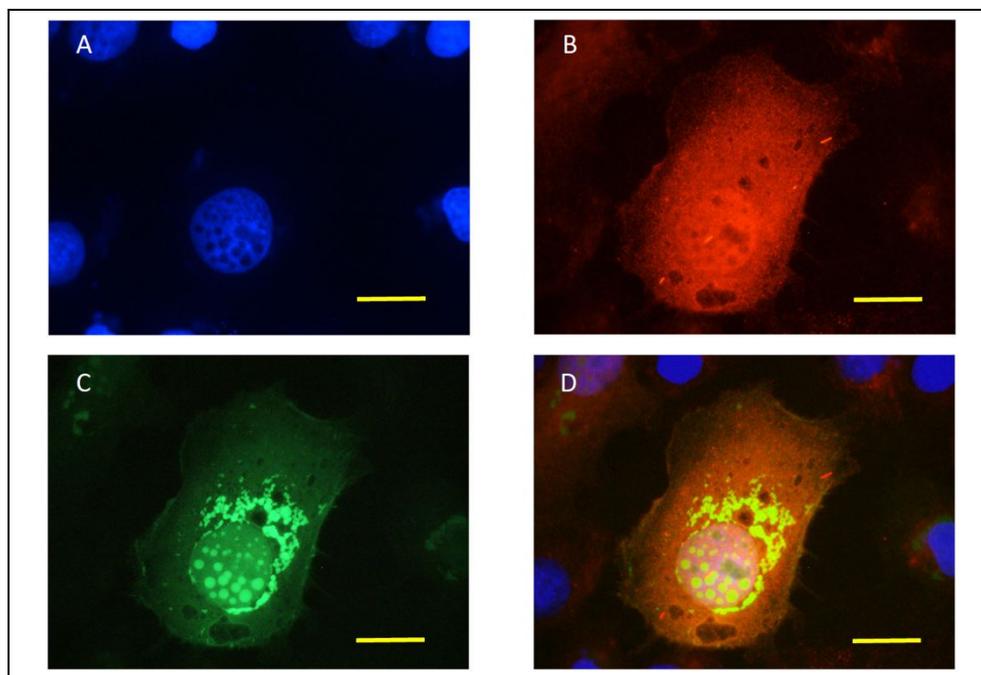
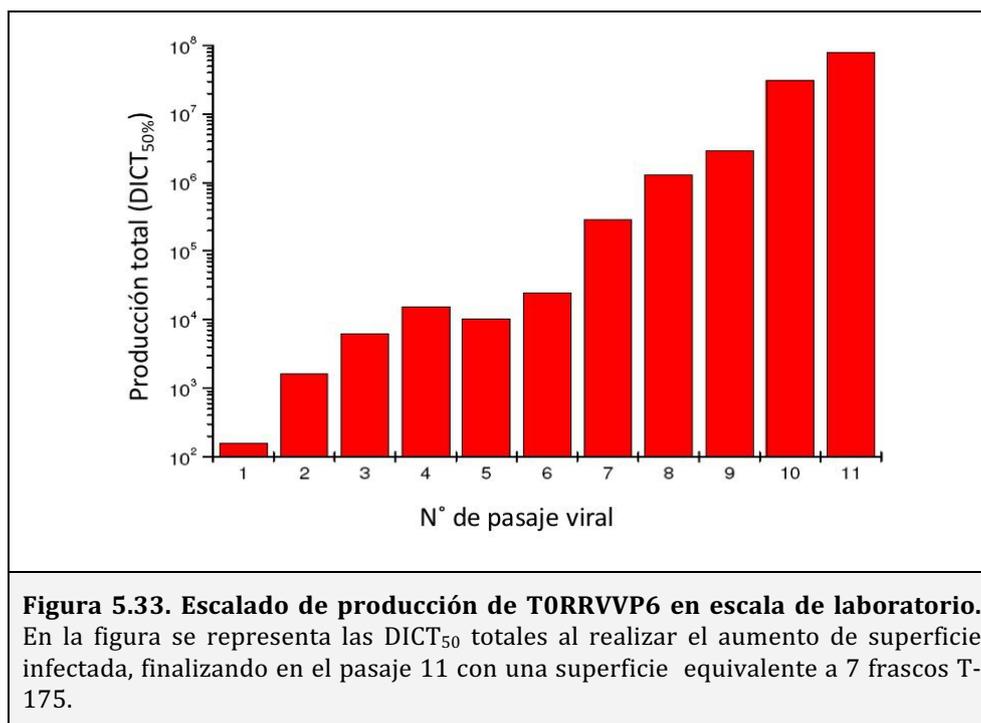


Figura 5.32. Expresión de EC-VP6 en cultivo de células MDBK. En los paneles se muestra la detección por IF de VP6 en células infectadas con el virus defectivo T0-ECVP6. (A) Los núcleos fueron teñidos con DAPI; (B) la proteína recombinante expresada VP6, es detectada en el citoplasma celular, antes de comenzar a formar nanoestructuras tubulares, utilizando el AcM 2F anti-VP6, seguido de anti-Alexa 594; (C) La expresión de EGFP como reportero se observa como verde fluorescente, y en (D) se realiza la superposición de todos los campos. Barra = 20 μ m.

5.6 Producción de virus recombinante TORRVVP6

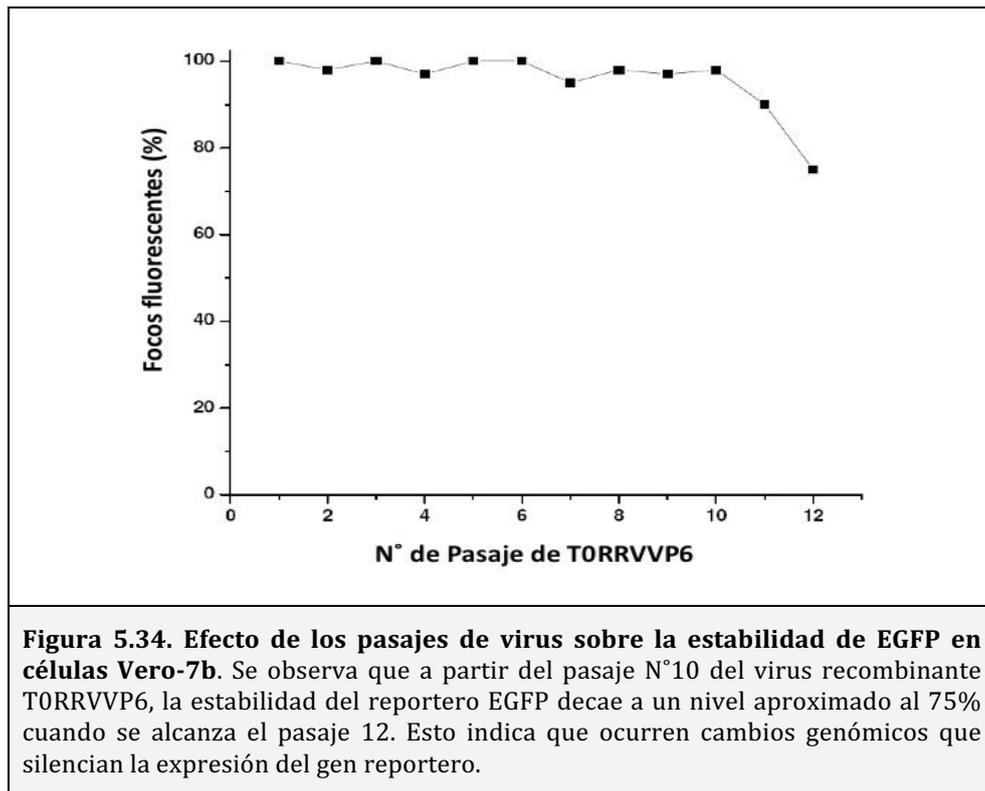
5.6.1 Escalado de la producción de TORRVVP6

El primer virus recombinante en ser producido, que expresa una proteína de rotavirus, fue el TORRVVP6. Durante la producción de este virus, se analizó la evolución del título del stock viral con el aumento del número de células infectadas, y por lo tanto del número de pasajes realizados en la línea celular Vero-7b. El inicio se realizó desde un stock de bajo título. En la Figura 5.33 se muestra el título obtenido luego de los 11 primeros pasajes, expresado como $DICT_{50\%}$. Al realizar el escalado desde una placa de 96 pocillos, hasta alcanzar la escala equivalente a frascos T-175 al final de la producción. Las titulaciones se realizaron como se describe en la Sección 4.18.2.



5.6.2 Detección y aislamiento de mutantes durante la producción

Los pasajes sucesivos de los virus recombinantes fueron acompañados por la detección y el análisis de la generación de placas de lisis fluorescentes en las monocapas de las células Vero-7b, es decir por medio de la expresión de su gen reportero EGFP (Sección 4.18.1). En los pasajes más altos comenzó a detectarse la presencia de placas de lisis que no presentaban un fenotipo fluorescente. La Figura 5.34 muestra la disminución, a partir del pasaje 10, de focos fluorescentes sobre el total de placas analizadas en cada pasaje.



A partir del pasaje N° 11, la caída del número de focos fluorescentes es muy pronunciada, y va aumentando la población de virus que ha perdido el fenotipo fluorescente. Esto se muestra gráficamente en la Figura 5.35, donde en el pasaje N° 11 se alcanza el 85% de placas de lisis EGFP positivas, mientras que en el pasaje N° 16, se observa que sólo el 5% de las placas expresa EGFP.

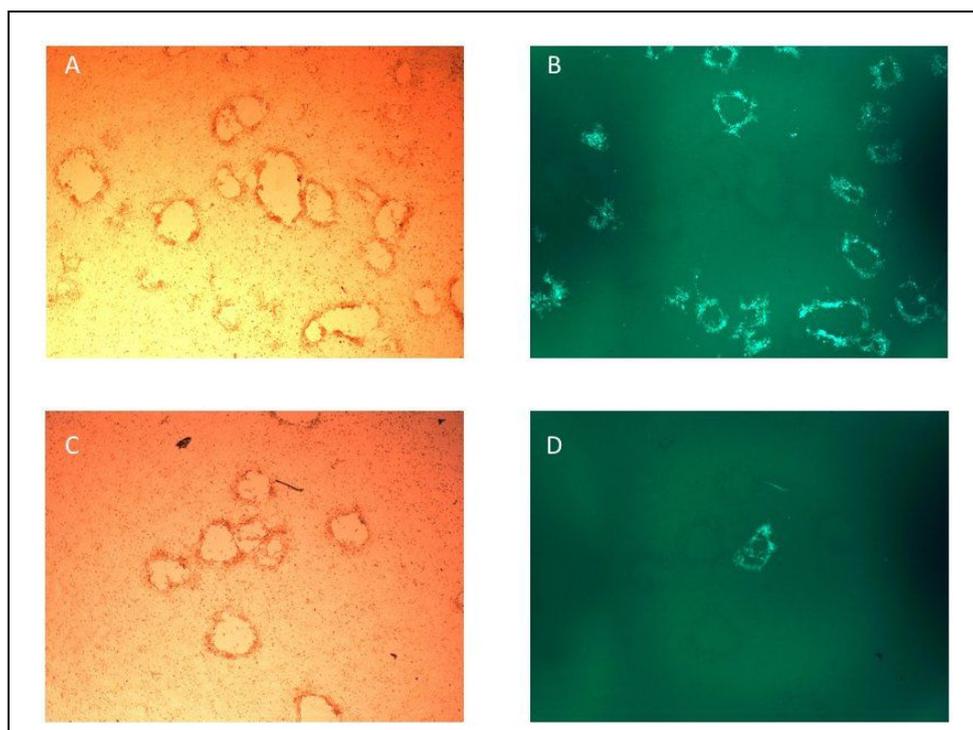


Figura 5.35. Caída de placas de lisis que expresan EGFP con el aumento de pasajes del virus recombinante TORRVVP6. En los paneles se muestra la expresión de EGFP en placas de lisis originadas con el virus recombinante TORRVVP6, en células Vero-7b. (A) y (B) Pasaje N°11 se registra un 85% de placas de lisis positivas para EGFP; (C) y (D) Pasaje N° 16 del virus TORRVVP6.

5.7 Análisis de clones de virus aislados a partir de placas de lisis EGFP positivas y negativas de TORRVVP6

Se realizó el aislamiento de clones de virus recombinantes a partir de diferentes focos positivos y negativos para EGFP, cultivo de células Vero-7b en placas de 12 pocillos y utilizando medio semisólido con CMC al 1%. La morfología de los focos se observó diariamente, como se muestra en la Figura 5.36, en campo claro A y C, y por medio de microscopía de fluorescencia, B y D, a dos tiempos diferentes, 24 hpi (A y B) y 36 hpi (C y D).

Luego de 5 pasajes de estos aislamientos, se realizó la concentración de viriones y la extracción de ADN genómico para el análisis molecular mediante detección de la secuencia RRV-VP6.

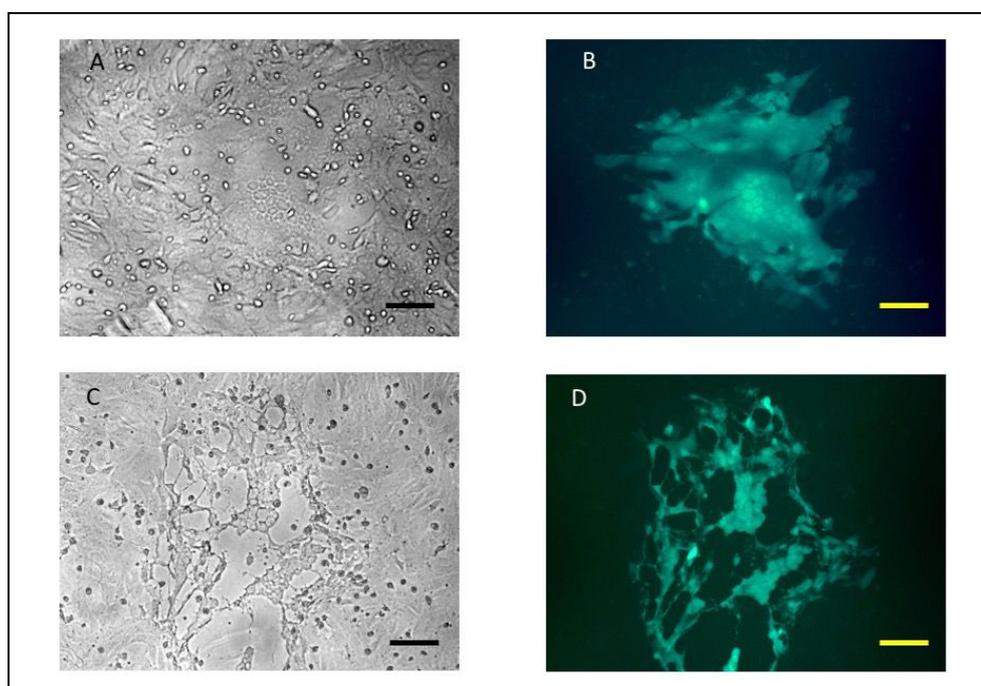
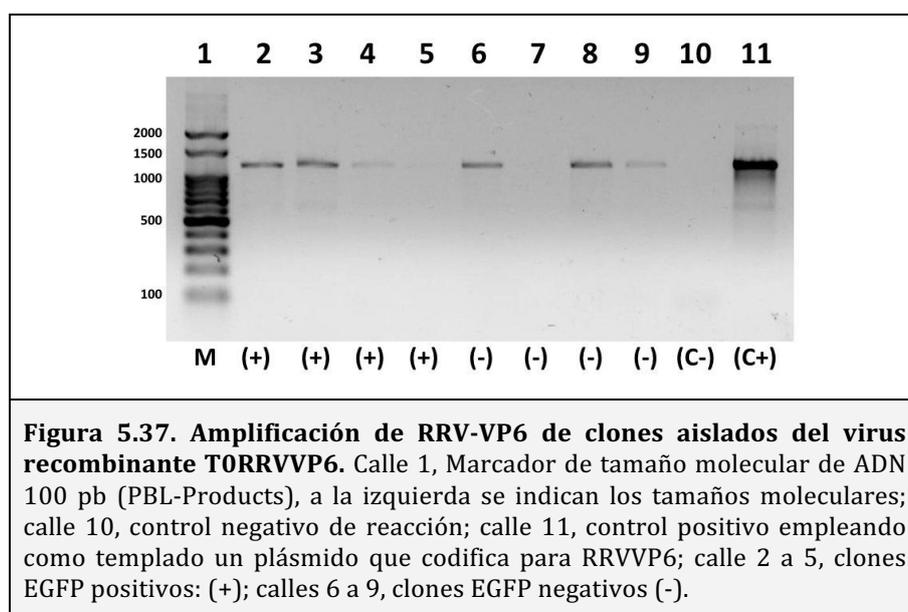


Figura 5.36. Sincicios y placas de lisis fluorescentes típicas de TORRVVP6. El acompañamiento del clonado se realizó mediante microscopía de fluorescencia y siempre manteniendo medio semisólido para evitar la diseminación y mezclado de los focos aislados. En los paneles (A) y (B), se puede observar el efecto típico a las 24 hpi y a partir de las 30 hpi se comienza a destruir el sincicio para generar una placa de lisis, paneles (C) y (D). Barra = 100 μ m.

5.8 Análisis de la presencia del marco abierto de lectura de RRV-VP6 en clones aislados de T0RRVVP6

En el siguiente paso, se analizaron individualmente cada uno de los clones aislados, cuatro EGFP positivos y cuatro EGFP negativos. Se obtuvieron a partir de placas de cultivo de 6 pocillos, y concentraron mediante colchón de sacarosa como se describe en la Sección 4.16.2.2,. Luego se realizó la extracción de ADN viral sobre el pellet obtenido luego de precipitar con etanol el ADN genómico de cada uno de los clones aislados (Sambrook y col., 2001). Este ADN, se utilizó como templado para la detección de RRV-VP6, utilizando los oligonucleótidos iniciadores, que se describen en la Tabla I.7 del Anexo I. Los fragmentos amplificados se enviaron a secuenciar utilizando también los oligonucleótidos internos descritos en la misma tabla. En la Figura 5.37, se muestra el resultado de las reacciones de PCR específicas para el análisis realizado.



Se puede observar que existen fragmentos amplificados en ambos grupos, lo que indicaría que el gen correspondiente a RRV-VP6 se encuentra presente a pesar de que la estabilidad de EGFP es variable. Del mismo modo, esta inestabilidad se observa también en la expresión de RRV-VP6, ya que se encuentran células EGFP positivas, que no muestran niveles de expresión de RRV-VP6. Los resultados indicarían que al aumentar el número de pasajes la población viral se enriquece de partículas que dejan de expresar los genes heterólogos.

5.9 Expresión de las proteínas recombinantes rMSP5-H₆ y rMSP5-MBP

La proteína recombinante rMSP5-H₆ de *A. marginale* se obtuvo en cultivos de bacterias tanto en las fracciones solubles como insolubles, mientras que la proteína rMSP5-MBP se expresó principalmente como proteína soluble. Ambas proteínas migraron en geles de poliacrilamida, en condiciones no nativas (SDS-PAGE), presentando los pesos moleculares esperados de 27 y 66 kDa respectivamente (Figura 5.38, A y B).

Las proteínas quiméricas se purificaron por medio de cromatografía de afinidad a los péptidos de fusión, resina con amilosa para rMBP-MSP5 (Figura 5.32 A) y resina de sefaroza-níquel para rMSP5-H₆ (Figura 5.32 B). El rendimiento final obtenido fue de 2,29 y 0,072 g/L, respectivamente. Las endotoxinas se eliminaron como se describe en la bibliografía (Zimmerman y col., 2006).

La proteína recombinante rMSP5-MBP se utilizó para realizar inmunizaciones en animales de experimentación (ver Tabla 5), y también para las determinaciones de anticuerpos mono-específicos contra MSP5 (cELISA), y la proteína recombinante rMSP5-H₆ se utilizó en los ensayos de linfoproliferación y ELISA de anticuerpos totales anti-MSP5.

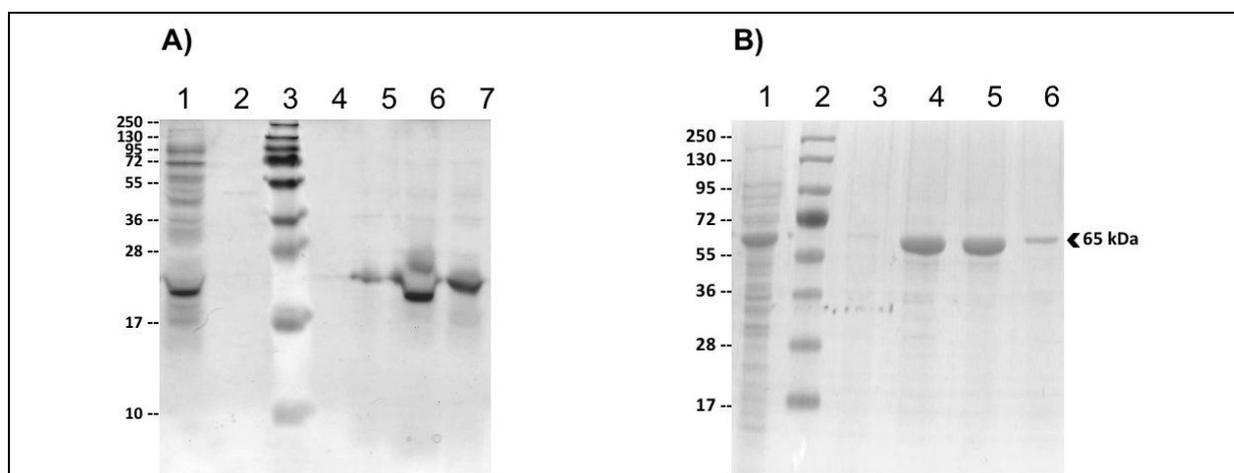
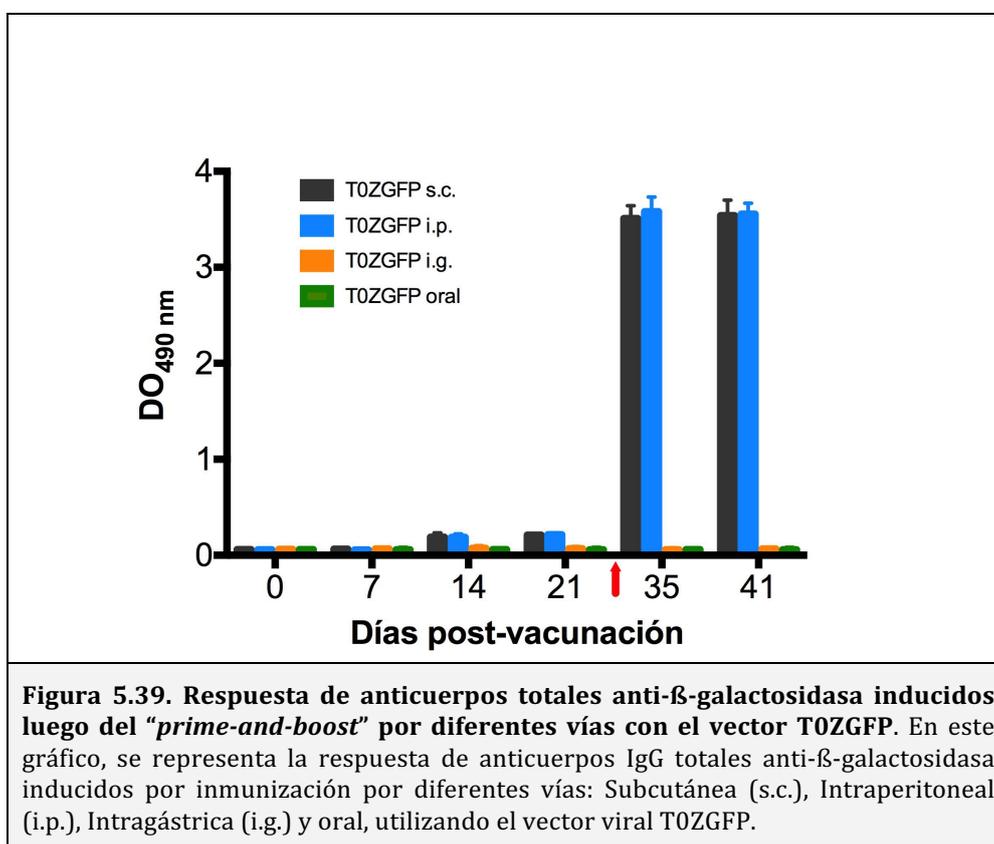


Figura 5.38. Expresión en *E. coli* y purificación de las proteínas recombinantes rMSP5-MBP y rMSP5-6xHis. En el gel (A) se observa la expresión y purificación de la proteína rMSP5-H₆, Calle 1, cultivo inducido durante 4 h de *E. coli* BL21(DE3)pLysS[pRSET/AmMSP5]; Calle 2, Muestra de *flow through*; Calle 3, Marcador de PM (PAGE-Ruler, Fermentas); Calle 4, Muestra de lavado de la columna; Calles 5 a 6, fracciones de elución N° 8, 11 y 12, respectivamente. En el gel (B) se observa la expresión y purificación de la proteína rMSP5-MBP, Calle 1, cultivo inducido durante 4 horas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS[pMAL-c2X/AmMSP5]; Calle 2, Marcador de PM (PAGE-Ruler, Fermentas); Calle 3, Muestra de lavado de la columna; Calle 4 a 6, fracciones de eluciones 1 a 3, respectivamente. Las flechas indican las proteínas recombinantes rMSP5-H₆ y rMSP5-MBP. A la izquierda se indican los PM de las bandas del marcador.

5.10 Análisis de la respuesta inmune generada con vectores virales

5.10.1 Respuesta de anticuerpos específicos para β -galactosidasa

A distintos tiempos post-inmunización de los grupos de ratones (Sección 4.22) se determinó el nivel de IgG total anti- β -galactosidasa. Se puede observar claramente en la Figura 5.39 que la respuesta más elevada se ha logrado mediante las vías de inmunización subcutánea (s.c.) e intraperitoneal (i.p.), obteniéndose diferencias significativas muy marcadas ($p < 0.001$) a los 35 y 41 dpv, respecto a los otros dos grupos (inmunizados por vías i.g. y oral). Los grupos TOZGFP i.p. y s.c. a los 35 y 41 dpv, es decir luego de aplicar el refuerzo, no presentan diferencias significativas entre sí, $p = 0,635$ y $p = 0,994$, respectivamente. Esto demuestra que al menos para este antígeno modelo, las dos vías de inmunización inducirían niveles comparables de IgG.



5.10.2 Respuesta de anticuerpos específicos para VP4

Para el análisis de anticuerpos, los valores de DO medidos en los sueros de los animales inmunizados, con el esquema indicado en Sección 4.23, se representaron en la Figura 5.40. El análisis estadístico se realizó como se indicó en la Sección 4.26. En esta figura, se puede observar que al día 21 post-vacunación, no se observan diferencias significativas ($p = 0,243$) entre los valores de DO del grupo inmunizado con el vector

HSV_s[VP4], respecto al grupo inmunizado con el vector amplicón HSV_s[EGFP] (control negativo). Sin embargo, luego del refuerzo con los mismos antígenos se produce un aumento significativo en los títulos de los animales inmunizados con HSV_s[VP4] ($p=5 \times 10^{-8}$) (Figura 5.40).

Al final del experimento, al día 42, el grupo de animales vacunados y revacunados con el vector amplicón HSV_s[VP4], genera una diferencia significativa respecto del grupo control negativo HSV_s[EGFP]. En relación a un control positivo obtenido por medición de un suero inmune obtenido con virus completo Wa (marcado en el eje y), y se puede apreciar en general que la respuesta generada contra VP4 por el vector amplicón es relativamente alta.

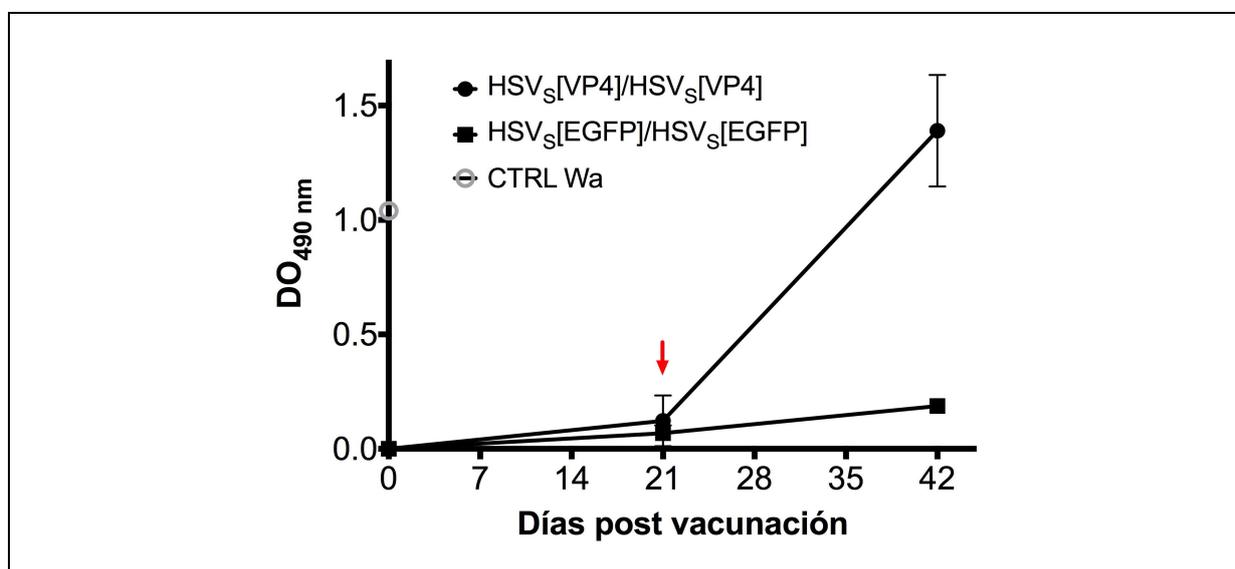


Figura 5.40. Anticuerpos específicos contra RV inducidos luego de la administración de HSV_s[VP4]. En esta figura se representa la señal de la respuesta obtenida en los grupos inmunizados, en el eje Y se indica señal máxima obtenida con el grupo inmunizado con virus completo, cepa Wa (CTRL Wa). El Grupo inmunizado con PBS 1X, se utilizó como blanco, en el gráfico se muestra la diferencia entre la señal de la muestra y el grupo control. Los días post vacunación son los que se muestran en el eje X. Los puntos representan los valores de DO_{490 nm} medios que se alcanzan en cada grupo en diferentes días de muestreo. Las barras de error muestran los errores estándar de la media. Grupos: (○): Control RV; (□): Blanco; (●): HSV_s[VP4]/HSV_s[VP4]; (■): HSV_s[EGFP]/HSV_s[EGFP].

5.10.3 Respuesta de anticuerpos específicos para VP6C

Se aplicó el protocolo descrito en la Tabla 4 (Sección 4.22) inmunizando con dos vacunas genéticas distintas codificando la secuencia de VP6 del grupo C de RV: una constituida por ADN desnudo y otra con vehiculización del ADN mediante el vector amplicón HSV_s[VP6C]. El resultado del análisis se muestra en la Figura 5.41.

Dentro de los 4 grupos experimentales (excluyendo los dos grupos de control) se observó que los mayores niveles de anticuerpos se producen en los grupos 1 y 4, es decir en animales que tienen 2 o 3 inmunizaciones con el vector HSV_s[VP6C]. En particular, en el grupo 4 donde las tres inmunizaciones están hechas con el vector, se alcanzan los mayores títulos. A los 42 días post inicio de los tratamientos, con dos inmunizaciones con el vector amplicón HSV_s[VP6C] el Grupo 4 ya presenta valores de DO significativamente diferentes de los valores obtenidos con los demás grupos ($p=4 \times 10^{-9}$). Al final del experimento, y luego de 14 días de la última dosis, la diferencia encontrada entre el grupo 4 y los demás grupos, se hace más significativa aún ($p=1 \times 10^{-11}$). Por otro lado el grupo 2, inmunizado con tres dosis de ADN desnudo, no se diferencia de los controles negativos.

En los animales del grupo 1, con un *priming* de ADN desnudo, hay un aumento de títulos luego de dos refuerzos de vector HSV_s[VP6C]. En cambio en el grupo 3 con un *priming* de vector ya se logra una diferencia significativa con los grupos 1 ($p=0.001$) y 2 ($p=0.002$), inmunizados con ADN desnudo y 5 ($p=0.003$) que es el control negativo correspondiente. Pero los títulos bajan rápidamente, a pesar de recibir posteriormente dos refuerzos con ADN desnudo.

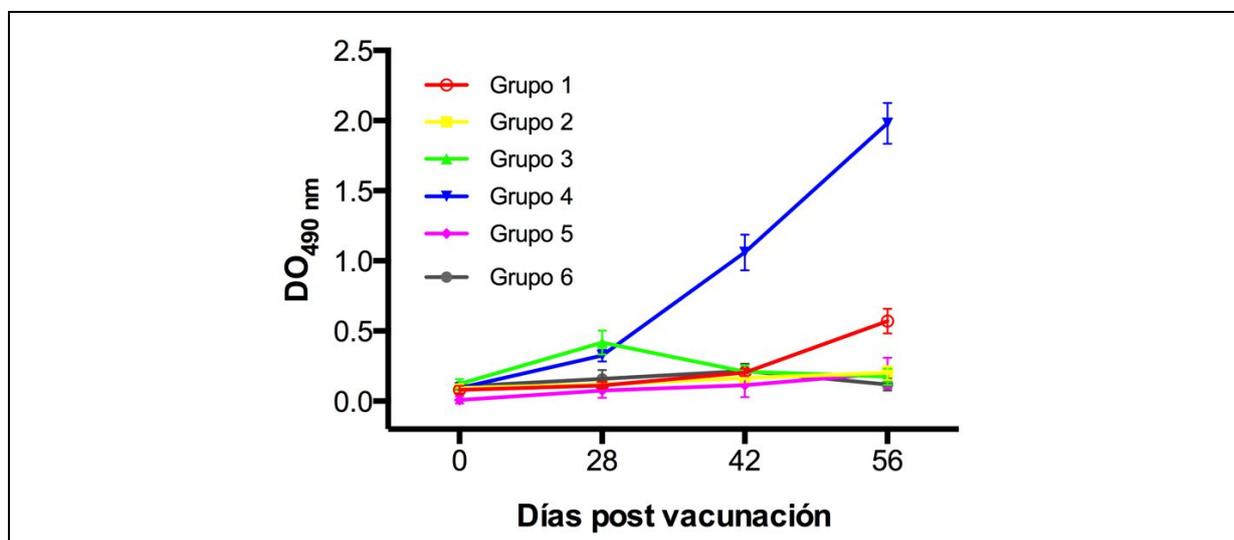


Figura 5.41. Respuesta de anticuerpos totales anti-VP6 de RVC inducidos luego de la administración de los diferentes regímenes “*prime-and-boost*”. Los grupos indicados en el gráfico son los siguientes: los inmunizados con estrategias combinadas, Grupo 1, [pCI/VP6C] y HSV_s[VP6C] y Grupo 3, HSV_s[VP6C] y [pCI/VP6C], los inmunizados con estrategias homólogas, Grupo 2: [pCI/VP6C] y Grupo 4: HSV_s[VP6C], finalmente los grupos control Grupos 5 y 6 inmunizados con [pCI-neo] y HSV_s[EGFP] respectivamente. Las curvas resultan de la medición de anticuerpos por medio de ELISA específico para la determinación de anticuerpos totales. Los días post vacunación y muestreo de suero, son los que se muestran en el eje X. Los puntos representan los valores de DO_{490 nm} medios que se alcanzan en cada grupo en diferentes días de muestreo. Las barras de error muestran los errores estándar de la media.

5.10.4 Respuesta humoral específica para MSP5

En primera instancia se analizó el nivel de anticuerpos específicos generado contra MSP5, por medio de un ELISA de competición (cELISA) con un anticuerpo monoclonal. La respuesta generada, aplicando el esquema de inmunizaciones de la Tabla 5, Sección 4.25, indica que en los animales del grupo que recibió dos dosis de 10 μg de proteína recombinante rMSP5-MBP, elevó rápidamente la respuesta específica de anticuerpos a los 28 dpv, presentando un valor medio de $\text{DO}=0,646$. Luego de la dosis de refuerzo con el mismo antígeno, se alcanza el máximo al día 35 post-vacunación, con una $\text{DO}=0,947$. El grupo con un *priming* con rMSP5, que recibió un refuerzo con HSV_s[MSP5] de 10^6 UT, no mostró un aumento en el título de anticuerpos, pero éstos anticuerpos se mantuvieron hasta 200 dpv ($\text{DO}=0,606$). En el grupo que recibió una primera dosis de vector HSV_s[MSP5], no indujo niveles de anticuerpos a los 28 dpv, aunque luego del refuerzo con proteína rMSP5, se produjo un aumento rápido de anticuerpos específicos, llegando a un nivel de $\text{DO}=0,525$ a los 200 dpv. Desde el día 56 no se pudo detectar diferencias entre los grupos inmunizados con esquemas heterólogos vector/proteína o proteína/vector, registrándose valores de p mucho mayores a 0,05.

En el final del experimento, a los 200 días de la primera dosis, no se observaron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos alcanzados con dos dosis de antígeno recombinante purificado (rMSP5/rMSP5), respecto al grupo estimulado primero con HSV_s[MSP5] seguido de rMSP5 ($p=0,839$), o el régimen de inmunización invertido ($p=0,999$); (Figura 5.42).

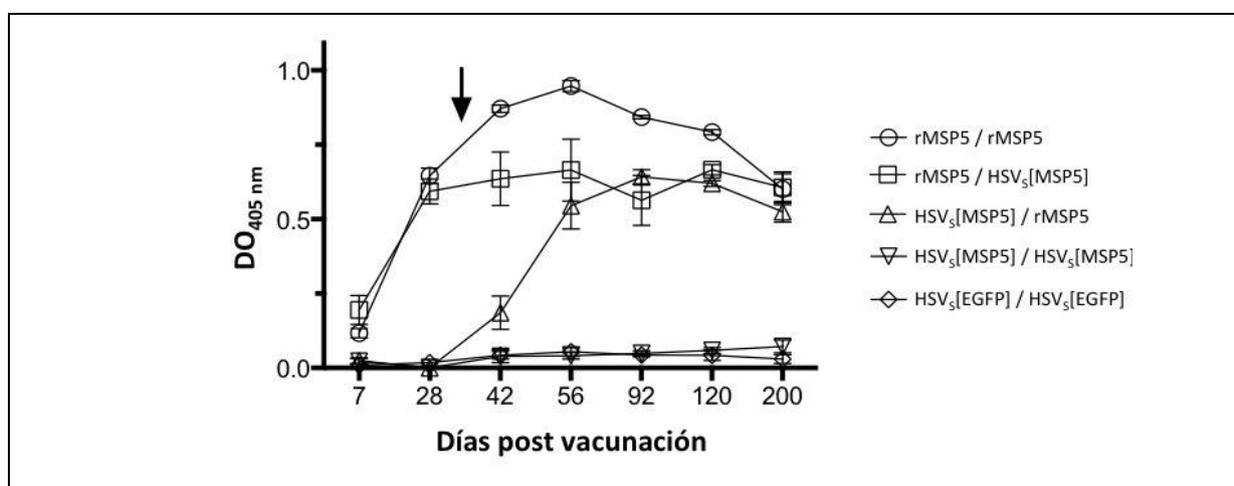


Figura 5.42. Cinética de anticuerpos monoespecíficos de MSP5 medidos con cELISA. Respuesta de anticuerpos estimulada luego de la administración de HSV_s[MSP5] y/o rMSP5-MBP, en ratones Balb/c. Las curvas resultan de la medición de anticuerpos por medio de ELISA de competición con un anticuerpo monoclonal, ANAF16C, por un epítipo conservado de MSP5. Los días post vacunación son los que se muestran en el eje X. Los puntos representan los valores de DO_{405 nm} medios que se alcanzan en cada grupo en diferentes días de muestreo. Las barras de error muestran los errores estándar de la media.

Grupos: (O): rMSP5/rMSP5; (□): rMSP5/HSV_s[MSP5]; (Δ): HSV_s[MSP5]/rMSP5; (▽): HSV_s[MSP5]/HSV_s[MSP5]; (◇): HSV_s[EGFP]/HSV_s[EGFP]

El régimen homólogo de “*prime-and-boost*” con el vector amplicón, HSV_s[MSP5]/HSV_s[MSP5], no generó aumento detectable de anticuerpos específicos y fue indistinguible del grupo control negativo inoculado con HSV_s[EGFP] ($p=0,502$) (Figura 5.42).

En la evaluación de los anticuerpos totales generados contra MSP5, se obtiene un comportamiento similar (Figura 5.43), confirmando los resultados obtenidos con la medición por cELISA, que sólo indica la generación de anticuerpos dirigidos contra un epítipo de la proteína MSP5 reconocido por el anticuerpo monoclonal ANAF16C1.

En síntesis, a los 28 días, con una sola dosis, los regímenes que recibieron una dosis de proteína recombinante presentan un aumento rápido del título de anticuerpos no pudiendo diferenciarse significativamente entre sí ($p=0,05$). En cambio, en el grupo de animales vacunado con el vector amplicón HSV_s[MSP5] no se aprecia la aparición de anticuerpos y no se diferencia del grupo control negativo (HSV_s[EGFP]).

A partir del refuerzo (segunda dosis) con proteína rMSP5-MBP, se produce un aumento de anticuerpos, incluido el grupo que recibió la primera dosis con HSV_s[MSP5]. Este último supera, aunque no significativamente al nivel de anticuerpos del grupo que recibió la primera dosis de proteína y refuerzo con vector. Se observa que el refuerzo con vector viral no produce aumento de anticuerpos pero mantiene sostenidamente el nivel alcanzado por la primera dosis con proteína recombinante.

A los 200 días, el grupo que recibe las dos dosis de vector se mantiene negativo. Los dos grupos de régimen heterólogo llegan a niveles similares aunque con distinta cinética, y el grupo inmunizado sólo con proteína, que alcanza los valores más altos de anticuerpos, comienza a descender a niveles similares a los dos grupos anteriores.

Estadísticamente, para el caso del grupo rMSP5/rMSP5 comparado con el grupo inmunizado con el esquema heterólogo, rMSP5-MBP/HSV_s[MSP5] se determinó un $p=0,62$ y para el grupo HSV_s[MSP5]/rMSP5-MBP un $p=0,075$. Además los esquemas de inmunización heterólogos tampoco presentan diferencias entre sí, resultando del análisis un valor de $p=0,869$.

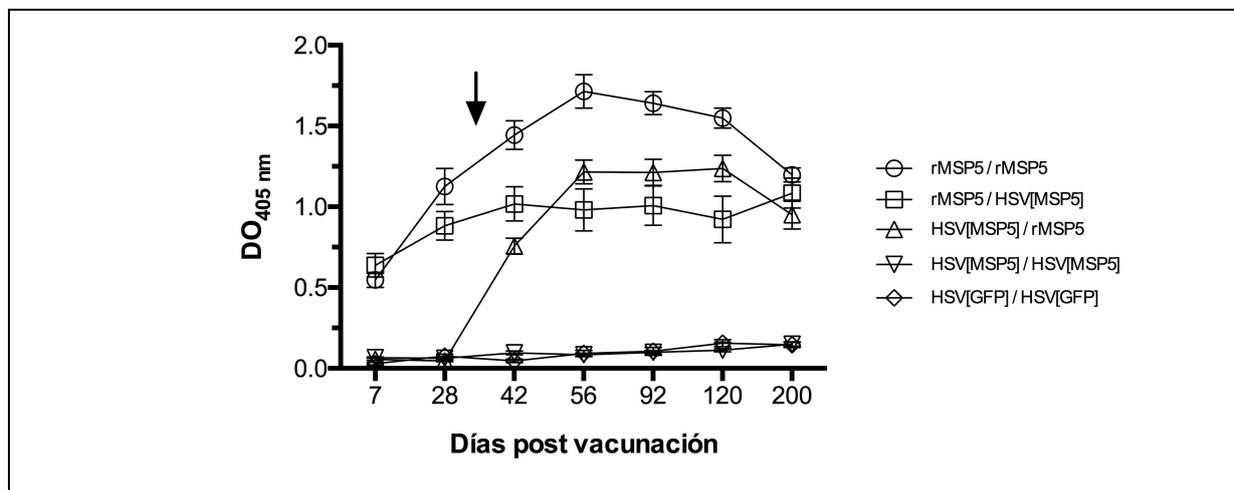


Figura 5.43. Cinética de anticuerpos específicos totales de MSP5 medidos con ELISA. Respuesta de anticuerpos estimulada luego de la administración de HSV_s[MSP5] y/o rMSP5-MBP, en ratones Balb/c. Las curvas resultan de la medición de anticuerpos totales por medio de ELISA. Los días post vacunación son los que se muestran en el eje X. Los puntos representan los valores de DO_{405 nm} medios que se alcanzan en cada grupo en diferentes días de muestreo. Las barras de error muestran los errores estándar de la media.

Grupos: (O): rMSP5/rMSP5; (□): rMSP5/HSV_s[MSP5]; (Δ): HSV_s[MSP5]/rMSP5; (∇): HSV_s[MSP5]/HSV_s[MSP5]; (◇): HSV_s[EGFP]/HSV_s[EGFP]

5.10.5 Ensayo de linfoproliferación específica en respuesta a MSP5

Los ensayos de linfoproliferación se llevaron a cabo al finalizar la evaluación del perfil de anticuerpos, a los 200 días post-primera dosis. Los resultados de este experimento muestran la respuesta inmune celular, luego de estimular los cultivos de esplenocitos obtenidos de los ratones de todos los grupos, con rMSP5-H₆ o ConA como pan-estimulador de respuesta celular.

Los IE de los grupos de ratones que recibieron una o dos dosis de los vectores amplicón fueron mayores a los obtenidos en los grupos que recibieron dos dosis de proteína recombinante purificada (Figura 5.44). El valor más alto obtenido es el que se registra en el grupo inmunizado con régimen heterólogo en el cual se inmuniza primero con la proteína recombinante purificada, seguido de 10⁶ partículas de vector amplicón que expresa MSP5 ($p=0.01$).

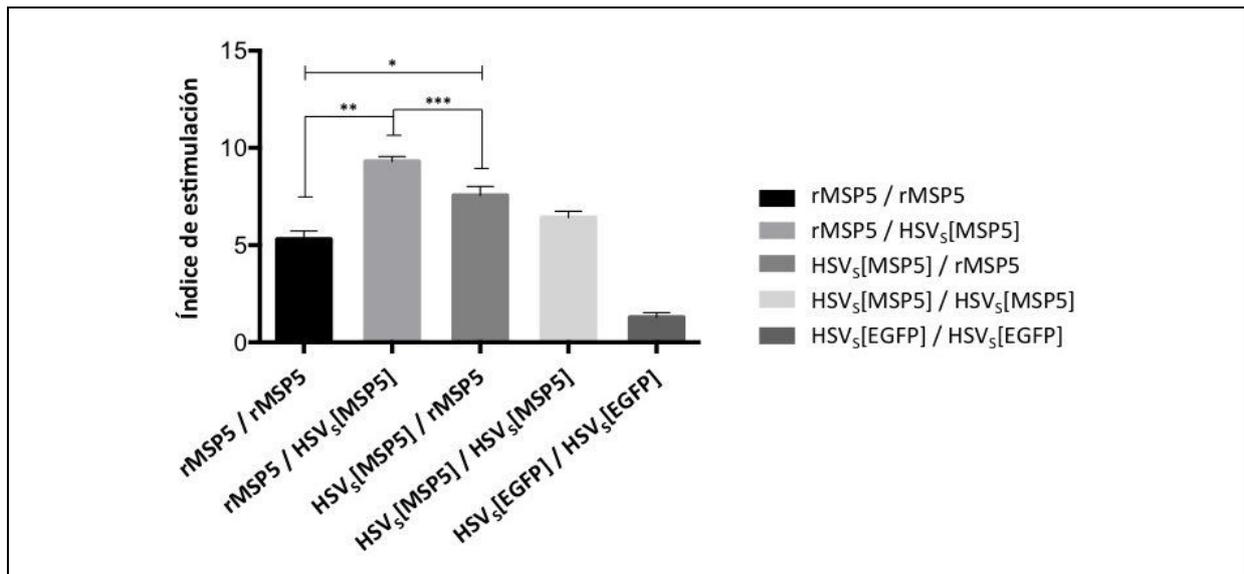


Figura 5.44. Ensayo de linfoproliferación específica con rMSP5. La respuesta de proliferación, se midió a 200 días post-vacunación. El índice de estimulación se calculó como se indica en Materiales y Métodos y los valores representan los valores medios obtenidos para cada grupo experimental, las barras de error representan el desvío estándar y los asteriscos sobre las barras resaltan los valores relevantes de p : * $p=0.04$; ** $p=0.01$; *** $p=0.0006$, entre los grupos indicados por las líneas.

6 Discusión

El presente trabajo de tesis doctoral estuvo enmarcado en el consorcio de colaboración internacional del Proyecto HEVAR, enfocado en la generación y evaluación de vectores herpéticos contra infecciones por rotavirus, el agente etiológico más importante de la diarrea con deshidratación, en bebés y niños en los países en desarrollo. A nivel local, este proyecto reunió investigadores de la Universidad Nacional del Litoral, la Universidad Nacional de Quilmes y del Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein de CONICET. Los grupos científicos de la Universidad de Lyon (Francia), Universidad de Zúrich (Suiza) y Universidad de Ferrara (Italia), aportaron los sistemas de vectores virales utilizados, y su extensa experiencia en terapia génica; el grupo de la Universidad de Múnich (Alemania) y la UNQ realizaron aportes sobre aspectos inmunológicos, y la UNL y CONICET sobre aspectos de biología molecular, cultivos celulares y virología básica y molecular.

El proyecto de tesis estuvo centrado en la construcción y producción de vectores para la expresión de genes que codifican para proteínas estructurales del RV humano de la cepa Wa del grupo antigénico A. En el desarrollo del trabajo se experimentó la expresión de genes reporteros (EGFP y β -galactosidasa), la producción de vectores desarrollados por otros grupos del proyecto con un RV del grupo antigénico C y RV animales de la cepa simia RRV y murina EC. Igualmente, investigadores del ICT Milstein-CONICET habían trabajado previamente en la generación de VLPs del Virus de la Fiebre Aftosa con un amplicón herpético, y finalmente en el marco de este trabajo, se incorporó un proyecto colaborativo con INTA Rafaela sobre expresión de antígenos de la rickettsia *Anaplasma marginale*.

De esta forma, se logró evaluar en forma primaria distintos sistemas de vectores herpéticos expresando antígenos de diverso origen.

Los sistemas de virus defectivos y vectores amplicón basados en HSV-1 son muy interesantes dado que, entre otras cosas, presentan una gran seguridad por su incapacidad de producir progenie infecciosa y sintetizan las proteínas recombinantes solamente en las células en las que ingresaron inicialmente. Esta síntesis en las células transducidas, y la posterior presentación antigénica al sistema inmunológico del huésped, brinda el potencial de generar una respuesta inmune humoral y celular específica y duradera.

Los resultados obtenidos en este trabajo se organizaron en tres secciones diferenciadas: (i) la generación de los vectores virales, (ii) la evaluación de expresión de los transgenes, y (iii) la respuesta inmune generada luego de inoculación de animales de laboratorio con algunos vectores virales seleccionados.

6.1 Generación de los vectores virales

Los vectores herpéticos generados fueron de distinto tipo:

1- Vectores virales **herpéticos, basados en virus recombinantes defectivos** en su replicación, delecionados en el gen ICP47 el cual participa en la evasión del sistema inmunológico mediada por el virus, y en los genes esenciales inmediatos tempranos ICP4 e ICP27 para impedir su replicación. Estos vectores fueron desarrollados por el grupo de los Dres. Alberto Manservigi y Peggy Marconi (Universidad de Ferrara, Italia) y recibidos en el laboratorio para su producción. Expresan proteínas estructurales de RV de la cepa simia RRV y la cepa murina EC, y el virus parental que co-expresa la β -galactosidasa y EGFP, utilizado como control. Otro de los virus defectivos es el HSV-1 *LaLΔJ*, que fue utilizado como virus colaborador en uno de los sistemas de producción de amplicones (Dr. Alberto Epstein, Universidad de Lyon). A este virus, al que se le ha delecionado el gen esencial ICP4 y el factor de neurovirulencia ICP34.5, posee una secuencia de empaquetamiento ectópica de HSV-1, flanqueada por sitios de reconocimiento *loxP*, específicos para la recombinasa *Cre*.

2. Vectores virales **herpéticos tipo amplicón**, no poseen genes de herpesvirus, tienen una gran capacidad transgénica, son utilizados para expresar múltiples proteínas, empaquetados dentro de partículas de HSV-1, ya sea por medio del virus defectivo HSV-1 *LaLΔJ*, o por medio de un báculo (HSV-BAC) que porta el genoma de HSV-1 modificado para proveer las funciones colaboradoras, sin tener la posibilidad de empaquetarse. Utilizando como base los sistemas de plásmidos amplicón recibidos del laboratorio del Dr. Alberto Epstein (Universidad de Lyon) y del Dr. Cornel Fraefel (Universidad de Zúrich), estos fueron modificados para la expresión de proteínas estructurales de RV de la cepa humana Wa, de la proteína VP6 del RV tipo C no cultivable, de la proteína no estructural NSP4 (toxina viral) y del gen MSP5 de la rickettsia *Anaplasma marginale*.

3. Vectores virales **herpéticos tipo display**, diseñados para la expresión de epitopes foráneos insertados en la glicoproteína gC. El vector base (el báculo

HSV[$\Delta pac\Delta 27$]) fue recibido de la Universidad de Zúrich, y en él se introdujo por recombinación homóloga en un sistema procariota, el epítopo inmunodominante RGD del Virus de la Fiebre Aftosa.

Además de estos 3 tipos de vectores, se generó además una **vacuna genética** convencional con la proteína VP6 de RV de tipo C, virus que tiene la particularidad de no ser cultivable, y dos antígenos proteicos de **subunidad** con secuencias de la proteína MSP5 de *A. marginale*, a fin de utilizarlos en experimentos *in vivo* e *in vitro*.

La mayor parte de los experimentos de este trabajo se realizaron con los vectores amplicón. Todos los amplicones expresan el gen reportero EGFP. El vector base monocistrónico que expresa solamente EGFP, se utilizó como control negativo frente a la expresión de los demás antígenos heterólogos. A partir de uno de los plásmidos proveniente de la Universidad de Zúrich, se construyeron vectores bicistrónicos para la coexpresión de un gen heterólogo (Gx) y el reportero EGFP (HSV_S[EGFP/Gx]), y tricistrónicos, para la coexpresión de dos genes heterólogos (Gx y Gy) y el reportero EGFP (HSV_D[EGFP/Gx/Gy]). Los plásmidos amplicón fueron construidos con dos señales de HSV-1, *Oris* para permitir el origen de replicación de ADN, y *pac* para que curra el empaquetamiento de ADN del vector. También se utilizó un promotor inmediato temprano de HSV-1 (IE 4/5), y uno o dos sitios internos de reconocimiento por ribosomas (IRES) derivados de picornavirus, la señal de poliadenilación de SV40 (pA), para conducir la expresión de los genes heterólogos.

En la siguiente Tabla se presentan los vectores más importantes construidos en el curso de este trabajo.

Tabla 6. Transgenes expresados en vectores herpéticos

Tipo de vector	Nomenclatura	Proteína expresada
Vector amplicón	HSV _s [VP6]	VP6 (RV Wa)
	HSV _s [VP2]	VP2 (RV Wa)
	HSV _D [VP6/VP2]	VP6 + VP2 (RV Wa)
	HSV _s [VP7]	VP7(RV Wa)
	HSV _s [VP4]	VP4 (RV Wa)
	HSV _D [VP7/VP4]	VP7 + VP4 (RV Wa)
	HSV _s [NSP4]	NSP4 (RV Wa)
	HSV _s [MSP5]	AmMSP5
	HSV _s [VP6C]	VP6 (RV tipo C)
	HSV _s [EGFP]	EGFP
Virus display	HSV[Δ pac Δ 27/RGD]	RGD (VFA)
Virus recombinantes	T0ZGFP	β -gal y EGFP
	T0RRV-VP6	VP6 (RV EC)
	T0EC-VP6	VP6 (RV RRV)
	HSV-1La Δ J	<i>helper</i>

6.2 Expresión *in situ* de genes de Rotavirus por medio de amplicones herpéticos

La expresión de las proteínas de rotavirus por medio de los plásmidos amplicón encapsidados con virus colaborador, fue detectada por IF y Western Blot, en células transducidas no complementantes. Otros resultados mostrados en este trabajo fueron realizados con plásmidos amplicón encapsidados con el sistema libre de virus colaborador (bácmido HSV-BAC).

La expresión de las proteínas VP2, VP6, VP4, VP7 y NSP4 de RV humanos tipo A y la de VP6 de RV tipo C fue realizada con éxito (Palacios C. y col., 2015 y Rota R, Palacios C y col., *en preparación*). Con los vectores “dobles” se buscó por un lado, comprobar la posibilidad de expresar múltiples proteínas simultáneamente, y por otro favorecer la formación de VLPs, lo cual no fue específicamente explorado en este trabajo, pero fue

demostrado previamente en nuestro laboratorio con amplicones que expresan la poliproteína P1 que forma la cápside del Virus de la Fiebre Aftosa (D'Antuono y col., 2010) y por Laimbacher y col. (2012), para la cepa simia RRV de Rotavirus.

Con los vectores tricistrónicos (HSV_D[VP2/VP6] y HSV_D[VP4/VP7]) fue demostrada la expresión de las 3 proteínas, dos de rotavirus y EGFP, cuyas secuencias se encontraban separadas por IRES derivados de picornavirus. Una observación importante es que dentro de cada unidad de expresión encapsidada los niveles de expresión decrecen en la medida que los genes se distancian del promotor. Una mejora sustancial del sistema, en especial para el caso de combinaciones de secuencias codificantes más largas o complejas, sería incorporar otro promotor delante del segundo o tercer gen, en lugar del elemento IRES. Sin embargo, hay casos en que esta expresión diferencial se podría utilizar ventajosamente experimentando con el orden de los genes expresados, ya sea para lograr una combinación estequiométrica más favorable a la formación de VLPs, o bien para reducir los niveles de expresión en el caso de proteínas con actividad enzimática que pueden ser tóxicas para las células (como ocurre con la proteasa 3C del VFA).

Otro aspecto muy importante que se demuestra claramente, es que los amplicones son capaces de expresar los transgenes no solo en células transducidas en cultivo, sino también *in vivo*, observándose la expresión a las 24 horas post-inoculación de una suspensión de vectores amplicón que expresan EGFP en la oreja de un ratón Balb/c (Fig. 5.18).

6.3 Display en membrana del epítopo RGD del Virus de la Fiebre Aftosa

El virus recombinante defectivo HSV[Δ pac Δ 27/RGD], incorporó efectivamente la proteína quimérica gC-RGD a las partículas producidas (Fig. 5.22), aunque no se detectaron anticuerpos contra el VFA luego de su inoculación en ratones. Es posible que el epítopo, a pesar de ser expresado, no haya resultado expuesto de la manera correcta, ya que en experimentos de detección realizados con anticuerpos conjugados con oro coloidal, no se pudo marcar la envoltura de las partículas recombinantes obtenidas, por lo que se necesita continuar trabajando en la mejora de esta construcción, y/o en las condiciones de inmunización de los animales.

Paralelamente, se demostró la posibilidad de utilizarlo como *helper* para encapsidar además un plásmido amplicón con otro transgen (Fig. 5.24 y 5.25), generando partículas herpéticas funcionales. Esto es promisorio ya que le otorga una doble función a este sistema particular, de expresión de un gen heterólogo codificado en el amplicón empaquetado, combinado con la presentación de un epítipo inmunodominante del mismo u otro patógeno, en la envoltura de la partícula del vector viral.

6.4 Expresión de antígenos de RV animales a través de herpesvirus recombinantes defectivos

Los vectores virales basados en virus recombinantes se propagaron en monocapas de la línea celular Vero-7b, que es la línea que complementa la replicación de estos virus defectivos, por medio de la expresión constitutiva de *ICP4* e *ICP27* de HSV-1. A diferencia de los amplicones herpéticos, estos virus recombinantes son capaces de replicar en las Vero-7b presentando un efecto citopático característico, de modo que se puede monitorear el avance de la infección por medio de la observación por microscopía de campo claro de las monocapas, así como por observación directa de la expresión del gen reportero EGFP mediante microscopía de fluorescencia.

Cuando se infectan células que no complementan a estos virus defectivos, no se observa efecto citopático, pero se puede detectar la expresión del transgén heterólogo, (por ejemplo por IF) y del gen reportero EGFP.

Por otro lado, el virus defectivo HSV-1LaLΔJ se utilizó como colaborador para la producción de los vectores amplicón. Para determinar los títulos de los stocks de vectores obtenidos con este virus "*helper*", se utilizaron dos líneas celulares diferentes: Gli36 y Vero-7b. En monocapas de células Gli36 se cuantificó el número de partículas de vectores amplicón transducidas por contabilización de las células positivas para GFP, expresando el título de las producciones como Unidades Formadoras de Focos por unidad de volumen (UFF/ml). Cabe destacar que en esta línea celular el virus colaborador (HSV-1LaLΔJ) no causa efecto citopático.

Utilizando las células Vero-7b, que permiten la replicación de HSV-1LaLΔJ, se contabilizaron las placas de lisis originadas por el virus colaborador, expresando el título de los stocks como Unidades Formadoras de Placas por unidad de volumen

(UFP/ml). Con este sistema de doble titulación se pudo determinar la proporción vector/helper resultante de cada pasaje y en el stock final.

En el caso del virus recombinante T0ZGFP, se observó la expresión de los genes reporteros EGFP y β -galactosidasa, por medio de microscopía de fluorescencia y por tinción con X-gal, respectivamente.

Los virus recombinantes T0ECVP6 y T0RRVVP6 mostraron una buena expresión de VP6 comparable a la lograda con los vectores amplicón, pero resultaron inestables, encontrándose que la expresión se va perdiendo con los pasajes sucesivos. Ensayos de PCR sobre placas de lisis fluorescentes y no fluorescentes demostraron que no hubo pérdida de los transgenes, por lo que se especula que podría ocurrir un silenciamiento de la expresión con los pasajes sucesivos. Por este motivo, la producción de este tipo de vector herpético se discontinuó, y los experimentos en animales se realizaron fundamentalmente con los amplicones.

Además, en consulta con los demás integrantes del Proyecto HEVAR, fue sugerido que la proteína VP6 causaría cierta toxicidad a las células transducidas en cultivo, lo que podría favorecer el surgimiento de poblaciones que expresan niveles bajos del transgén.

6.5 Respuesta inmune a antígenos expresados a través de vectores herpéticos

Para explorar el uso de estos vectores como candidatos vacunales, se realizaron una serie de experimentos en animales con algunos de los vectores desarrollados.

En este trabajo se aplicaron estrategias "*prime-and-boost*" con la intención de establecer una respuesta inmune específica aumentada, por medio de la generación de niveles elevados anticuerpos y de células T (Ramshaw y Ramsay, 2000). En muchos casos descritos en la bibliografía un régimen heterólogo resulta más inmunogénico que un régimen homólogo, generando buena memoria inmunológica (Kardani y col., 2016; Lu, 2009). Por otro lado, si bien la presencia de anticuerpos anti-vector en el huésped, pueden determinar la eficacia de las inmunizaciones (de Mare y col., 2008; Saxena y col., 2013; Sprangers y col., 2003), existe evidencia obtenida por investigadores del proyecto HEVAR (Lauterbach y col., 2005), y otros autores (Brockman y Knipe, 2002; Hocknell y col., 2002), de que la generación de anticuerpos

contra vectores basados en HSV-1, puede interferir con estos vectores, pero no de una manera que inhibe completamente su efecto como vector viral.

En este sentido, en el presente trabajo se encontró que ratones inoculados con vectores amplicón que expresan el gen *msp5* de *Anaplasma marginale*, mostraron una respuesta inmune celular interesante, en ausencia de adyuvantes y de genes herpéticos (Palacios y col., 2014).

Adicionalmente, se determinó que la combinación de inoculaciones sucesivas con amplicones y con subunidades proteicas del mismo antígeno (rMSP5) en un régimen de tipo “*prime-and-boost*”, mostró que la respuesta humoral se desarrolla rápidamente luego de la administración del antígeno proteico, sea este inoculado antes o después del vector amplicón. Con cualquiera de los regímenes (proteína sola o régimen combinado vector/proteína, en cualquier orden) se alcanza, inclusive hasta luego de 200 días, el mismo nivel de anticuerpos (Fig. 5.42 y 5.43).

Sin embargo, en los ensayos de linfoproliferación los índices de estimulación fueron superiores en el caso de los regímenes mixtos (Fig. 5.44), en comparación con el grupo que sólo recibió la subunidad rMSP5 adyuvada. El grupo de ratones inmunizado sólo con vectores amplicón, mostró un índice de estimulación mayor al del grupo inmunizado solo con la subunidad rMSP5, aunque no se alcanzaron diferencias significativas (Palacios y col., 2014). Consideramos que estos resultados son importantes, ya que se ha demostrado que la inducción de tanto respuesta celular, como de anticuerpos que estén dirigidos a antígenos de superficie, son requeridos en una respuesta inmune protectora contra *A. marginale* (Brown y col., 1998; Han y col., 2010; Suarez y Noh, 2011), y en los grupos inmunizados con una combinación de inmunógenos, se consigue una respuesta inmune balanceada de larga duración.

Cabe destacar que en el sistema empleado, es posible coexpresar más de un gen heterólogo, por lo tanto es promisorio también pensar en la presentación de múltiples antígenos de superficie por medio de estos vectores virales. Hasta el momento en que se publicaron los resultados de este trabajo, sólo existía el reporte de un vector viral (basado en virus Vaccinia), para la expresión de *msp1a* de *A. marginale* (McGuire y col., 1994), en el cual los autores demuestran la inducción de una respuesta humoral específica. El uso de vectores basados en HSV-1 no está muy difundido como vector de proteínas de origen bacteriano, sin embargo existen antecedentes de que con éste tipo

de inmunógenos, se generaría una respuesta celular importante y de larga duración (Lauterbach y col., 2004), coincidiendo parcialmente con los resultados de este trabajo, por lo tanto consideramos una prueba de concepto interesante de que el sistema de vectores basados en HSV-1, pueden ser utilizados como inmunógenos.

En ensayos en animales, realizados con el amplicón que expresa la proteína de Rotavirus VP4 (HSV_s[VP4]), se consiguió un estímulo de la respuesta humoral con un título similar al de un suero de ratón inmunizado contra el virus completo, que se usó como control (Fig. 5.40). Estos resultados son importantes en el sentido de que los stocks de vectores producidos son capaces de sobre-expresar la proteína heteróloga *in vivo*, además de hacerlo también en cultivo de células de manera correcta (Fig. 5.2.5.1), induciendo una respuesta inmune específica con un antígeno que es responsable de la generación de anticuerpos neutralizantes. Recientemente se ha comprobado que otros sistemas como Adenovirus, en un régimen homólogo de “*prime-and-boost*”, no estimulan una respuesta humoral elevada expresando este antígeno (Girard y col., 2013), lo cual no ocurre con este vector basado en HSV-1, que representa un inmunógeno muy interesante para seguir explorando.

Con el vector amplicón que expresa la proteína VP6 del grupo C de RV, la generación de respuesta inmune humoral es muy interesante, ya, que se trata de un grupo de virus patógenos de difícil replicación en cultivos *in vitro* (Saif y col., 1988; Shinozaki y col., 1996; Tsunemitsu y col., 1991), resaltando la posibilidad de generar vacunas de nueva generación contra este tipo de agentes virales infecciosos. Respecto de la vacuna genética basada en ADN, probablemente el adyuvante utilizado que forma micropartículas oleosas (“*water-in-oil*”) no ha sido el adecuado, y debería analizarse una metodología de administración más apropiada.

En cuanto al uso de virus recombinantes, se pudo determinar que administrando el virus recombinante T0ZGFP por las vías i.p. y s.c. se obtiene una mayor respuesta que por las otras vías ensayadas, con lo cual identificó cual de las vías es la más adecuada para utilizar con las vacunas experimentales derivadas de este vector, en las condiciones de laboratorio y protocolos utilizados.

Además de los experimentos presentados en esta tesis, existen antecedentes recientes muy interesantes respecto al uso de vectores amplicón para la expresión de genes de Rotavirus y su uso como inmunógenos. En ensayos realizados en la UNQ por el

Proyecto HEVAR, amplicones que expresan las proteínas VP2/VP6/VP7 de RV (cepa simia RRV) fueron capaces de generar VLPs y en experimentos de desafío en un modelo murino de la enfermedad, los ratones inmunizados fueron protegidos frente al desafío con virus vivo homólogo (Laimbacher y col., 2012).

Por otro lado, ratones inoculados con amplicones que expresan la poliproteína P1 (VP1, 2, 3, 4) del VFA, fueron protegidos en ensayos de desafío con Virus de la Fiebre Aftosa, experimentos que fueron realizados en laboratorio de Bioseguridad NBS4 OIE, INTA-Castelar (D'Antuono y col., 2010). Estos mismos vectores amplicón resultaron superiores a vectores adenovirales que expresaban las proteínas de la cápside de la misma cepa viral del VFA, en ensayos de desafío *in vivo* (Romanutti y col., 2013).

Por lo expuesto, se considera que queda demostrada la prueba de concepto que se planteó en la hipótesis de este trabajo de tesis. Los trabajos con estos y otros vectores que se generaron con posterioridad, continúan desarrollándose en forma individual o bilateral entre los ex-integrantes del Proyecto HEVAR, y con otros consorcios internacionales formados recientemente, especialmente en este caso para su uso como terapia génica en neurobiología y cáncer.

7 Conclusiones

- Se construyeron diferentes vectores herpéticos, y se caracterizaron molecularmente, mediante mapeo con enzimas de restricción y secuenciación de las regiones modificadas.
- Los patrones de expresión de los genes estructurales de RV fueron los esperados.
- Se detectó la expresión de la proteína RV/VP6 por IF, formando un patrón de túbulos y fibras que son características de la infección natural por RV. También fue detectada por Western Blot, tanto en el vector simple, HSV_s[VP6], como en el doble, HSV_D[VP6/VP2].
- La expresión de la proteína RV/VP2, se detectó por medio de IF, luego de transducción con el vector HSV_s[VP2], y por Western Blot con el vector HSV_D[VP6/VP2].
- La expresión de la proteína RV/VP7 se observó con un patrón difuso en el citoplasma celular, tanto con el vector simple HSV_s[VP7], como con el doble HSV_D[VP7/VP4].

- Se detectó la expresión de la proteína RV/VP4 con los vectores HSV_S[VP4] y HSV_D[VP7/VP4].
- La expresión de la toxina viral NSP4 se detectó mediante Western Blot como una sola banda de aproximadamente 20 KDa, coincidiendo con una de las formas glicosiladas que se observan en monocapas de células MA104 infectadas con RV.
- Interacciones de proteínas virales y celulares: se observó la co-localización de la proteína RV/VP4 con filamentos celulares de actina.
- Se detectó por IF la expresión de la proteína MSP5 de la rickettsia *A. marginale*, utilizando el vector amplicón HSV_S[MSP5]. El patrón de IF indicaría la asociación de MSP5 a membranas celulares, considerando que es una proteína que tiene una región transmembrana.
- Los virus herpéticos recombinantes mostraron una expresión de la proteína RV/VP6, comparable a la de los amplicones, con la desventaja que resultaron inestables luego de pasajes sucesivos.
- El gen EGFP, utilizado como reportero para la titulación de los stocks producidos, se pudo visualizar por microscopía de fluorescencia en todas las construcciones.
- Se pudo observar expresión de GFP *in vivo* con el vector amplicón HSV_S[EGFP].
- Se estableció una plataforma de trabajo para la producción de los distintos vectores herpéticos, estandarizando los parámetros de cultivo, transfección, infección y titulación.
- Animales inmunizados con el virus recombinantes T0ZGFP desarrollo una respuesta humoral por dos vías diferentes, generando un antecedente muy importante para futuros experimentos.
- Los animales inoculados con diferentes vectores amplicón, evidenciaron una respuesta inmune humoral y celular.
- En el caso de la proteína MSP5 de *A. marginale*, la combinación de vector amplicón con subunidades proteicas en un régimen de inoculación de “*prime-and-boost*”, mostró que la respuesta humoral es más rápidamente desarrollada por la proteína, pero que la combinación con el vector permite desarrollar una respuesta celular importante cuando se compara a la generada solamente con proteína recombinante adyuvada.
- El uso de estos sistemas de vectores virales no replicativos de nueva generación, junto con estrategias de “*prime-and boost*”, muestran ser inmunogénicos contra los

antígenos analizados, y por lo tanto el establecimiento de esta plataforma representa una herramienta adicional a tener en cuenta, para la lucha contra enfermedades virales en el área veterinaria y humana.

8 Referencias

- Aboody-Guterman, K.S., Pechan, P.A., Rainov, N.G., Sena-Esteves, M., Jacobs, A., Snyder, E.Y., Wild, P., Schraner, E., Tobler, K., Breakefield, X.O., Fraefel, C. (1997) *Green fluorescent protein as a reporter for retrovirus and helper virus-free HSV-1 amplicon vector-mediated gene transfer into neural cells in culture and in vivo*. *Neurochemistry* 8: 3801–3808.
- 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: 3089–3098.
- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F. (1989) *The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution*. *Nature* 337: 709–716.
- Adah, M.I., Wade, A., Oseto, M., Kuzuya, M., Taniguchi, K. (2002) *Detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6, and VP7 proteins*. *J. Med. Virol.* 66: 269–275.
- Agnes, J.T., Brayton, K. a, LaFollett, M., Norimine, J., Brown, W.C., Palmer, G.H. (2011) *Identification of Anaplasma marginale outer membrane protein antigens conserved between A. marginale sensu stricto strains and the live A. marginale subsp. centrale vaccine*. *Infect. Immun.* 79: 1311–1318.
- Albarrak, S.M., Brown, W.C., Noh, S.M., Reif, K.E., Scoles, G. a, Turse, J.E., Norimine, J., Ueti, M.W., Palmer, G.H. (2012) *Subdominant antigens in bacterial vaccines: AM779 is subdominant in the Anaplasma marginale outer membrane vaccine but does not associate with protective immunity*. *PLoS One* 7: e46372.
- Ammerman, N.C., Beier-Sexton, M., Azad, A.F. (2008) *Growth and maintenance of Vero cell lines*. *Curr. Protoc. Microbiol.* Appendix 4: 1–10.
- Angel, J., Franco, M.A., Greenberg, H.B. (2007) *Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 529–539.
- Araújo, I.T., Heinemann, M.B., Fialho, A.M., Leite, J.P.G. (2011) *Detection and molecular characterization of human group C rotavirus in Brazil*. *Intervirology* 54: 261–267.

- Armah, G.E., Sow, S.O., Breiman, R.F., Dallas, M.J., Tapia, M.D., Feikin, D.R., Binka, F.N., Steele, A.D., Laserson, K.F., Ansah, N.A., Levine, M.M., Lewis, K., Coia, M.L., Attah-Poku, M., Ojwando, J., Rivers, S.B., Victor, J.C., Nyambane, G., Hodgson, A., Schödel, F., Ciarlet, M., Neuzil, K.M. (2010) *Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. *Lancet* 376: 606–614.
- Arnoldi, F., Campagna, M., Eichwald, C., Desselberger, U., Burrone, O.R. (2007) *Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2*. *J. Virol.* 81: 2128–2137.
- Aubry, P., Geale, D.W. (2011) *A review of bovine anaplasmosis*. *Transbound. Emerg. Dis.* 58: 1–30.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2007) *Current Protocols In Molecular Biology, Analytical Biochemistry*. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.
- Bachrach, H.L. (1968) *Foot-and-mouth disease*. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 201–244.
- Ball, J.M., Tian, P., Zeng, C.Q., Morris, A.P., Estes, M.K. (1996) *Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein*. *Science* 272: 101–104.
- Bányai, K., Jiang, B., Bogdán, A., Horváth, B., Jakab, F., Meleg, E., Martella, V., Magyari, L., Meleg, B., Szucs, G. (2006) *Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary*. *J. Clin. Virol.* 37: 317–322.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Lim, F., Domingo, E. (2001) *Foot-and-mouth disease virus lacking the VP1 G-H loop: the mutant spectrum uncovers interactions among antigenic sites for fitness gain*. *Virology* 288: 192–202.
- Barraza, R.A., Poeschla, E.M. (2008) *Human gene therapy vectors derived from feline lentiviruses*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123: 23–31.
- Barteling, S.J. (2004) *Modern inactivated foot-and-mouth disease (FMD) vaccines: historical background and key elements in production and use*. En: *Foot and Mouth Disease: Current Perspectives* (Eds.: Sobrino, F., Domingo, E.). CRC Press, Leiden, Países Bajos, pp. 305–333.
- Barton, E.S., White, D.W., Cathelyn, J.S., Brett-McClellan, K.A., Engle, M., Diamond, M.S.,

- Miller, V.L., Virgin, H.W. (2007) *Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection*. *Nature* 447: 326–329.
- Bataille, D., Epstein, A.L. (1995) *Herpes simplex virus type 1 replication and recombination*. *Biochimie* 77: 787–795.
- Bataille, D., Epstein, A.L. (1997) *Equimolar generation of the four possible arrangements of adjacent L components in herpes simplex virus type 1 replicative intermediates*. *J. Virol.* 71: 7736–7743.
- Baxt, B., Becker, Y. (1990) *The effect of peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells*. *Virus Genes* 4: 73–83.
- Baxt, B., Rieder, E. (2004) *Molecular Aspects of Foot-and-Mouth Disease Virus Virulence and Host Range*. En: *Foot and Mouth Disease: Current Perspectives*. (Eds.: Sobrino, F., Domingo, E.). CRC Press, Leiden, Países Bajos, pp. 146–172.
- Bertani, G. (1951) *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62: 293–300.
- Bertani, G. (2004) *Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems*. *J. Bacteriol.* 186: 595–600.
- Berto, E., Bozac, A., Marconi, P. (2005) *Development and application of replication-incompetent HSV-1-based vectors*. *Gene Ther.* 12 Suppl 1: S98–S102.
- Bimboim, H.C., Doly, J. (1979) *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513–1523.
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H., Ruck, B.J. (1973) *Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis*. *Lancet* 2: 1281–1283.
- 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.
- Blouin, E.F., Barbet, A.F., Yi, J., Kocan, K.M., Saliki, J.T. (2000) *Establishment and*

characterization of an Oklahoma isolate of Anaplasma marginale in cultured Ixodes scapularis cells. Vet. Parasitol. 87: 301–313.

Blouin, E.F., Kocan, K.M. (1998) *Morphology and development of Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) cells.* J. Med. Entomol. 35: 788–797.

Blutt, S.E., Warfield, K.L., Estes, M.K., Conner, M.E. (2008) *Differential requirements for T cells in viruslike particle- and rotavirus-induced protective immunity.* J. Virol. 82: 3135–3138.

Bock, R.E., de Vos, A.J. (2001) *Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence.* Aust. Vet. J. 79: 832–839.

Bowers, W.J., Howard, D.F., Brooks, A.I., Halterman, M.W., Federoff, H.J. (2001) *Expression of vhs and VP16 during HSV-1 helper virus-free amplicon packaging enhances titers.* Gene Ther. 8: 111–120.

Bråve, A., Ljungberg, K., Wahren, B., Liu, M.A. (2007) *Vaccine delivery methods using viral vectors.* Mol. Pharm. 4: 18–32.

Brayton, K. a, Kappmeyer, L.S., Herndon, D.R., Dark, M.J., Tibbals, D.L., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Knowles, D.P. (2005) *Complete genome sequencing of Anaplasma marginale reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102: 844–849.

Brockman, M.A., Knipe, D.M. (2002) *Herpes simplex virus vectors elicit durable immune responses in the presence of preexisting host immunity.* J. Virol. 76: 3678–3687.

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

Brooksby, J.B. (1982) *Portraits of viruses: foot-and-mouth disease virus.* Intervirology 18: 1–23.

Brown, W.C., Zhu, D., Shkap, V., McGuire, T.C., Blouin, E.F., Kocan, K.M., Palmer, G.H. (1998) *The Repertoire of Anaplasma marginale Antigens Recognized by CD4+ T-Lymphocyte Clones from Protectively Immunized Cattle Is Diverse and Includes Major Surface Protein 2 (MSP-2) and MSP-3.* Infect. Immun. 66: 5414–5422.

- Burman, A., Clark, S., Abrescia, N.G.A., Fry, E.E., Stuart, D.I., Jackson, T. (2006) *Specificity of the VP1 GH Loop of Foot-and-Mouth Disease Virus for v Integrins*. J. Virol. 80: 9798–9810.
- Burns, J.W., Siadat-Pajouh, M., Krishnaney, A.A., Greenberg, H.B. (1996) *Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity*. Science 272: 104–107.
- Burton, E.A., Bai, Q., Goins, W.F., Glorioso, J.C. (2001a) *Targeting gene expression using HSV vectors*. Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 155–170.
- Burton, E.A., Wechuck, J.B., Wendell, S.K., Goins, W.F., Fink, D.J., Glorioso, J.C. (2001b) *Multiple applications for replication-defective herpes simplex virus vectors*. Stem Cells 19: 358–377.
- Campbell, M.E., Palfreyman, J.W., Preston, C.M. (1984) *Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription*. J. Mol. Biol. 180: 1–19.
- Carrillo, C., Tulman, E.R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G.F., Rock, D.L. (2005) *Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus*. J. Virol. 79: 6487–6504.
- Cartwright, B., Chapman, W.G., Sharpe, R.T. (1982) *Stimulation by heterotypic antigens of foot-and-mouth disease virus antibodies in vaccinated cattle*. Res. Vet. Sci. 32: 338–342.
- Casas Olascoaga, R.C., Gomes, I., Rosemberg, F., Augé de Mello, P., Astudillo, V., Magallanes, N. (1999) *Fiebre Aftosa, 1st Ed. Organización Panamericana de La Salud*. Editora Ateneu, Rio de Janeiro, Brasil.
- Castello, A.A., Argüelles, M.H., Rota, R.P., Humphrey, C.D., Olthoff, A., Gentsch, J.R., Glass, R.I., Glikmann, G., Jiang, B. (2009) *Detection and characterization of group C rotavirus in Buenos Aires, Argentina, 1997-2003*. J. Med. Virol. 81: 1109–1116.
- Chayavichitsilp, P., Buckwalter, J. V, Krakowski, A.C., Friedlander, S.F. (2009) *Herpes simplex*. Pediatr. Rev. 30: 119–129.
- Chen, H., Xiang, Z.Q., Li, Y., Kurupati, R.K., Jia, B., Bian, A., Zhou, D.M., Hutnick, N., Yuan, S., Gray, C., Serwanga, J., Auma, B., Kaleebu, P., Zhou, X., Betts, M.R., Ertl, H.C.J. (2010)

- Adenovirus-based vaccines: comparison of vectors from three species of adenoviridae.* J. Virol. 84: 10522–10532.
- Chen, T., Hudnall, S.D. (2006) *Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection.* Mod. Pathol. 19: 726–37.
- Chinsangaram, J., Beard, C., Mason, P.W., Zellner, M.K., Ward, G., Grubman, M.J. (1998) *Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins.* J. Virol. 72: 4454–4457.
- Choi, A.H.-C., McNeal, M.M., Basu, M., Bean, J.A., Vancott, J.L., Clements, J.D., Ward, R.L. (2003) *Functional mapping of protective epitopes within the rotavirus VP6 protein in mice belonging to different haplotypes.* Vaccine 21: 761–767.
- Christy, C., Madore, H.P., Pichichero, M.E., Gala, C., Pincus, P., Vosefski, D., Hoshino, Y., Kapikian, A., Dolin, R. (1988) *Field trial of rhesus rotavirus vaccine in infants.* Pediatr. Infect. Dis. J. 7: 645–50.
- Coelho, A., Gasparini, M., Vieira, R., Nascimento, D., Silva, G., Giroto, A., Belussi, D., Higashi, D., Buosi, R., Zangirolamo, A., Matos, A., Marana, E., Garcia, J., Vidotto, M., Vidotto, O. (2010) *Induced immune response of DNA vaccine in bovines using msp1a, msp1b, msp5, Virb9 and Virb10 genes from the PR1 Strain of Anaplasma marginale.* En: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinaria. Colégio Brasileiro de Parasitología Veterinária, Campo Grande, MS, Brasil, p. AG20.
- Collen, T. (1994) *Foot-and-mouth disease (Aphthovirus): viral T cell epitopes.* En: Goddeeris, B.M.L., Morrison, W.I. (Eds.), Cell-Mediated Immunity in Ruminants. CRC Press, pp. 173–212.
- Contin, R., Arnoldi, F., Campagna, M., Burrone, O.R. (2010) *Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins.* J. Gen. Virol. 91: 1782–1793.
- Coste, A., Sirard, J.C., Johansen, K., Cohen, J., Kraehenbuhl, J.P. (2000) *Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea.* J. Virol. 74: 8966–8971.
- Cubillos, C., de la Torre, B.G., Jakab, A., Clementi, G., Borrás, E., Bárcena, J., Andreu, D., Sobrino, F., Blanco, E. (2008) *Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel*

dendrimeric peptide. J. Virol. 82: 7223–7230.

Cuchet, D., Ferrera, R., Lomonte, P., Epstein, A.L. (2005) *Characterization of antiproliferative and cytotoxic properties of the HSV-1 immediate-early ICP0 protein*. J. Gene Med. 7: 1187–1199.

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

Dark, M.J., Al-Khedery, B., Barbet, A.F. (2011) *Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of Anaplasma marginale*. Vaccine 29: 4923–4932.

de la Fuente, J., Kocan, K.M., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Claypool, P.L., Saliki, J.T. (2002) *Vaccination of cattle with Anaplasma marginale derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks*. Vet. Microbiol. 89: 239–251.

de Mare, A., Lambeck, A., Regts, J., van Dam, G., Nijman, H., Snippe, H., Wilschut, J., Daemen, T. (2008) *Viral vector-based prime-boost immunization regimens: a possible involvement of T-cell competition*. Gene Ther. 15:393–403.

de Silva, S., Bowers, W.J. (2009). *Herpes Virus Amplicon Vectors*. Viruses 1: 594–629.

Desselberger, U. (2014). *Rotaviruses*. Virus Res. 190: 75–96.

Díaz-Salinas, M.A., Silva-Ayala, D., López, S., Arias, C.F. (2014) *Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell*. J. Virol. 88: 4389–4402.

Domingo, E., Holland, J.J. (1997) *RNA virus mutations and fitness for survival*. Annu. Rev. Microbiol. 51: 151–178.

Dormitzer, P.R., Nason, E.B., Prasad, B.V.V. (2004) *Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus*. Mol. Biol. 81: 1053–1058.

Draper, S.J., Heeney, J.L. (2010) *Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer*. Nat. Rev. Microbiol. 8: 62–73.

- Ducken, D.R., Brown, W.C., Alperin, D.C., Brayton, K. a., Reif, K.E., Turse, J.E., Palmer, G.H., Noh, S.M. (2015) *Subdominant Outer Membrane Antigens in Anaplasma marginale: Conservation, Antigenicity, and Protective Capacity Using Recombinant Protein*. PLoS One 10: e0129309.
- Duerkop, B. a, Hooper, L. V. (2013) *Resident viruses and their interactions with the immune system*. Nat. Immunol. 14: 654–659.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R. (2001) *Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Erlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Erlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 2145–2165.
- Dunn, C.S., Donaldson, A.I. (1997) *Natural adaption to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus*. Vet. Rec. 141: 174–175.
- Efstathiou, S., Minson, A.C. (1995) *Herpes virus-based vectors*. Br. Med. Bull. 51, 45–55.
- Encke, J., Bernardin, J., Geib, J., Barbakadze, G., Bujdoso, R., Stremmel, W. (2006) *Genetic vaccination with Flt3-L and GM-CSF as adjuvants: Enhancement of cellular and humoral immune responses that results in protective immunity in a murine model of hepatitis C virus infection*. World J. Gastroenterol. 12: 7118–7125.
- Epstein, A.L. (2005a) *Present and future of herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-based amplicon vectors*. Pathol. Biol. 53: 1–3.
- Epstein, A.L. (2005b) *HSV-1-based amplicon vectors: design and applications*. Gene Ther. 12 Suppl 1: S154–S158.
- Epstein, A.L. (2009) *HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties--a review*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104: 399–410.
- Esona, M.D., Humphrey, C.D., Dennehy, P.H., Jiang, B. (2008) *Prevalence of group C rotavirus among children in Rhode Island, United States*. J. Clin. Virol. 42: 221–224.
- Estes, M.K., Cohen, J. (1989) *Rotavirus gene structure and function*. Microbiol. Rev. 53: 410–449.

- Estes, M.K., Crawford, S.E., Penaranda, M.E., Petrie, B.L., Burns, J.W., Chan, W.K., Ericson, B., Smith, G.E., Summers, M.D. (1987) *Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system*. J. Virol. 61: 1488–1494.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., Burrone, O.R. (1999) *Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo*. J. Gen. Virol. 80 (Pt 2): 333–339.
- Felsheim, R.F., Chávez, A.S.O., Palmer, G.H., Crosby, L., Barbet, A.F., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G. (2010) *Transformation of Anaplasma marginale*. Vet. Parasitol. 167: 167–174.
- Feng, N., Lawton, J.A., Gilbert, J., Kuklin, N., Vo, P., Prasad, B.V.V., Greenberg, H.B. (2002) *Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb*. J. Clin. Invest. 109: 1203–1213.
- Fleming, F.E., Böhm, R., Dang, V.T., Holloway, G., Haselhorst, T., Madge, P.D., Deveryshetty, J., Yu, X., Blanchard, H., von Itzstein, M., Coulson, B.S. (2014) *Relative roles of GM1 ganglioside, N-acylneuraminic acids, and $\alpha 2\beta 1$ integrin in mediating rotavirus infection*. J. Virol. 88: 4558–4571.
- Fox, G., Parry, N.R., Barnett, P. V, McGinn, B., Rowlands, D.J., Brown, F. (1989) *The Cell Attachment Site on Foot-and-Mouth Disease Virus Includes the Amino Acid Sequence RGD (Arginine-Glycine-Aspartic acid)*. J. Gen. Virol. 70 (Pt 3): 625–637.
- Fraefel, C., Marconi, P., Epstein, A.L. (2011) *Herpes Simplex Virus Type 1-Derived Recombinant and Amplicon Vectors*, En: *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols* (Eds.: Merten, O.-W., Al-Rubeai, M.), Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp.: 303–343.
- Fraefel, C., Song, S., Lim, F., Lang, P., Yu, L., Wang, Y., Wild, P., Geller, A.I. (1996) *Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells*. J. Virol. 70: 7190–7197.
- Franco, M. a, Angel, J., Greenberg, H.B. (2006) *Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines*. Vaccine 24: 2718–2731.
- Franco, M.A., Greenberg, H.B. (1997) *Immunity to rotavirus in T cell deficient mice*. Virology 238: 169–179.

- Franco, M.A., Greenberg, H.B. (1999) *Immunity to rotavirus infection in mice*. J. Infect. Dis. 179: S466–S469.
- Frenkel, N. (2006) *The history of the HSV amplicon: from naturally occurring defective genomes to engineered amplicon vectors*. Curr. Gene Ther. 6: 277–301.
- G Junior, D.S., Araújo, F.R., Almeida Junior, N.F., Adi, S.S., Cheung, L.M., Fragoso, S.P., Ramos, C.A.N., Oliveira, R.H.M. De, Santos, C.S., Bacanelli, G., Soares, C.O., Rosinha, G.M.S., Fonseca, A.H. (2010) *Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of Anaplasma marginale*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105: 843–849.
- Gabbay, Y.B., Borges, A.A., Oliveira, D.S., Linhares, A.C., Mascarenhas, J.D.P., Barardi, C.R.M., Simões, C.M.O., Wang, Y., Glass, R.I., Jiang, B. (2008) *Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil*. J. Med. Virol. 80: 1666–1674.
- Gallagher, S., Winston, S.E., Fuller, S.A., Hurrell, J.G.R. (2008) *Immunoblotting and Immunodetection*, En: *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, Unidad: 8.10.
- Gasparini, M., Vieira, R., Nascimento, D., Silva, G., Coelho, A., Giroto, A., Belussi, D., Higashi, D., Buosi, R., Zangirolamo, A., Matos, A., Marana, E., Garcia, J., Vidotto, M., Vidotto, O. (2010) *Immune response of bovines immunized with recombinant major surface proteins from the PR1 strain of Anaplasma marginale*, En: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinaria. Colégio Brasileiro de Parasitología Veterinária, Campo Grande, MS, Brasil, p.: AG19.
- Gasparini, M.R., Vieira, R.F.D.C., Nascimento, D.A.G. Do, Garcia, J.L., Vidotto, O., Vidotto, M.C. (2013) *Immune response of calves inoculated with proteins of Anaplasma marginale bound to an immunostimulant complex*. Brazilian J. Vet. Parasitol. 22: 253–259.
- Giraldez, A. (2013) *Construcción de un sistema de genética reversa del virus de la fiebre aftosa*. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires.
- Girard, A., Roques, E., St-Louis, M.-C., Massie, B., Archambault, D. (2013) *Expression of human rotavirus chimeric fusion proteins from replicating but non disseminating adenovectors and elicitation of rotavirus-specific immune responses in mice*. Mol.

- Biotechnol. 54: 1010–1020.
- Glorioso, J.C. (2014) *Herpes simplex viral vectors: late bloomers with big potential*. Hum. Gene Ther. 25: 83–91.
- Glorioso, J.C., Goins, W.F., Meaney, C.A., Fink, D.J., DeLuca, N.A. (1994) *Gene transfer to brain using herpes simplex virus vectors*. Ann. Neurol. 35: S28–S34.
- Gray, J., Desselberger, U., Iturriza-Gómara, M. (2010) *Rotaviruses*, En: *Methods in Molecular Biology* (Eds.: Gray, J., Desselberger, U.). Humana Press Inc., Totowa, NJ, Totowa, NJ, pp.: 325–355.
- Grieger, J.C., Samulski, R.J. (2005) *Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications*. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 99:119-145.
- Grubman, M.J., Lewis, S.A., Morgan, D.O. (1993) *Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems*. Vaccine 11: 825–829.
- Gutierrez, M., Isa, P., Sanchez-San Martin, C., Perez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C.F., Lopez, S. (2010) *Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis*. J. Virol. 84: 9161–9169.
- Hammac, G.K., Ku, P.S., Galletti, M.F., Noh, S.M., Scoles, G.A., Palmer, G.H., Brayton, K.A. (2013) *Protective immunity induced by immunization with a live, cultured Anaplasma marginale strain*. Vaccine 31: 3617–3622.
- Han, S., Norimine, J., Brayton, K. a, Palmer, G.H., Scoles, G. a, Brown, W.C. (2010) *Anaplasma marginale infection with persistent high-load bacteremia induces a dysfunctional memory CD4+ T lymphocyte response but sustained high IgG titers*. Clin. Vaccine Immunol. 17: 1881–1890.
- Hanahan, D. (1983) *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J. Mol. Biol. 166: 557–580.
- Herndon, D.R., Palmer, G.H., Shkap, V., Knowles, D.P., Brayton, K.A. (2010) *Complete genome sequence of Anaplasma marginale subsp. centrale*. J. Bacteriol. 192: 379–80.

- Hocknell, P.K., Wiley, R.D., Wang, X., Evans, T.G., Bowers, W.J., Hanke, T., Federoff, H.J., Dewhurst, S. (2002) *Expression of human immunodeficiency virus type 1 gp120 from herpes simplex virus type 1-derived amplicons results in potent, specific, and durable cellular and humoral immune responses*. J. Virol. 76: 5565–5580.
- Hu, L., Crawford, S.E., Czako, R., Cortes-Penfield, N.W., Smith, D.F., Le Pendu, J., Estes, M.K., Prasad, B.V.V. (2012a) *Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen*. Nature 485: 256–259.
- Hu, L., Crawford, S.E., Hyser, J.M., Estes, M.K., Prasad, B.V.V. (2012b) *Rotavirus non-structural proteins: Structure and function*. Curr. Opin. Virol. 2: 380–388.
- Ish-Horowicz, D., Burke, J.F. (1981) *Rapid and efficient cosmid cloning*. Nucleic Acids Res. 9: 2989–2898.
- Jaimes, M.C., Rojas, O.L., Kunkel, E.J., Lazarus, N.H., Soler, D., Butcher, E.C., Bass, D., Angel, J., Franco, M.A., Greenberg, H.B. (2004) *Maturation and Trafficking Markers on Rotavirus-Specific B Cells during Acute Infection and Convalescence in Children*. J. Virol. 78: 10967–10976.
- Jayaram, H., Estes, M.K., Prasad, B.V.V. (2004) *Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication*. Virus Res. 101: 67–81.
- Jensen, F.C., Girardi, A.J., Gilden, R. V, Koprowski, H. (1964) *Infection of Human and Simian Tissue Cultures With Rous Sarcoma Virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 52: 53–59.
- Jerusalinsky, D., Baez, M.V., Epstein, A.L. (2012) *Herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors for fundamental research in neurosciences and gene therapy of neurological diseases*. J. Physiol. Paris 106: 2–11.
- Kano, F.S., Tamekuni, K., Coelho, A.L., Garcia, J.L., Vidotto, O., Itano, E.N., Vidotto, M.C. (2008) *Induced immune response of DNA vaccine encoding an association MSP1a, MSP1b, and MSP5 antigens of Anaplasma marginale*. Vaccine 26: 3522–3527.
- Kapikian, A.Z., Hoshino, Y., Chanock, R.M., Perez-Schael, I. (1996) *Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine*. Arch. Virol. Suppl. 12: 163–175.

- Kapikian, A.Z., Simonsen, L., Vesikari, T., Hoshino, Y., Morens, D.M., Chanock, R.M., La Montagne, J.R., Murphy, B.R. (2005) *A hexavalent human rotavirus-bovine rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in developing countries and delivered in a schedule with the potential to eliminate the risk of intussusception*. J. Infect. Dis. 192 Suppl: S22–S29.
- Kardani, K., Bolhassani, A., Shahbazi, S. (2016) *Prime-boost vaccine strategy against viral infections: Mechanisms and benefits*. Vaccine 34: 413–423.
- Kashima, T., Vinters, H. V., Campagnoni, A.T. (1995) *Unexpected expression of intermediate filament protein genes in human oligodendrogloma cell lines*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 54: 23–31.
- Kaufman, H.E., (2005) *HSV-1 DNA in tears and saliva of normal adults*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 46: 241–247.
- Kawasaki, P.M., Kano, F.S., Tamekuni, K., Garcia, J.L., Marana, E.R.M., Vidotto, O., Vidotto, M.C. (2007) *Immune response of BALB/c mouse immunized with recombinant MSPs proteins of Anaplasma marginale binding to immunostimulant complex (ISCOM)*. Res. Vet. Sci. 83: 347–354.
- Kennedy, P.G. (1997) *Potential use of herpes simplex virus (HSV) vectors for gene therapy of neurological disorders*. Brain 120 (Pt 7: 1245–1259.
- Khamrin, P., Peerakome, S., Malasao, R., Mizuguchi, M., Okitsu, S., Ushijima, H., Maneekarn, N. (2008) *Genetic characterization of group C rotavirus isolated from a child hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand*. Virus Genes 37: 314–321.
- Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Malcom, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (2007) *Field's Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Knowles, D., Torioni de Echaide, S., Palmer, G., McGuire, T., Stiller, D., McElwain, T. (1996) *Antibody against an Anaplasma marginale MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle*. J. Clin. Microbiol. 34: 2225–2230.
- Kocan, K.M., Blouin, E.F., Barbet, A.F. (2000) *Anaplasmosis control. Past, present, and future*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 916: 501–509.

- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A. (2010) *The natural history of Anaplasma marginale*. Vet. Parasitol. 167: 95–107.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Garcia-Garcia, J.C. (2004) *Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia*. Parasitology 129: S285–S300.
- Kocan, K.M., De la Fuente, J., Guglielmone, A.A., Meléndez, R.D. (2003) *Antigens and Alternatives for Control of Anaplasma marginale Infection in Cattle*. Clin. Microbiol. Rev. 16: 698–712.
- Kocan, K.M., Halbur, T., Blouin, E.F., Onet, V., De La Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Saliki, J.T. (2001) *Immunization of cattle with Anaplasma marginale derived from tick cell culture*. Vet. Parasitol. 102: 151–161.
- König, G.A., Palma, E.L., Maradei, E., Piccone, M.E. (2007) *Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus types A and O isolated in Argentina during the 2000-2002 epizootic*. Vet. Microbiol. 124: 1–15.
- Krisky, D., Marconi, P., Goins, W.F., Glorioso, J.C. (1997) *Development of Replication-Defective Herpes Simplex Virus Vectors*, En: Gene Therapy Protocols. (Ed.: Robin, P.), Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, pp.: 79–102.
- Krisky, D.M., Marconi, P.C., Oligino, T., Rouse, R.J., Fink, D.J., Glorioso, J.C. (1997) *Rapid method for construction of recombinant HSV gene transfer vectors*. Gene Ther. 4: 1120–1125.
- Krisky, D.M., Wolfe, D., Goins, W.F., Marconi, P.C., Ramakrishnan, R., Mata, M., Rouse, R.J., Fink, D.J., Glorioso, J.C. (1998) *Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus reduces cytotoxicity and permits long-term gene expression in neurons*. Gene Ther. 5: 1593–1603.
- Kuklin, N.A., Rott, L., Feng, N.G., Conner, M.E., Wagner, N., Muller, W., Greenberg, H.B. (2001) *Protective intestinal anti-rotavirus B cell immunity is dependent on alpha(4)beta(7) integrin expression but does not require IgA antibody production*. J. Immunol. 166: 1894–1902.
- Kumazaki, M., Usuku, S. (2014) *Epidemiological and genetic analysis of human group C rotaviruses isolated from outbreaks of acute gastroenteritis in Yokohama, Japan*,

- between 2006 and 2012. Arch. Virol.* 159: 761–771.
- Lachmann, R. (2004) *Herpes simplex virus-based vectors. Int. J. Exp. Pathol.* 85: 177–190.
- Lachmann, R.H., Efstathiou, S. (1997) *The use of herpes simplex virus-based vectors for gene delivery to the nervous system. Mol. Med. Today* 3: 404–411.
- Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature* 227: 680–685.
- Laimbacher, A.S., Esteban, L.E., Castello, A.A., Abdusetir Cerfoglio, J.C., Argüelles, M.H., Glikmann, G., D'Antuono, A., Mattion, N., Berois, M., Arbiza, J., Hilbe, M., Schraner, E.M., Seyffert, M., Dresch, C., Epstein, A.L., Ackermann, M., Fraefel, C. (2012) *HSV-1 amplicon vectors launch the production of heterologous rotavirus-like particles and induce rotavirus-specific immune responses in mice. Mol. Ther.* 20: 1810–1820.
- Laimbacher, A.S., Fraefel, C. (2012) *Gene delivery using helper virus-free HSV-1 amplicon vectors. Curr. Protoc. Neurosci. Capítulo 4, Unidad 4.14.*
- Laimbacher, A.S., Fraefel, C. (2014) *HSV-1 Amplicon Vectors as Genetic Vaccines. Methods Mol. Biol.* 1144: 99–115.
- Lauterbach, H., Kerksiek, K.M., Busch, D.H., Berto, E., Bozac, A., Mavromara, P., Manservigi, R., Epstein, A.L., Marconi, P., Brocker, T. (2004) *Protection from Bacterial Infection by a Single Vaccination with Replication-Deficient Mutant Herpes Simplex Virus Type 1. J. Virol.* 78: 4020–4028.
- Lauterbach, H., Ried, C., Epstein, A.L., Marconi, P., Brocker, T. (2005) *Reduced immune responses after vaccination with a recombinant herpes simplex virus type 1 vector in the presence of antiviral immunity. J. Gen. Virol.* 86: 2401–2410.
- Logvinoff, C., Epstein, A.L. (2000a) *Genetic Engineering of Herpes Simplex Virus and Vector Genomes Carrying loxP Sites in Cells Expressing Cre Recombinase. Virology* 267: 102–110.
- Logvinoff, C., Epstein, A.L. (2000b) *Intracellular Cre-mediated deletion of the unique packaging signal carried by a herpes simplex virus type 1 recombinant and its relationship to the cleavage-packaging process. J. Virol.* 74: 8402–8412.
- Logvinoff, C., Epstein, A.L. (2001) *A novel approach for herpes simplex virus type 1*

- amplicon vector production, using the Cre-loxP recombination system to remove helper virus.* Hum. Gene Ther. 12: 161–167.
- Lopez, J.E., Siems, W.F., Palmer, G.H., Brayton, K.A., McGuire, T.C., Norimine, J., Brown, W.C. (2005) *Identification of novel antigenic proteins in a complex Anaplasma marginale outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping.* Infect. Immun. 73: 8109–8118.
- López, S., Arias, C.F. (2004) *Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance.* Trends Microbiol. 12: 271–278.
- López, T., Camacho, M., Zayas, M., Nájera, R., Sánchez, R., Arias, C.F., López, S. (2005) *Silencing the morphogenesis of rotavirus.* J. Virol. 79: 184–192.
- Lu, S. (2009) *Heterologous prime-boost vaccination.* Curr. Opin. Immunol. 21: 346–351.
- Lu, X., McDonald, S.M., Tortorici, M.A., Tao, Y.J., Vasquez-Del Carpio, R., Nibert, M.L., Patton, J.T., Harrison, S.C. (2008) *Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1.* Structure 16: 1678–1688.
- Luchs, A., do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky, M. (2015) *Phylogenetic analysis of human group C rotavirus circulating in Brazil reveals a potential unique NSP4 genetic variant and high similarity with Asian strains.* Mol. Genet. Genomics 290: 969–986.
- Mackem, S., Roizman, B. (1982) *Differentiation between alpha promoter and regulator regions of herpes simplex virus 1: the functional domains and sequence of a movable alpha regulator.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 4917–4921.
- Madin, S.H., Darby, N.B. (1958) *Established Kidney Cell Lines of Normal Adult Bovine and Ovine Origin.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98: 574–576.
- Maes, P., Matthijssens, J., Rahman, M., Van Ranst, M. (2009) *RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses.* BMC Microbiol. 9: 1-4.
- Mahy, B.W.J. (2005) *Foot-and-Mouth Disease Virus*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Malherbe, H., Harwin, R. (1963) *The cytopathic effects of vervet monkey viruses.* S. Afr. Med. J. 37: 407–11.

- Malirat, V., de Barros, J.J.F., Bergmann, I.E., Campos, R. de M., Neitzert, E., da Costa, E.V., da Silva, E.E., Falczuk, A.J., Pinheiro, D.S.B., de Vergara, N., Cirvera, J.L.Q., Maradei, E., Di Landro, R. (2007) *Phylogenetic analysis of foot-and-mouth disease virus type O re-emerging in free areas of South America*. *Virus Res.* 124: 22–8.
- Mandel, M., Higa, A. (1970) *Calcium-dependent bacteriophage DNA infection*. *J. Mol. Biol.* 53: 159–162.
- Manservigi, R., Argnani, R., Marconi, P. (2010) *HSV Recombinant Vectors for Gene Therapy*. *Open Virol. J.* 4: 123–156.
- Maradei, E., Malirat, V., Beascochea, C.P., Benitez, E.O., Pedemonte, A., Seki, C., Novo, S.G., Balette, C.I., D'Aloia, R., La Torre, J.L., Mattion, N., Toledo, J.R., Bergmann, I.E. (2013) *Characterization of a type O foot-and-mouth disease virus re-emerging in the year 2011 in free areas of the Southern Cone of South America and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region*. *Vet. Microbiol.* 162: 479–490.
- Marconi, P., Argnani, R., Berto, E., Epstein, A.L., Manservigi, R. (2009) *HSV as a Vector in Vaccine Development and Gene Therapy*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 655: 118–144.
- Marconi, P., Kriskey, D., Oligino, T., Poliani, P.L., Ramakrishnan, R., Goins, W.F., Fink, D.J., Glorioso, J.C. (1996) *Replication-defective herpes simplex virus vectors for gene transfer in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 11319–11320.
- Martí, S.G., Alcaraz, A., Valanzasca, P., McMullen, M., Standaert, B., Garay, U., Lepetic, A., Gomez, J. (2015) *Cost effectiveness evaluation of a rotavirus vaccination program in Argentina*. *Vaccine* 33: 5684–9560.
- Martin-Acebes, M. (2009) *Mecanismos de entrada y de organización del complejo de replicación del virus de la fiebre aftosa: estudio comparativo con el virus de la enfermedad vesicular del cerdo y el virus de la estomatitis vesicular*. Tesis Dr. la Univ. Autónoma Madrid. Universidad Autónoma de Madrid.
- Marton, S., Deák, J., Dóró, R., Csata, T., Farkas, S.L., Martella, V., Bányai, K. (2015) *Reassortant human group C rotaviruses in Hungary*. *Infect. Genet. Evol.* 34: 410–414.
- Mateu, M.G., Luz Valero, M., Andreu, D., Domingo, E. (1996) *Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition*. *J. Biol. Chem.* 271: 12814–12819.

- Mateu, M.G., Verdaguer, N. (2004) *Functional and structural aspects of the interaction of foot-and-mouth disease virus with antibodies*. En: *Foot and Mouth Disease: Current Perspectives*. (Eds.: Sobrino, F., Domingo, E.). CRC Press, Leiden, Países Bajos, p. 223–260.
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B. V, Cohen, J., Rey, F.A. (2001) *Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion*. EMBO J. 20: 1485–97.
- Matsuno, S., Inouye, S., Kono, R. (1977) *Plaque Assay of Neonatal Calf Diarrhea Virus and the Neutralizing Antibody in Human Sera*. J. Clin. Microbiol. 5: 1–4.
- Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S.M., Palombo, E. a, Iturriza-Gómara, M., Maes, P., Patton, J.T., Rahman, M., Van Ranst, M. (2008) *Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains*. J. Virol. 82: 3204–3219.
- Matthijnsens, J., Otto, P.H., Ciarlet, M., Desselberger, U., van Ranst, M., Johne, R. (2012) *VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation*. Arch. Virol. 157: 1177–1182.
- Mattion, N., Goris, N., Willems, T., Robiolo, B., Maradei, E., Beascochea, C.P., Perez, A., Smitsaart, E., Fondevila, N., Palma, E., De Clercq, K., La Torre, J. (2009) *Some guidelines for determining foot-and-mouth disease vaccine strain matching by serology*. Vaccine 27: 741–747.
- Mattion, N., König, G., Seki, C., Smitsaart, E., Maradei, E., Robiolo, B., Duffy, S., León, E., Piccone, M., Sadir, A., Bottini, R., Cosentino, B., Falczuk, A., Maresca, R., Periolo, O., Bellinzoni, R., Espinoza, A., Torre, J. La, Palma, E.L. (2004) *Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: characterisation of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease*. Vaccine 22: 4149–4162.
- McDonald, S.M., Matthijnsens, J., McAllen, J.K., Hine, E., Overton, L., Wang, S., Lemey, P., Zeller, M., Van Ranst, M., Spiro, D.J., Patton, J.T. (2009) *Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations*. PLoS Pathog. 5: e1000634.

- McGarey, D.J., Barbet, A.F., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Allred, D.R. (1994) *Putative adhesins of Anaplasma marginale: Major surface polypeptides 1a and 1b*. Infect. Immun. 62: 4594–4601.
- McGeoch, D.J., Dalrymple, M.A., Davison, A.J., Dolan, A., Frame, M.C., McNab, D., Perry, L.J., Scott, J.E., Taylor, P. (1988) *The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1*. J. Gen. Virol. 69: 1531–1574.
- McGuire, T.C., Stephens, E.B., Palmer, G.H., McElwain, T.F., Lichtensteiger, C.A., Leib, S.R., Barbet, A.F. (1994) *Recombinant vaccinia virus expression of Anaplasma marginale surface protein MSP-1a: effect of promoters, leader sequences and GPI anchor sequence on antibody response*. Vaccine 12: 465–471.
- McMahan, L., Schaffer, P.A. (1990) *The repressing and enhancing functions of the herpes simplex virus regulatory protein ICP27 map to C-terminal regions and are required to modulate viral gene expression very early in infection*. J. Virol. 64: 3471–3485.
- Mebus, C.A., Stair, E.L., Rhodes, M.B., Twiehaus, M.J. (1973) *Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent*. Vet. Pathol. 10: 45–64.
- Mebus, C.A., Underdahl, N.R., Rhodes, M.B., Twiehaus, M.J. (1969) *Further studies on neonatal calf diarrhea virus*. Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health Assoc. 73: 97–99.
- Medici, M.C., Abelli, L.A., Martinelli, M., Martella, V., Dettori, G., Chezzi, C. (2009) *Molecular characterization of group C rotaviruses detected in children in Italy*. J. Clin. Virol. 44: 62–65.
- Mertens, P.P.C., Attoui, H., Bamford, D.H. (2003) *The dsRNA segments and proteins of simian rotavirus A / SA11 [WWW Document]*. RNAs Proteins dsRNA Viruses. URL http://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/Rotavirus.htm (accessed 2.1.12).
- Mitui, M.T., Bozdayi, G., Dalgic, B., Bostanci, I., Nishizono, A., Ahmed, K. (2009) *Molecular characterization of a human group C rotavirus detected first in Turkey*. Virus Genes 39: 157–164.
- Mwangi, W., Brown, W.C., Lewin, H.A., Howard, C.J., Hope, J.C., Baszler, T.V., Caplazi, P., Abbott, J., Palmer, G.H. (2002) *DNA-encoded fetal liver tyrosine kinase 3 ligand and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor increase dendritic cell*

recruitment to the inoculation site and enhance antigen-specific CD4+ T cell responses induced by DNA vaccination of outbred animals. J. Immunol. 169: 3837–3846.

Mwangi, W., Brown, W.C., Splitter, G. a, Davies, C.J., Howard, C.J., Hope, J.C., Aida, Y., Zhuang, Y., Hunter, B.J., Palmer, G.H. (2007) *DNA vaccine construct incorporating intercellular trafficking and intracellular targeting motifs effectively primes and induces memory B- and T-cell responses in outbred animals. Clin. Vaccine Immunol. 14: 304–311.*

Mwangi, W., Brown, W.C., Splitter, G.A., Zhuang, Y., Kegerreis, K., Palmer, G.H. (2005) *Enhancement of antigen acquisition by dendritic cells and MHC class II-restricted epitope presentation to CD4+ T cells using VP22 DNA vaccine vectors that promote intercellular spreading following initial transfection. J. Leukoc. Biol. 78: 401–411.*

Neff, S., Sá-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P.W., Blystone, S.D., Brown, E.J., Baxt, B. (1998) *Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. J. Virol. 72: 3587–3594.*

Noh, S.M., Ueti, M.W., Palmer, G.H., Munderloh, U.G., Felsheim, R.F., Brayton, K.A. (2011) *Stability and tick transmission phenotype of gfp-transformed Anaplasma marginale through a complete in vivo infection cycle. Appl. Environ. Microbiol. 77: 330–334.*

O'Neal, C.M., Harriman, G.R., Conner, M.E. (2000) *Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A. J. Virol. 74: 4102–4109.*

O'Ryan, M. (2007) *Rotarix (RIX4414): an oral human rotavirus vaccine. Expert Rev. Vaccines 6: 11–19.*

Oberle, S.M., Palmer, G.H., Barbet, A.F. (1993) *Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of Anaplasma marginale. Infect. Immun. 61, 5245–5251.*

Oehmig, A., Fraefel, C., Breakefield, X.O. (2004) *Update on herpesvirus amplicon vectors. Mol. Ther. 10, 630–643.*

OIE, (2012) *Bovine Anaplasmosis*, En: OIE Terrestrial Manual. OIE, pp. 589–600.

Osten, P., Cetin, V.G.A., Grinevich, V., Cetin, A. (2007) *Viral vectors: a wide range of*

- choices and high levels of service.* Handb. Exp. Pharmacol. 2: 177–202.
- Ozuer, A., Wechuck, J.B., Goins, W.F., Wolfe, D., Glorioso, J.C., Atai, M.M. (2002) *Effect of genetic background and culture conditions on the production of herpesvirus-based gene therapy vectors.* Biotechnol. Bioeng. 77: 685–692.
- Palacios, C., Torioni de Echaide, S., Mattion, N. (2014) *Evaluation of the immune response to Anaplasma marginale MSP5 protein using a HSV-1 amplicon vector system or recombinant protein.* Res. Vet. Sci. 97: 514–520.
- Palmenberg, A.C. (1990) *Proteolytic processing of picornaviral polyprotein.* Annu. Rev. Microbiol. 44: 603–623.
- Palmer, G.H., Barbet, A.F., Cantor, G.H., McGuire, T.C. (1989) *Immunization of Cattle with the MSP-1 Surface Protein Complex Induces Protection against a Structurally Variant Anaplasma marginale Isolate.* Infect. Immun. 57: 3666–3669.
- Palmer, G.H., Munodzana, D., Tebele, N., Ushe, T., McElwain, T.F. (1994) *Heterologous strain challenge of cattle immunized with Anaplasma marginale outer membranes.* Vet. Immunol. Immunopathol. 42: 265–273.
- Pappenheimer, A.M., Enders, J.F. (1947) *Epidemic diarrheal disease of suckling mice. Inclusions in the intestinal epithelial cells.* J. Exp. Med. 85: 417–423.
- Pappenheimer, A.M., Sargent Cheever, F. (1948) *Epidemic diarrheal disease of suckling mice. Cytoplasmic inclusion bodies in intestinal epithelium in relation to the disease.* J. Exp. Med. 88: 317–324.
- Parashar, U., Steele, D., Neuzil, K., Quadros, C. De, Tharmaphornpilas, P., Serhan, F., Santosham, M., Patel, M., Glass, R. (2013) *Progress with rotavirus vaccines: summary of the Tenth International Rotavirus Symposium.* Expert Rev. Vaccines 12: 113–117.
- Passos, L.M.F. (2012) *In vitro cultivation of Anaplasma marginale and A. phagocytophilum in tick cell lines: a review.* Rev. Bras. Parasitol. Veterinária 21: 81–86.
- Patel, M.M., Steele, D., Gentsch, J.R., Wecker, J., Glass, R.I., Parashar, U.D. (2011) *Real-world Impact of Rotavirus Vaccination.* Pediatr. Infect. Dis. J. 30: S1–S5.
- Paton, D.J., Valarcher, J.F., Bergmann, I., Matlho, O.G., Zakharov, V.M., Palma, E.L.,

- Thomson, G.R. (2005) *Selection of foot and mouth disease vaccine strains--a review*. Rev. Sci. Tech. 24: 981–993.
- Patton, J.T. (2012) *Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world*. Discov. Med. 13: 85–97.
- Pereira, H.G. (1976) *Subtyping of foot-and-mouth disease virus*. Dev. Biol. Stand. 35, 167–174.
- Pereira, H.G. (1981) *Foot-and-mouth disease, in: Gibbs, E.P.J. (Ed.), Virus Diseases of Food Animals II: A World Geography of Epidemiology and Control*. London ; New York : Academic Press, 1981., London, pp.: 333–363.
- Preston, C.M. (1979) *Abnormal properties of an immediate early polypeptide in cells infected with the herpes simplex virus type 1 mutant tsK*. J. Virol. 32: 357–369.
- Preston, C.M., Frame, M.C., Campbell, M.E. (1988) *A complex formed between cell components and an HSV structural polypeptide binds to a viral immediate early gene regulatory DNA sequence*. Cell 52: 425–434.
- Rahman, M., Banik, S., Faruque, A.S.G., Taniguchi, K., Sack, D.A., Van Ranst, M., Azim, T., (2005) *Detection and Characterization of Human Group C Rotaviruses in Bangladesh*. J. Clin. Microbiol. 43: 4460–4465.
- Ramig, R.F. (2004) *Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection*. J. Virol. 78: 10213–10220.
- Ramshaw, I.A., Ramsay, A.J. (2000) *The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination*. Immunol. Today 21: 163–165.
- Robertson, B.H., Moore, D.M., Grubman, M.J., Kleid, D.G. (1983) *Identification of an exposed region of the immunogenic capsid polypeptide VP1 on foot-and-mouth disease virus*. J. Virol. 46: 311–316.
- Robiolo, B., Grigera, P.R., Periolo, O.H., Seki, C., Bianchi, T., Maradei, E., La Torre, J.L. (1995) *Assessment of foot and mouth disease vaccine potency by liquid-phase blocking ELISA: a proposal for an alternative to the challenge procedure in Argentina*. Vaccine 13: 1346–1352.
- Robiolo, B., La Torre, J., Maradei, E., Beascochea, C.P., Perez, A., Seki, C., Smitsaart, E.,

- Fondevila, N., Palma, E., Goris, N., De Clercq, K., Mattion, N. (2010) *Confidence in indirect assessment of foot-and-mouth disease vaccine potency and vaccine matching carried out by liquid phase ELISA and virus neutralization tests*. *Vaccine* 28: 6235–6241.
- Rodger, S.M., Bishop, R.F., Holmes, I.H. (1982) *Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant*. *J. Clin. Microbiol.* 16: 724–726.
- Rodríguez-Galván, A., Heredia, A., Plascencia-Villa, G., Ramírez, O.T., Palomares, L. a., Basiuk, V.A. (2008) *Scanning Tunneling Microscopy of Rotavirus VP6 Protein Self-Assembled into Nanotubes and Nanospheres*. *J. Scanning Probe Microsc.* 3: 25–31.
- Roizman, B., Zhou, G. (2015) *The 3 facets of regulation of herpes simplex virus gene expression: A critical inquiry*. *Virology* 479-480: 562–567.
- Romanutti, C., D'Antuono, A., Palacios, C., Quattrocchi, V., Zamorano, P., La Torre, J., Mattion, N. (2013) *Evaluation of the immune response elicited by vaccination with viral vectors encoding FMDV capsid proteins and boosted with inactivated virus*. *Vet. Microbiol.* 165: 333–340.
- Ruiz-Jarabo, C., Domingo, E., Garcia-Arriaza, J., Arias, A., Escarmis, C. (2004) *Quasispecies Dynamics and Evolution of Foot-and-Mouth Disease Virus*, En: *Foot and Mouth Disease: Current Perspectives*. (Eds.: Sobrino, F., Domingo, E.). CRC Press, Leiden, Países Bajos, pp. 262–304.
- Ruiz-Palacios, G.M., Pérez-Schael, I., Velázquez, F.R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S.C., Chevart, B., Espinoza, F., Gillard, P., Innis, B.L., Cervantes, Y., Linhares, A.C., López, P., Macías-Parra, M., Ortega-Barría, E., Richardson, V., Rivera-Medina, D.M., Rivera, L., Salinas, B., Pavía-Ruz, N., Salmerón, J., Rüttimann, R., Tinoco, J.C., Rubio, P., Nuñez, E., Guerrero, M.L., Yarzabal, J.P., Damaso, S., Tornieporth, N., Sáez-Llorens, X., Vergara, R.F., Vesikari, T., Bouckenooghe, A., Clemens, R., De Vos, B., O’Ryan, M., Human Rotavirus Vaccine Study Group, Velázquez, R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S.C., Chevart, B., Espinoza, F., Gillard, P., Innis, B.L., Cervantes, Y., Linhares, A.C., López, P., Macías-Parra, M., Ortega-Barría, E., Richardson, V., Rivera-Medina, D.M., Rivera, L., Salinas, B., Pavía-Ruz, N., Salmerón, J., Rüttimann, R., Tinoco, J.C., Rubio, P., Nuñez, E., Guerrero, L., Yarzabal, J.P., Damaso, S., Tornieporth, N., Sáez-Llorens, X., Vergara, R.F., Vesikari, T., Bouckenooghe, A., Clemens, R., Vos, B.

- De, Miguel O’Ryan, M.D. (2006) *Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis*. N. Engl. J. Med. 354: 11–22.
- Saeki, Y., Fraefel, C., Ichikawa, T., Breakefield, X.O., Chiocca, E.A. (2001) *Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome*. Mol. Ther. 3: 591–601.
- Saeki, Y., Ichikawa, T., Saeki, A., Chiocca, E.A., Tobler, K., Ackermann, M., Breakefield, X.O., Fraefel, C. (1998) *Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors*. Hum. Gene Ther. 9: 2787–2794.
- Saif, L.J., Terrett, L.A., Miller, K.L., Cross, R.F. (1988) *Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in a continuous cell line and characterization of the passaged virus*. J. Clin. Microbiol. 26: 1277–1282.
- Sakamoto, K., Yoshida, K. (2002) *Recent outbreaks of foot and mouth disease in countries of east Asia*. Rev. Sci. Tech. 21: 459–463.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F., David, R.W. (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3rd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Long Island, New York.
- Samuel, A.R., Knowles, N.J. (2001) *Foot-and-mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry*. Trends Genet. 17: 421–424.
- Santos, K., Duke, C.M.P., Dewhurst, S. (2006) *Amplicons as vaccine vectors*. Curr. Gene Ther. 6: 383–392.
- Saxena, M., Van, T.T.H., Baird, F.J., Coloe, P.J., Smooker, P.M. (2013) *Pre-existing immunity against vaccine vectors - friend or foe?* Microbiol. 159: 1–11.
- Schnagl, R.D., Boniface, K., Cardwell, P., McCarthy, D., Ondracek, C., Coulson, B., Erlich, J., Morey, F. (2004) *Incidence of group C human rotavirus in central Australia and sequence variation of the VP7 and VP4 genes*. J. Clin. Microbiol. 42: 2127–2133.
- Sekulovich, R.E., Leary, K., Sandri-Goldin, R.M. (1988) *The herpes simplex virus type 1 alpha protein ICP27 can act as a trans-repressor or a trans-activator in combination with ICP4 and ICP0*. J. Virol. 62: 4510–4522.

- Sena-Esteves, M., Saeki, Y., Fraefel, C., Breakefield, X.O. (2000) *HSV-1 amplicon vectors--simplicity and versatility*. *Mol. Ther.* 2: 9–15.
- Shaw, A.R. (2013) *The rotavirus saga revisited*. *Annu. Rev. Med.* 64: 165–74.
- Shieh, J.J., Liang, C.M., Chen, C.Y., Lee, F., Jong, M.H., Lai, S.S., Liang, S.M. (2001) *Enhancement of the immunity to foot-and-mouth disease virus by DNA priming and protein boosting immunization*. *Vaccine* 19: 4002–4010.
- Shinozaki, K., Yamanaka, T., Tokieda, M., Shirasawa, H., Simizu, B. (1996) *Isolation and serial propagation of human group C rotaviruses in a cell line (CaCo-2)*. *J. Med. Virol.* 48: 48–52.
- Shu, M., Taddeo, B., Roizman, B. (2013) *The nuclear-cytoplasmic shuttling of virion host shutoff RNase is enabled by pUL47 and an embedded nuclear export signal and defines the sites of degradation of AU-rich and stable cellular mRNAs*. *J. Virol.* 87: 13569–13578.
- Smith, I.L., Hardwicke, M.A., Sandri-Goldin, R.M. (1992) *Evidence that the herpes simplex virus immediate early protein ICP27 acts post-transcriptionally during infection to regulate gene expression*. *Virology* 186: 74–86.
- Sobrinho, F., Domingo, E. (2004) *Foot and Mouth Disease. Current Perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
- Souza, A.P.D., Haut, L., Reyes-Sandoval, A., Pinto, A.R. (2005) *Recombinant viruses as vaccines against viral diseases*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 38: 509–522.
- Sprangers, M.C., Lakhai, W., Koudstaal, W., Verhoeven, M., Koel, B.F., Vogels, R., Goudsmit, J., Havenga, M.J.E., Kostense, S. (2003) *Quantifying Adenovirus-Neutralizing Antibodies by Luciferase Transgene Detection: Addressing Preexisting Immunity to Vaccine and Gene Therapy Vectors*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5046–5052.
- Stair, E.L., Mebus, C.A., Twiehaus, M.J., Underdahl, N.R. (1973) *Neonatal calf diarrhea. Electron microscopy of intestines infected with a reovirus-like agent*. *Vet. Pathol.* 10: 155–170.
- Stoker, M., MacPerson, I. (1964) *Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives*. *Nature* 203: 1355–1357.

- Stow, N.D. (1982) *Localization of an origin of DNA replication within the TRs/IRs repeated region of the herpes simplex virus type 1 genome*. EMBO J. 1: 863–867.
- 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.
- Suarez, C.E., Noh, S. (2011) *Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis*. Vet. Parasitol. 180: 109–125.
- Sutten, E.L., Norimine, J., Beare, P.A., Heinzen, R.A., Lopez, J.E., Morse, K., Brayton, K.A., Gillespie, J.J., Brown, W.C. (2010) *Anaplasma marginale type IV secretion system proteins VirB2, VirB7, VirB11, and VirD4 are immunogenic components of a protective bacterial membrane vaccine*. Infect. Immun. 78: 1314–1325.
- Taboga, O., Tami, C., Carrillo, E., Núñez, J.I., Rodríguez, A., Saíz, 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.
- Tamekuni, K., Vidotto, M.C., Felix, S.R., Igarashi, M., Garcia, J.L., Coelho, A.L., Gasparini, M.R., Marangoni Marana, E.R., Santos Da Silva, S., Vidotto, O. (2009) *Induced immune response of Escherichia coli BL21 expressing recombinant MSP1a and MSP1b proteins of Anaplasma marginale*. Brazilian Arch. Biol. Technol. 52: 113–120.
- Tanaka, M., Kagawa, H., Yamanashi, Y., Sata, T., Kawaguchi, Y. (2003) *Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo*. J. Virol. 77: 1382–1391.
- Taterka, J., Cebra, J.J., Rubin, D.H. (1995) *Characterization of cytotoxic cells from reovirus-infected SCID mice: activated cells express natural killer- and lymphokine-activated killer-like activity but fail to clear infection*. J. Virol. 69: 3910–3914.
- Tebele, N., McGuire, T.C., Palmer, G.H. (1991) *Induction of protective immunity by using Anaplasma marginale initial body membranes*. Infect. Immun. 59: 3199–3204.
- Tsunemitsu, H., Saif, L.J., Jiang, B., Shimizu, M., Hiro, M., Yamaguchi, H., Ishiyama, T., Hirai, T. (1991) *Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group*

- C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104)*. J. Clin. Microbiol. 29: 2609–2613.
- Turton, J.A., Katsande, T.C., Matingo, M.B., Jorgensen, W.K., Ushewokunze-Obatolu, U., Dalglish, R.J. (1998) *Observations on the use of Anaplasma centrale for immunization of cattle against anaplasmosis in Zimbabwe*. Onderstepoort J. Vet. Res. 65: 81–86.
- Urueña, A., Pippo, T., Betelu, M.S., Virgilio, F., Hernández, L., Giglio, N., Gentile, Á., Diosque, M., Vizzotti, C. (2015) *Cost-effectiveness analysis of rotavirus vaccination in Argentina*. Vaccine 33: A126–A134.
- Valarcher, J.-F., Leforban, Y., Rweyemamu, M., Roeder, P.L., Gerbier, G., Mackay, D.K.J., Sumption, K.J., Paton, D.J., Knowles, N.J. (2008) *Incursions of foot-and-mouth disease virus into Europe between 1985 and 2006*. Transbound. Emerg. Dis. 55: 14–34.
- 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.
- Verdaguer, N., Schoehn, G., Ochoa, W.F., Fita, I., Brookes, S., King, A., Domingo, E., Mateu, M.G., Stuart, D., Hewat, E.A. (1999) *Flexibility of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus bound to a Fab fragment of a neutralising antibody: structure and neutralisation*. Virology 255: 260–268.
- Villén, J., Borràs, E., Schaaper, W.M.M., Meloen, R.H., Dávila, M., Domingo, E., Giralt, E., Andreu, D. (2002) *Functional mimicry of a discontinuous antigenic site by a designed synthetic peptide*. ChemBiochem 3: 175–182.
- Visser, E.S., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Davis, W.C., Shkap, V., Pipano, E., Knowles, D.P. (1992) *The Anaplasma marginale msp5 Gene Encodes a 19-Kilodalton Protein Conserved in All Recognized Anaplasma Species*. Infect. Immun. 60: 5139–5144.
- Walsh, S.R., Dolin, R. (2011) *Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors*. Expert Rev. Vaccines 10: 1221–1240.
- 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.
- Warming, S., Costantino, N., Court, D.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. (2005) *Simple and*

- highly efficient BAC recombineering using galk selection.* Nucleic Acids Res. 33: e36.
- Watson, R.J., Clements, J.B. (1980) *A herpes simplex virus type 1 function continuously required for early and late virus RNA synthesis.* Nature 285: 329–330.
- Weir, J.P. (2001) *Regulation of herpes simplex virus gene expression.* Gene 271: 117–130.
- Whitaker, A.M., Hayward, C.J. (1985) *The characterization of three monkey kidney cell lines.* Dev. Biol. Stand. 60: 125–131.
- White Johanson, E., Wardlaw, T., Binkin, N., Brocklehurst, C., Dooley, T., Salama, P., Mark, Y. (2010). *Diarrhoea: why children are still dying and what can be done.* Lancet 375: 870–872.
- Williams, M.B., Rosé, J.R., Rott, L.S., Franco, M.A., Greenberg, H.B., Butcher, E.C. (1998) *The memory B cell subset responsible for the secretory IgA response and protective humoral immunity to rotavirus expresses the intestinal homing receptor, alpha4beta7.* J. Immunol. 161: 4227–4235.
- Wilson, A.J., Parker, R., Trueman, K.F. (1980) *Experimental immunization of calves against Anaplasma marginale infection: observations on the use of living A. centrale and A. marginale.* Vet. Parasitol. 7: 305–311.
- Yates, J.L., Guan, N. (1991) *Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells.* J. Virol. 65: 483–488.
- Youngman, K.R., Franco, M.A., Kuklin, N.A., Rott, L.S., Butcher, E.C., Greenberg, H.B. (2002) *Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response.* J. Immunol. 168: 2173–2181.
- Zaman, K., Dang, D.A., Victor, J.C., Shin, S., Yunus, M., Dallas, M.J., Podder, G., Vu, D.T., Le, T.P.M., Luby, S.P., Le, H.T., Coia, M.L., Lewis, K., Rivers, S.B., Sack, D.A., Schödel, F., Steele, A.D., Neuzil, K.M., Ciarlet, M. (2010) *Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.* Lancet 376: 615–623.
- 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.

Zaupa, C., Revol-Guyot, V., Epstein, A.L. (2003) *Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes. Hum. Gene Ther.* 14: 1049–1063.

Zheng, C., Babiuk, L.A., van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2005) *Bovine herpesvirus 1 VP22 enhances the efficacy of a DNA vaccine in cattle. J. Virol.* 79: 1948–1953.

Zimmerman, T., Petit Frère, C., Satzger, M., Raba, M., Weisbach, M., Döhn, K., Popp, A., Donzeau, M. (2006) *Simultaneous metal chelate affinity purification and endotoxin clearance of recombinant antibody fragments. J. Immunol. Methods* 314: 67–73.

9 Anexos

9.1 Anexo I. Clonado molecular de genes heterólogos para incluir en los vectores herpéticos y oligonucleótidos iniciadores utilizados.

9.2 Anexo II. Lista de publicaciones derivadas del trabajo realizado con vectores virales basados en HSV-1.

Anexo I

Clonado molecular de genes heterólogos para incluir en los vectores herpéticos y oligonucleótidos iniciadores utilizados

Índice

1	Oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados.....	190
2	Construcción del plásmido amplicón tricistrónico [pHSV-Doble-EGFP]	190
2.1	Análisis de restricción del plásmido [pHSV-Doble-EGFP]	192
3	Amplificación y clonado de los genes de Rotavirus Wa	193
3.1	Obtención de genes de rotavirus Wa	193
3.2	Amplificación de genes estructurales de RV humano cepa Wa.....	194
3.2.1	Condiciones de las reacciones de PCR	194
3.2.2	Análisis de los productos de PCR de genes estructurales de RV Wa.	195
3.2.3	Identidad parcial por mapeo de restricción de genes estructurales	195
3.3	Clonado de las secuencias que codifican para VP6, VP2, VP7, VP4 y NSP4 196 195	
3.3.1	Clonado de Wa-VP6, para los plásmidos amplicón simple y doble	196
3.3.2	Clonado de Wa-VP2 para los plásmidos amplicón simple y doble	196
3.3.3	Clonado de Wa-VP7 para los plásmidos amplicón simple y doble	197
3.3.4	Clonado de Wa-VP4 para los plásmido amplicón simple y doble	198
3.3.5	Clonado de Wa-NSP4 para el plásmido amplicón simple	199
3.4	Oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para secuenciación.....	199
4	Amplificación y clonado molecular de msp5 de <i>A. marginale</i>	200
5	Amplificación y clonado de VP6 de RV Grupo C.....	201
5.1	PCR de VP6C fusionado a epítotope HA.....	201
5.2	Clonado de VP6 de RV grupo C.....	201
6	Oligonucleótidos iniciadores específicos para [pAEUA2/β-gal]	202
7	Oligonucleótidos iniciadores específicos de VP6 de RRV	202
8	Oligonucleótidos iniciadores específicos de gC para amplificar RGD	202

1 Oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados

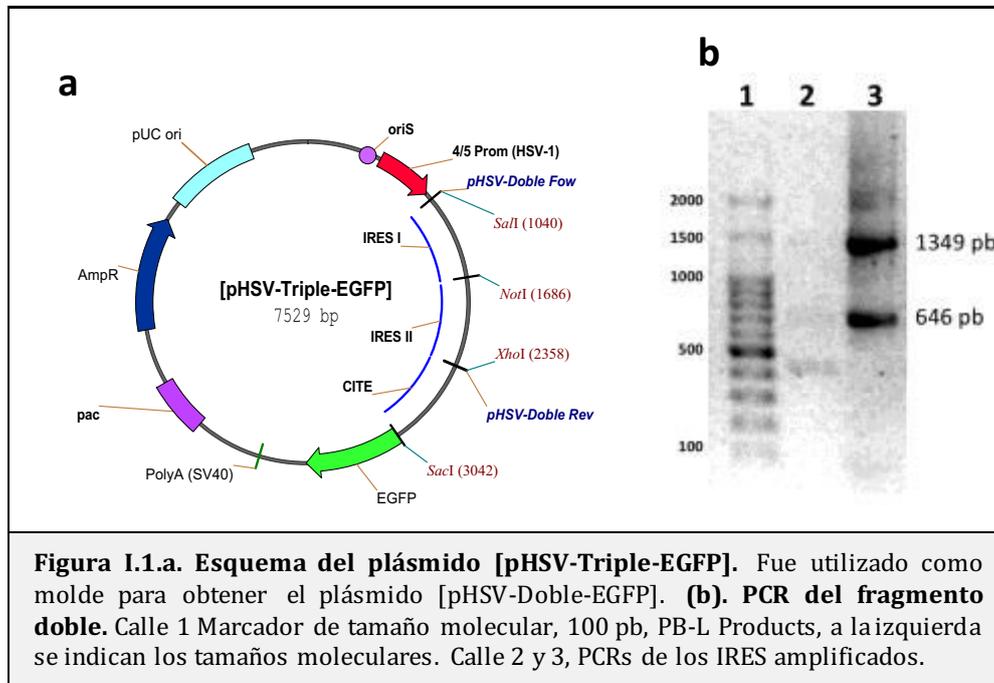
Todos los oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados, se describen a continuación en sentido 5' a 3', indicando la secuencia blanco para el que fueron diseñados. También se especifica si son polaridad positiva: F, o polaridad negativa: R, y entre paréntesis si adicionalmente poseen algún sitio reconocido por enzimas de restricción.

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados para los clonados, fueron sintetizados por Sigma-Aldrich, Inc., SL, EUA y los oligonucleótidos iniciadores internos, utilizados para las reacciones de secuenciación, se obtuvieron de Microsynth AG, Balgach, Suiza.

2 Construcción del plásmido amplicón tricistrónico [pHSV-Doble-EGFP]

El plásmido amplicón tricistrónico [pHSV-Doble-EGFP] se construyó, por modificación de un vector tetracistrónico, para la coexpresión de tres genes, dos de ellos pertenecientes a rotavirus, y el tercero a un gen reportero: VP6/VP2/EGFP y VP7/VP4/EGFP.

En primera instancia se digirió el plásmido [pHSV-Triple-EGFP] con las ER *Sall* y *SacI*, y se aisló el ADN que contiene las secuencias del marcador de selección β -lactamasa (AmpR), EGFP, *pUC* ori, señales *pac* y *oriS*, y promotor 4/5 de HSV-1. El mapa del plásmido parental [pHSV-Triple-EGFP], y los sitios de restricción utilizados (*Sall* y *SacI*), se muestran en la Figura I.1.a.



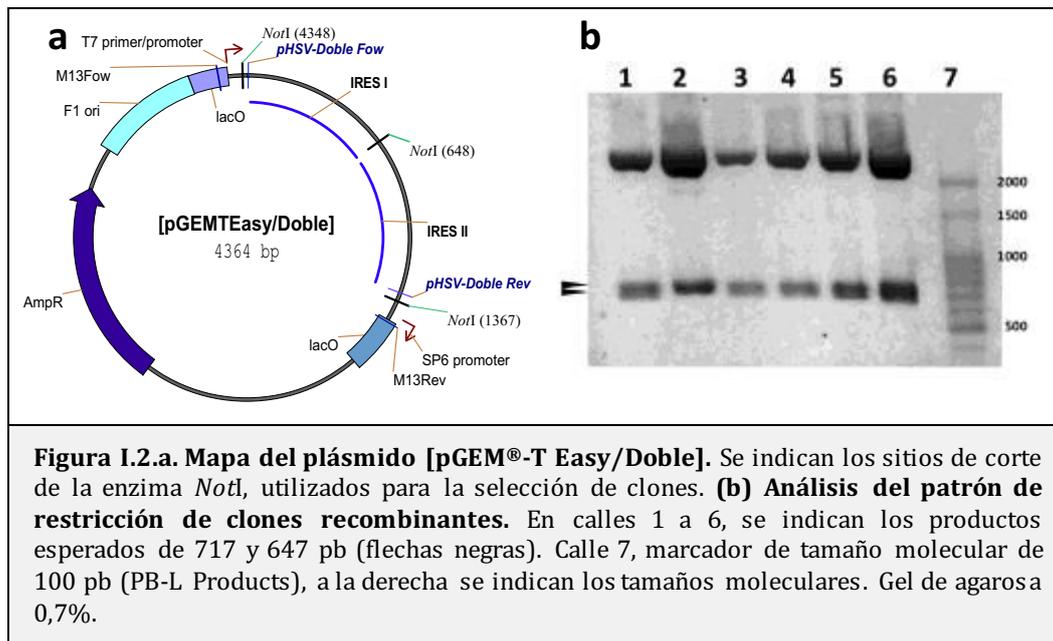
Por otro lado, se amplificaron por PCR las dos secuencias IRES con sus respectivos sitios de clonado, utilizando los oligonucleótidos pHSV-Doble-F y pHSV-Doble-R (Tabla I.1) que

hibridizan específicamente en los extremos de las secuencias IRES. Se purificó a partir de gel de agarosa el fragmento de 1349 pb que contiene las secuencias mencionadas, Figura I.1.b.

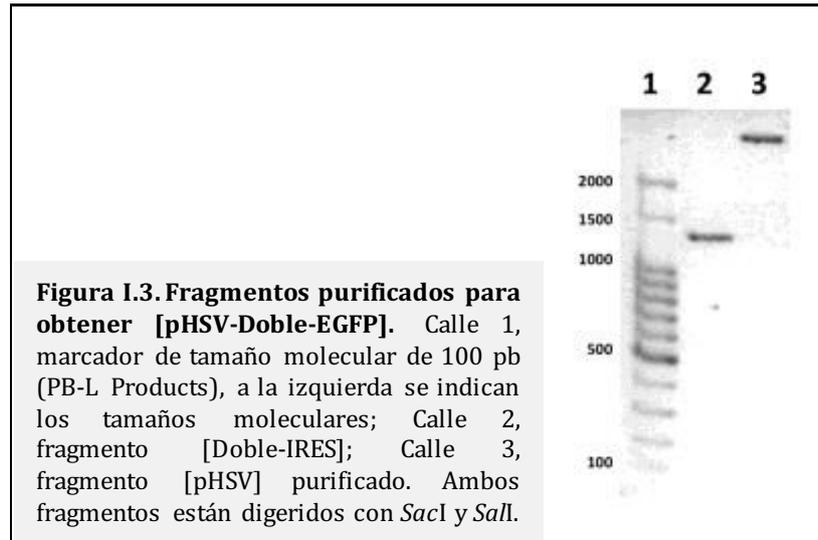
Tabla I.1. Oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para la construcción y secuenciación del plásmido amplicón [pHSV-Doble-EGFP].

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos iniciadores	Construcción
pHSV-Doble F (<i>Sall</i>)	GTCGACTTTCGAAAAGCTTTTAAAAC	[pHSV-Doble-EGFP]
pHSV-Doble R (<i>SacI</i>)	GAGCTCAGTGGACACCTGTAC	

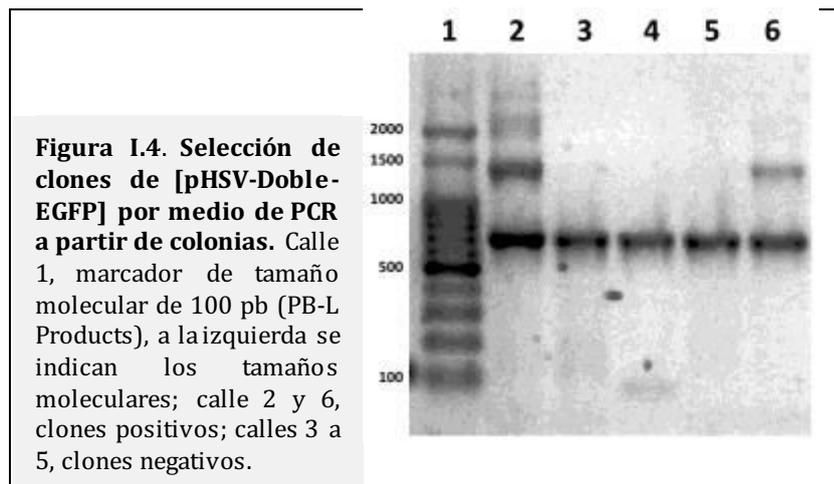
El producto purificado se clonó en el plásmido [pGEM®-T Easy] (Promega, WI, EUA), y con la mezcla de ligación se transformaron bacterias *E. coli* DH10B químicamente competentes. Las colonias recombinantes fueron seleccionadas por medio del sistema de α -complementación, con *X-gal* como sustrato, y el correspondiente ADN plasmídico fue analizado por digestión con la ER *NotI*. En la Figura I.2.a, se muestran los sitios de corte de *NotI* y en la Figura I.2.b, el patrón de bandas esperado (~3000 pb del plásmido, y como doble banda 717 y 647 pb correspondientes al inserto).



Los clones positivos seleccionados [pGEM®-T Easy/Doble] se enviaron a secuenciar (Macrogen, Corea del Sur), y posteriormente se realizó digestión con las ER *SacI* y *Sall*, para liberar el fragmento (Doble-IRES). Por otro lado se trató al fragmento [pHSV] digerido con las mismas enzimas, con la fosfatasa CIP (New England BioLabs, Inc. Ipswich, MA, EUA). Ambas partes a ser ligadas se purificaron a partir de gel (Figura I.3).

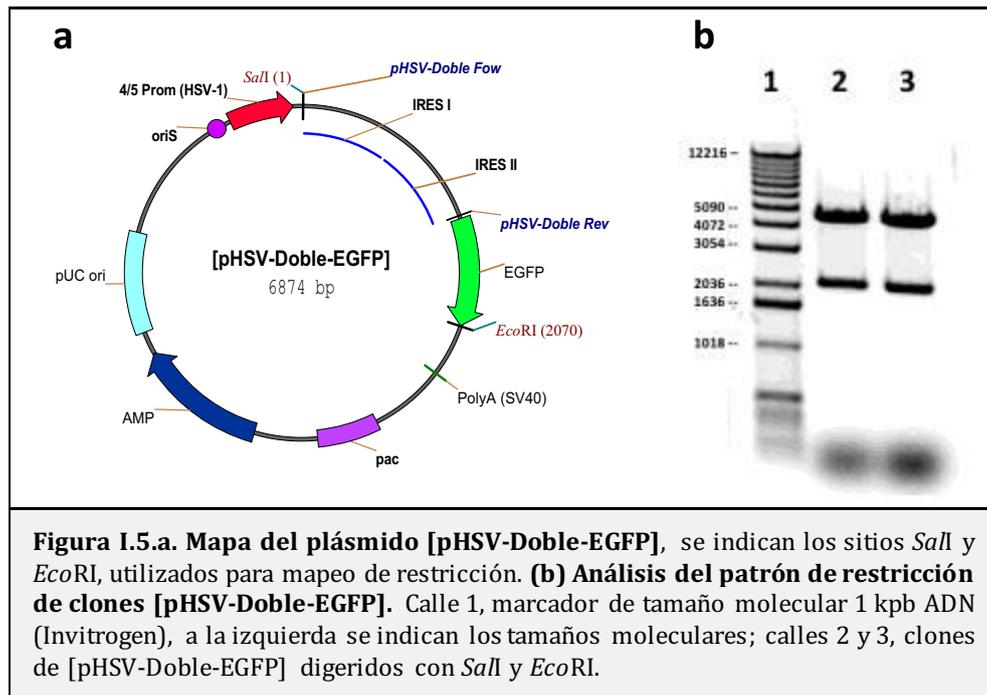


Con la reacción de ligación se transformaron bacterias competentes, y se seleccionaron clones recombinantes, por medio de PCR a partir de colonias (Figura I.4), utilizando oligonucleótidos específicos, indicados en la Tabla I.1.



2.1 Análisis de restricción del plásmido [pHSV-Doble-EGFP]

Dos de los clones positivos [pHSV-Doble-EGFP] se analizaron utilizando las ER *SalI* y *EcoRI* (ver mapa en la Figura I.5.a). El fragmento liberado, de un tamaño de 2069 pb, confirma la presencia del inserto y orientación correcta (Figura I.5.b).



3 Amplificación y clonado de los genes de Rotavirus Wa

3.1 Obtención de genes de rotavirus Wa

Para los genes de RV cepa Wa (VP6, VP2, VP7, VP4 y NSP4), se realizó una estrategia de clonado en plásmidos intermediarios, seguida del clonado de los marcos abiertos de lectura en los diferentes plásmidos amplicón. Como molde se utilizaron plásmidos conteniendo los genes de RV Wa. En la Tabla I.2 se describen los oligonucleótidos utilizados y los plásmidos destino para cada marco abierto de lectura. Estas construcciones fueron realizadas y proporcionadas a los distintos grupos de investigación participantes del Proyecto HEVAR.

Tabla I.2. Oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para el clonado de genes de RV Wa en plásmidos pCR4-TOPO y pCR2.1-TOPO.

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos iniciadores (5'-3')	Plásmido destino	Gen - N° de acceso NCBI
Wa-VP2 F	TAAAGGCTCAATGGCGTACAGG	pCR4-TOPO	VP2 - X14942.1
Wa-VP2 R	ACAGTGGGGTTGGCGTTTAC		
Wa-VP4 F	GGCTATAAAATGGCTTCG	pCR2.1-TOPO	VP4 - L34161.1
Wa-VP4 R	AGCGTTCTCACAACTTACAT		
Wa-VP6 F	GGCTTTTAAACGAAGTCTTC	pCR2.1-TOPO	VP6 - K02086.1
Wa-VP6 R	GGTCACATCCTCTCACTACA		
Wa-VP7 F	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	pCR4-TOPO	VP7 - M21834
Wa-VP7 R	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG		
Wa-NSP4 F	CGGAAAGATGGAAAAGC	pCR2.1-TOPO	NSP4 - AF093199
Wa-NSP4 R	ACAGACGACGGTAACTCAAC		

3.2 Amplificación de genes estructurales de RV humano cepa Wa

Las reacciones de PCR se controlaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, utilizando TBE como solución tampón. A los productos de PCR se los trató con Taq ADN polimerasa, para adicionarle la base nucleotídica A en los extremos, para permitir el clonado en los sistemas TA. Para cada procedimiento, los productos se purificaron mediante kit de purificación para productos de PCR (N° cat.: 20021, Qiagen, EUA), cuantificando por medio de gel de agarosa.

3.2.1 Condiciones de las reacciones de PCR

Cada reacción de amplificación se preparó de la siguiente manera: un volumen de 1 µL de una dilución de ADN plasmídico molde (1 a 10 ng), conteniendo uno de los genes de RV Wa en cada reacción; 0,4 mM dNTPs; 2,5 µL de buffer para PCR 10X; 1 µL de cada oligonucleótido iniciador específico (10 pmol/µL); 0,2 U de ADN polimerasa *Pfu* (PB-L Products) y H₂O csp 25 µL. Las condiciones de amplificación para todos los genes fueron: 1 ciclo [94°C 3 min.], 5 ciclos [94°C 1 min., X°C 1 min., 72°C Z min.] y 35 ciclos [94°C 1 min., Y°C 1 min. y 72°C por Z min.]. Los valores X, Y y Z, se ajustaron de acuerdo a cada fragmento a amplificar. Para Wa-VP2 y Wa-VP4: X= 55; Y= 57; Z= 2,5. Para Wa-VP6, Wa-VP7 y Wa-NSP4: X= 52; Y= 55; Z= 1. Los oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados se detallan en la Tabla I.3.

Tabla I.3. Oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para la amplificación y clonado de VP6, VP2, VP7, VP4 y NSP4.

Nombre	Secuencia nucleotídica	Construcción
Wa-NSP4 F (<i>Sall</i>)	<i>GTCGACATGGAAAAGCTTGCCGACCTC</i>	[pHSV-NSP4/EGFP]
Wa-NSP4 R (<i>Bst</i> BI)	<i>TTCGAATCACATGGATGCAGTCAC</i>	
Wa-VP4 F (<i>Sall</i>)	<i>GTCGACATGGCTTCGCTCATTATAG</i>	[pHSV-Wa-VP4/EGFP]
Wa-VP4 R (<i>Bst</i> BI)	<i>TTCGAATCACAACCTTACATTGTAG</i>	
Wa-VP6 F (<i>Sall</i>)	<i>GTCGACATGGAGGTTCTGTACTCAC</i>	[pHSV-VP6/EGFP]
Wa-VP6 R (<i>Bst</i> BI)	<i>TTCGAATCACTTAATCAACATGCTTC</i>	[pHSV-VP6/VP2/EGFP]
Wa-VP2 F (<i>Cla</i> I)	<i>ATCGATATGGCGTACAGGAAGCG</i>	[pHSV-VP6/VP2/EGFP]
Wa-VP2 R (<i>Cla</i> I)	<i>ATCGATTTACAGTTCGTTTCATAATGC</i>	
Wa-VP7 F (<i>Nru</i> I)	<i>TCGCGAATGTATGGTATTGAATATAC</i>	[pHSV-VP7/EGFP]
Wa-VP7 R (<i>Nru</i> I)	<i>TCGCGACTATACTCTATAATAAAAAG</i>	[pHSV-VP7/VP4/EGFP]
Wa-VP4 F (<i>Not</i> I vector)	<u><i>ATG</i></u> <i>GCTTCGCTCATTATAGGC</i>	[pHSV-VP7/VP4/EGFP]
Wa-VP4 R (<i>Bcl</i> II)	<i>TGATCACAACCTTACATTGTAGTATTAAC</i>	

3.2.2 Análisis de los productos de PCR de genes estructurales de RV Wa.

Los productos de las PCR correspondientes a VP6, VP2, VP7 y VP4, se analizaron y purificaron a partir de gel de agarosa (Figura I.6).

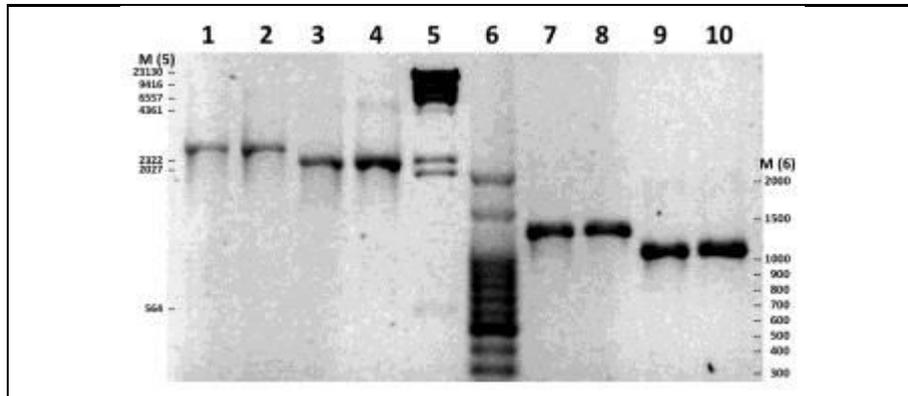


Figura I.6. Productos de PCR de genes estructurales de RV Wa. Gel de agarosa 0,7% mostrando los productos de PCR correspondientes a los genes de RV cepa Wa. Calles 1 y 2, Wa-VP2 (2673 pb); calles 3 y 4, Wa-VP4 (2328 pb); calles 7 y 8, Wa-VP6 (1194 pb); calles 9 y 10, Wa-VP7 (981 pb), calle 5, marcador de tamaños molecular de ADN Lambda *Hind*III (PB-L Products) y calle 6, marcador de tamaño molecular de 100 pb (PB-L Products), a la izquierda M(5) y derecha M(6) se indican los tamaños moleculares.

3.2.3 Identidad parcial por mapeo de restricción de genes estructurales

Para tener una primera confirmación de la identidad de los productos amplificados, se analizó el patrón de digestión de los mismos, utilizando diferentes enzimas de restricción (Figura I.7).

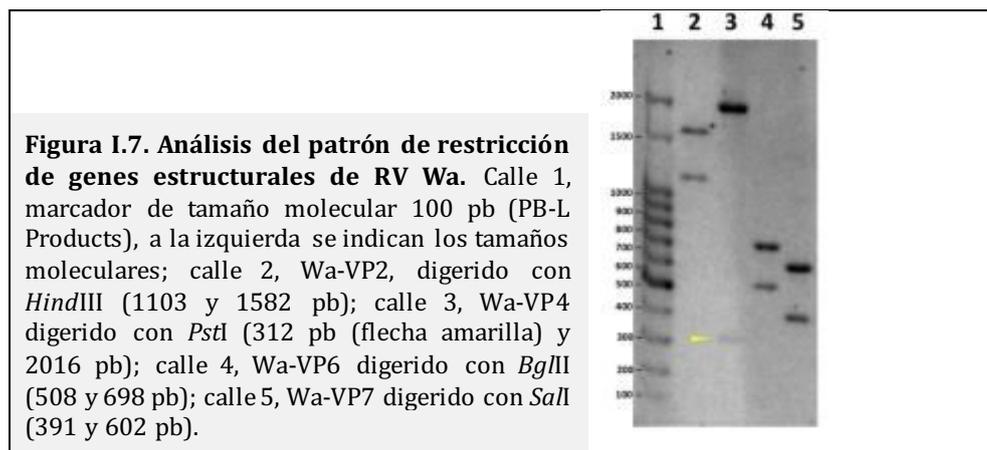


Figura I.7. Análisis del patrón de restricción de genes estructurales de RV Wa. Calle 1, marcador de tamaño molecular 100 pb (PB-L Products), a la izquierda se indican los tamaños moleculares; calle 2, Wa-VP2, digerido con *Hind*III (1103 y 1582 pb); calle 3, Wa-VP4 digerido con *Pst*I (312 pb (flecha amarilla) y 2016 pb); calle 4, Wa-VP6 digerido con *Bgl*II (508 y 698 pb); calle 5, Wa-VP7 digerido con *Sal*I (391 y 602 pb).

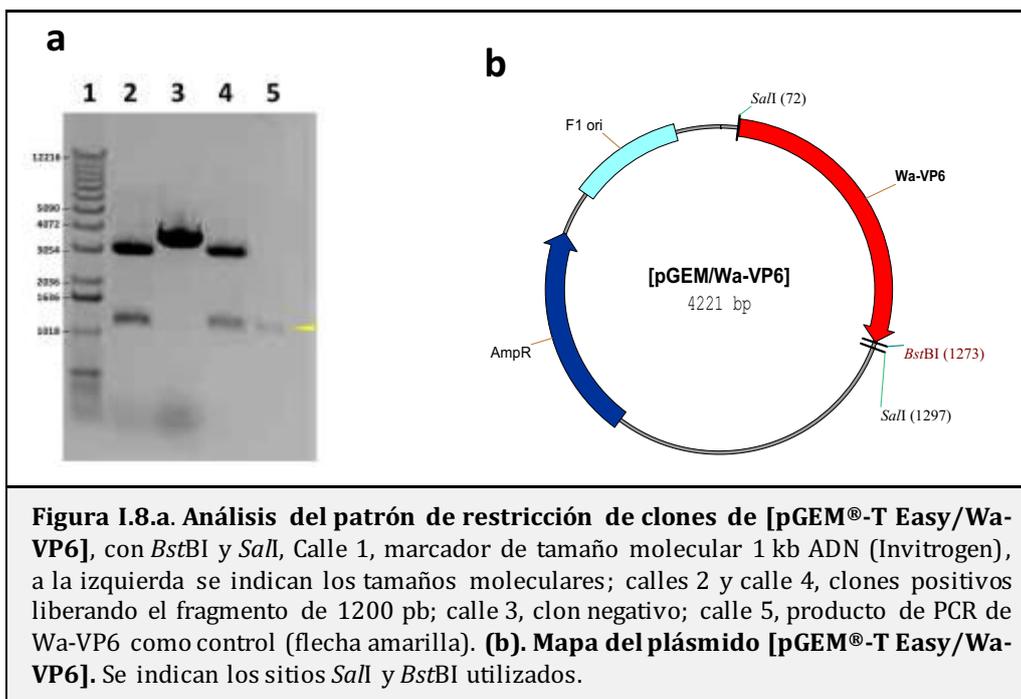
3.3 Clonado de las secuencias que codifican para VP6, VP2, VP7, VP4 y NSP4

Los productos de PCR correspondientes a VP6 y VP4 se clonaron en el plásmido [pGEM®-T Easy] (Promega, WI, EUA), mientras que VP7 y VP2 fueron clonados en el plásmido [pCR2.1 TOPO] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para cada uno de los genes, se seleccionaron colonias positivas por PCR, éstas se analizaron parcialmente con enzimas de restricción y posteriormente por secuenciación.

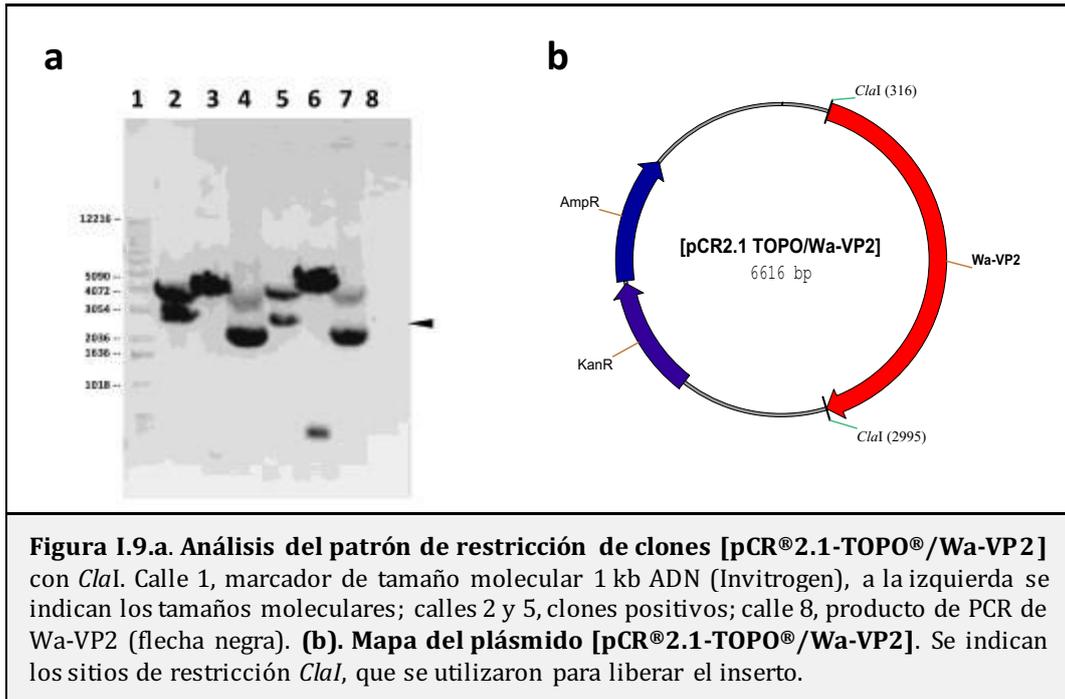
3.3.1 Clonado de Wa-VP6, para los plásmidos amplicón simple y doble

Luego de la selección de colonias, se analizaron clones de [pGEM/Wa-VP6] por medio de una digestión secuencial con las enzimas de restricción *Bst*BI y *Sal*I (Figura I.8.a y I.8.b). El producto de uno de los clones positivos se purificó y cuantificó a partir de gel, para posteriores reacciones.



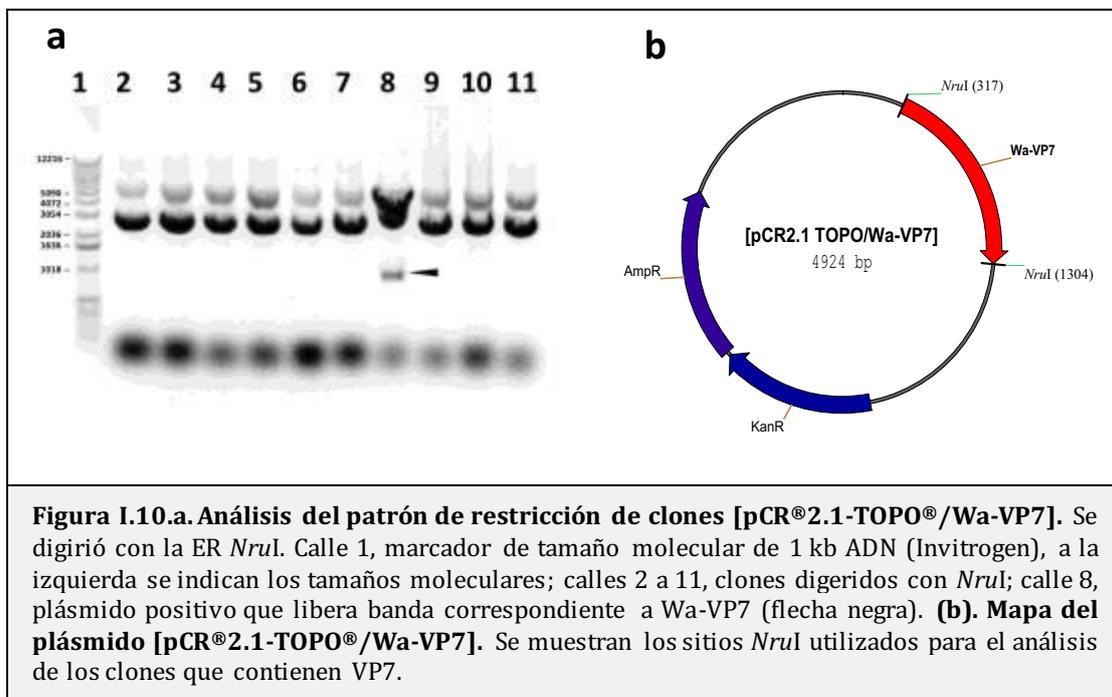
3.3.2 Clonado de Wa-VP2 para los plásmidos amplicón simple y doble

El gen Wa-VP2 se obtuvo por digestión de un clon positivo para [pCR®2.1-TOPO®/Wa-VP2] con la enzima de restricción *Cl*aI. El producto de uno de los clones positivos se purificó para posteriores reacciones de ligación (Figuras I.9.a y I.9.b).



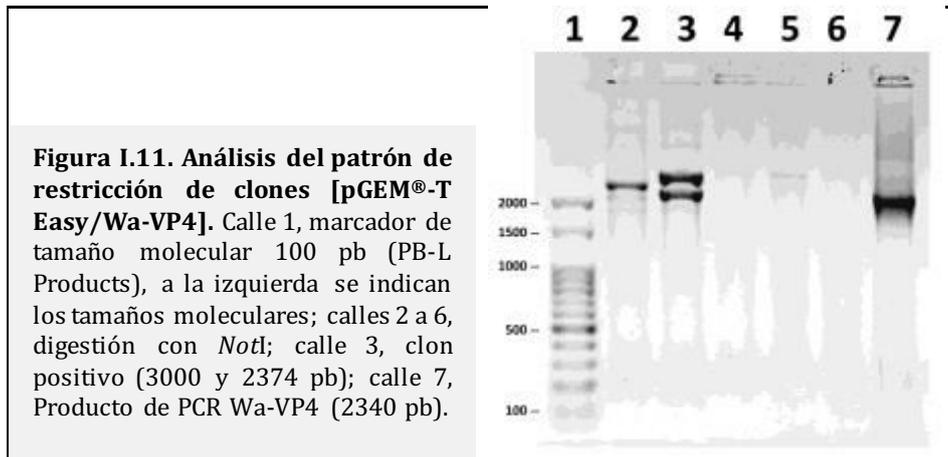
3.3.3 Clonado de Wa-VP7 para los plásmidos amplicón simple y doble

Para obtener el marco abierto de lectura correspondiente a Wa-VP7, se digirió ADN plasmídico de 10 colonias con la enzima *NruI*, Figuras I.10.a y I.10.b. El producto de digestión del clon positivo para [pCR[®]2.1-TOPO[®]/Wa-VP7] se purificó y se cuantificó para posteriores reacciones de ligación.

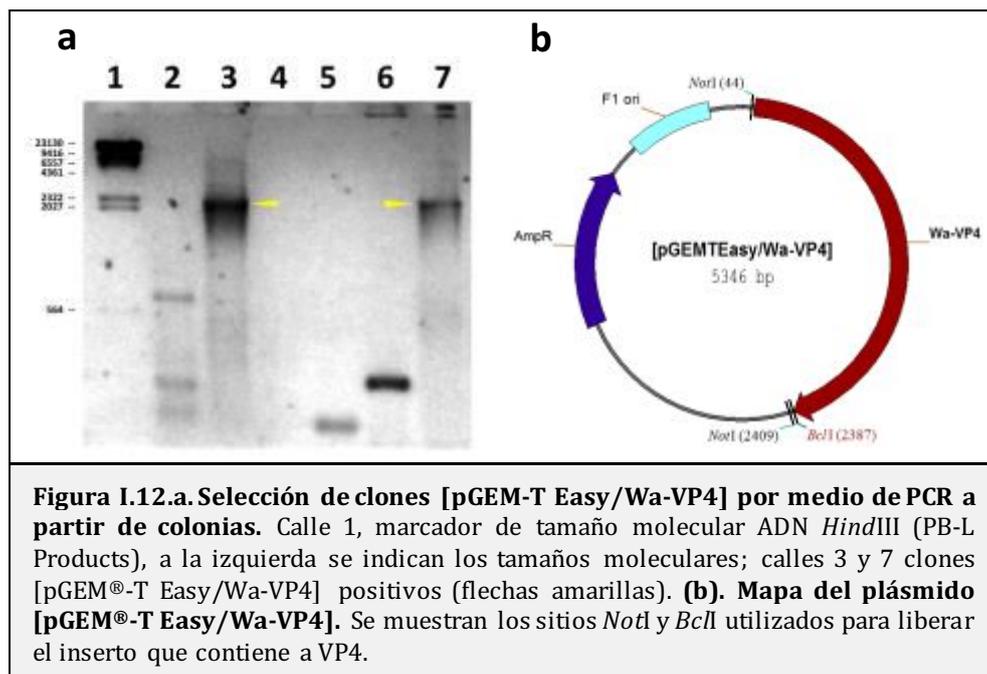


3.3.4 Clonado de Wa-VP4 para los plásmido amplicón simple y doble

El clonado de Wa-VP4 se realizó en el vector [pGEM®-T Easy] (Promega, WI, EUA), se transformaron bacterias *E. coli* DH10B, y se realizó una selección de clones recombinantes mediante PCR a partir de colonias, seguida de digestión con la enzima *NotI* de uno de los grupos analizados (Figura I.11).

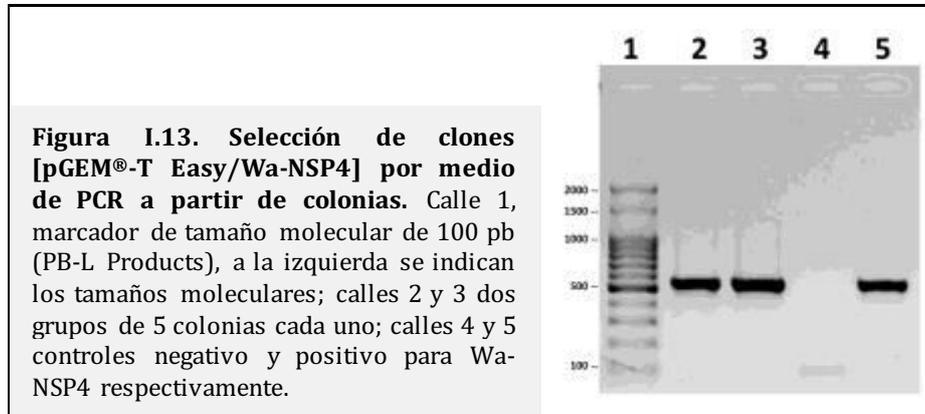


Para generar el plásmido amplicón doble, Wa-VP4 se clonó nuevamente, pero utilizando otro oligonucleótido iniciador específico antisentido (Tabla I.2). Uno de los clones de [pGEM®-T Easy/Wa-VP4] positivos por PCR (Figura I.12.a), se digirió con las enzimas *NotI* y *BclI*, como se muestra esquemáticamente en la Figura I.12.b, para obtener el marco abierto de lectura para el siguiente paso de clonado molecular.

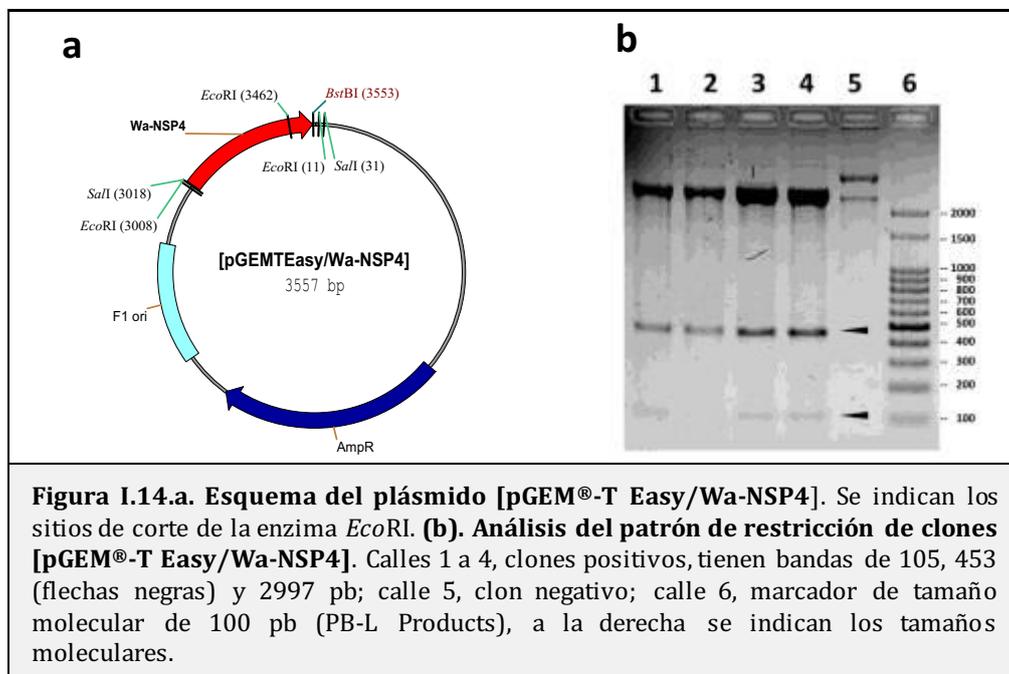


3.3.5 Clonado de Wa-NSP4 para el plásmido amplicón simple

El producto de PCR de Wa-NSP4 se clonó en el vector [pGEM®-T Easy] (Promega, WI, EUA) y se seleccionaron por PCR los clones recombinantes (Figura I.13).



Un grupo de clones positivos por PCR, para Wa-NSP4, se analizó individualmente por digestión con la enzima *EcoRI* y se determinó de esta manera los clones con un patrón específico de bandas (2997, 453 y 105 pb), como se muestra en la Figura I.14. Uno de los clones positivos [pGEM®-T Easy/Wa-NSP4] se envió a secuenciar, para obtener el fragmento de Wa-NSP4, se digirió con *Sall* y *BstBI*, y se purificó a partir de gel de agarosa.



3.4 Oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para secuenciación.

Además de los oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para amplificar los marcos abiertos de lectura, se utilizó una serie de oligonucleótidos iniciadores específicos

internos para poder cubrir completamente la secuencia nucleotídica de los genes amplificados (Tabla I.4).

Tabla I.4. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para completar los datos de las secuencias de los genes amplificados.

Nombre	Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores (5'-3')	Gen - N° de acceso NCBI
Wa-VP2-1 F	AGTTGTAGATTCTGAAACGGC	VP2 - X14942.1
Wa-VP2-2 F	TTATATCTGGTATGTGGCTATTG	
Wa-VP2-3 F	TTGAAAAGATTGCAAATTTTGTATG	
Wa-VP2-4 R	CTCATATCTGCAATGAATCTTC	
Wa-VP2-5 R	GCTATTTGAAACGGAGTCTG	
Wa-VP2-6 R	ATATCAAGTCTTCGTCTTTC	
Wa-VP4-1 F	CATTCAGAATTTTACATTAT	VP4 - L34161.1
Wa-VP4-2 F	GAGTTACATTATCCACGCAA	
Wa-VP4-3 R	TGAAACTATAATGTCTTC	
Wa-VP4-4 R	TCAATCAATTGTGCCATAGC	
SP6 <i>promoter</i>	TATTTAGGTGACACTATAG	
T7 <i>promoter</i>	TAATACGACTCACTATAGGG	

4 Amplificación y clonado molecular de *msp5* de *A. marginale*

En la Tabla I.5, se detalla la secuencia y polaridad de los oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para la construcción del plásmido amplicón [pHSV-MSP5/EGFP], y los plásmidos de expresión en *E. coli*, [pRSETA/MSP5] y [pMAL-c2X/MSP5]. El clonado de MSP5 en [pGEM-T Easy] (Promega, WI, EUA) y el clonado en los plásmidos [pRSETA] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) y [pMAL-c2X] (New England Biolabs, UK), se realizaron en colaboración con el Laboratorio de Inmunología de la Estación Experimental INTA de Rafaela.

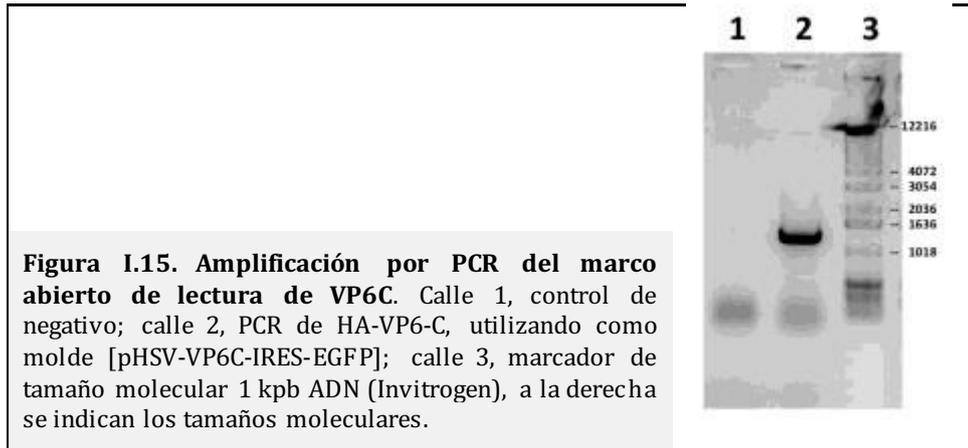
Tabla I.5. Oligonucleótidos iniciadores específicos para el clonado molecular de MSP5.

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos iniciadores (5'-3')	Plásmido	Gen - N° de acceso NCBI
MSP5 F (<i>Sall</i>)	GTCGACACCATGAGAATTTTCAAG	[pHSV-MSP5/EGFP]	MSP5 M93392
MSP5 R (<i>BstBI</i>)	TTCGAACTAAGAATTAAGCATGTGAC		
MSP5 F (<i>BamHI</i>)	GGATCCATGAGAATTTTCAAG	[pRSETA/MSP5] y [pMAL-c2X/MSP5]	
MSP5 R (<i>PstI</i>)	CTGCAGCTAAGAATTAAGCATGTGAC	[pMAL-c2X/MSP5]	
MSP5 R (<i>XhoI</i>)	CTAAGAATTAAGCATGTGAC	[pRSETA/MSP5]	

5 Amplificación y clonado de VP6 de RV Grupo C

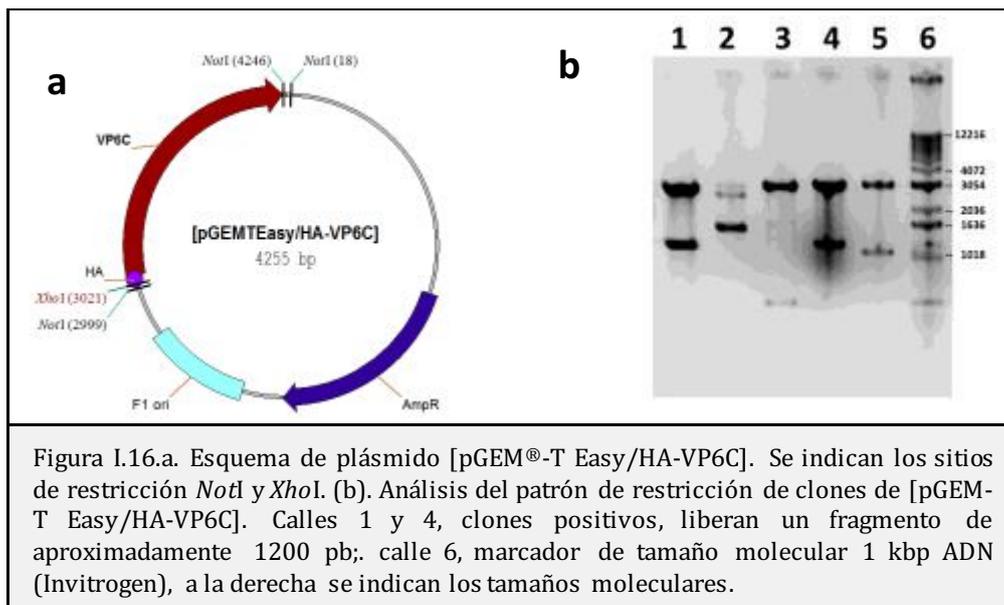
5.1 PCR de VP6C fusionado a epítipo HA

Utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos, se amplificó el marco abierto de lectura de VP6C fusionado al epítipo HA, en posición carboxi (C-) ó amino (N-) terminal. En la Figura I.15, se muestra sólo el producto de PCR con la secuencia de HA fusionada al extremo N-terminal, como molde se utilizó el plásmido [pHSV-VP6C/EGFP].



5.2 Clonado de VP6 de RV grupo C

Se realizó el clonado en [pGEM®-T Easy] (Promega, WI, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante, y luego de transformar *E. coli* competentes, se seleccionaron clones positivos con *XhoI* y *NotI* (Figura I.16.a y I.16.b).



6 Oligonucleótidos iniciadores específicos para [pAEUA2/ β -gal]

En la Tabla I.6, se muestran los oligonucleótidos iniciadores específicos utilizados para la secuenciación de plásmido amplicón que codifica para la β -galactosidasa de *E. coli*.

Tabla I.6. Oligonucleótidos iniciadores específicos para la secuenciación de construcción [pAEUA2/ β -gal].

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos iniciadores (5'-3')	Construcción destino
pAEUA2 F	TCTCCACAGGTGTCCACTCC	[pAEUA2- β -gal]
pAEUA2 R	AGTTGTGGTTTGTCCAAACTC	
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGC GTG	
Beta 2	TTGGCGTAAGTGAAGCGACCC	

7 Oligonucleótidos iniciadores específicos de VP6 de RRV

Para la amplificación y análisis molecular del marco abierto de lectura de VP6 de RRV, se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores descritos en la Tabla I.7. Estos oligonucleótidos iniciadores se utilizaron para el análisis y secuenciación de clones de virus recombinante TORRVVP6. También se muestran los oligonucleótidos iniciadores utilizados para amplificar EGFP, utilizados en la construcción de plásmidos amplicón.

Tabla I.7. Oligonucleótidos iniciadores específicos para VP6 de rotavirus de simio (VP6-RRV) y la proteína fluorescente verde (EGFP).

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos iniciadores (5'-3')	Plásmido destino	Gen - N° acceso NCBI
RRV-VP6 F	ATGGATGTCCTATACTCTTTGTC	[pGEM®-T Easy] y [pAEUA2/RRV-VP6]	VP6 - EF583009.1
RRV-VP6 R	CCGAATTCATTTAATGAGCATGCTTC		VP6 - EF583009.1
RRV-VP6int F	TTCGACTATTCATGTGC		
RRV-VP6int R	ATTGTTGTATATTAGC		

8 Oligonucleótidos iniciadores específicos de gC para amplificar RGD

Para la secuenciación de la región de inserción del epítopo RGD, se diseñaron oligonucleótidos internos descritos en la Tabla I.8. Estos oligonucleótidos iniciadores se utilizaron para el análisis de los clones que presentaron un patrón de restricción positivo, es decir que indican un patrón positivo para gC-RGD. El fragmento amplificado incluye 498 bp correspondientes a gC, y 78 pb correspondientes a la región RGD.

Tabla I.8. Oligonucleótidos iniciadores específicos para determinar la secuencia del fragmento de inserción en gC

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos iniciadores (5'-3')	Secuencia blanco
GCRGDF	TCACTACCGAGGGCG	Región gC-RGD - 576 pb
GCRGDR	AGTGGGGCGGTCCGAC	

Anexo II

Lista de publicaciones derivadas del trabajo realizado con vectores virales basados en HSV-1 (1-4):

1. **Romanutti C, D'Antuono A, Palacios C, Quattrocchi V, Zamorano P, La Torre J, Mattion N.** 2013. Evaluation of the immune response elicited by vaccination with viral vectors encoding FMDV capsid proteins and boosted with inactivated virus. *Vet. Microbiol.* **165**:333-40.
2. **Palacios C, Torioni de Echaide S, Mattion N.** 2014. Evaluation of the immune response to *Anaplasma marginale* MSP5 protein using a HSV-1 amplicon vector system or recombinant protein. *Res. Vet. Sci.* **97**:514-520.
3. **Palacios CA, Claus J, Mattion N.** 2015. Rotavirus VP6 protein expressed in cell culture by HSV-1-based vectors. *Rev. Argent. Microbiol.* **47**:80-81.
4. **Rota R, Palacios C, Temprana F, Mattion N, Acastelo A, Glikmann G.** 2016. Induction of immune responses in mice with an HSV-1 amplicon vector encoding human group C VP6 protein. En preparación.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Evaluation of the immune response elicited by vaccination with viral vectors encoding FMDV capsid proteins and boosted with inactivated virus



Carina Romanutti^{a,1}, Alejandra D'Antuono^{a,1}, Carlos Palacios^a, Valeria Quattrocchi^b, Patricia Zamorano^b, Jose La Torre^a, Nora Mattion^{a,*}

^a Centro de Virología Animal, Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. Cesar Milstein, CONICET, Saladillo 2468, C1440FFX Ciudad de Buenos Aires, Argentina

^b Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, CICVyA, Hurlingham (1686), Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2012

Received in revised form 10 April 2013

Accepted 13 April 2013

Keywords:

FMDV

Prime-boost regimens

Adenovirus vectors

Herpesvirus amplicons

Marker vaccines

ABSTRACT

The aim of the present study was to assess the effect of introducing a priming step with replication-defective viral vectors encoding the capsid proteins of FMDV, followed by a boost with killed virus vaccines, using a suitable BALB/c mice model. Additionally, the immune response to other combined vector immunization regimens was studied. For this purpose, we analyzed different prime-boost immunizations with recombinant adenovirus (Ad), herpesvirus amplicons (Hs) and/or killed virus (KV) vaccines. The highest antibody titers were found in the group that received two doses of adjuvanted KV ($P < 0.002$). Antibody titers were higher in those groups receiving a mixed regimen of vectors, compared to immunization with either vector alone ($P < 0.0001$). Priming with any of the viral vectors induced a shift of the cytokine balance toward a Th1 type immune response regardless of the delivery system used for boosting. The highest IgG1 titer was induced by two doses of adjuvanted KV ($P = 0.0002$) and the highest IgG2a titer corresponded to the group primed with Ad and boosted with KV ($P = 0.01$). Re-stimulation of all groups of mice with 0.5 μg of inactivated virus five months later resulted in a fast increase of antibody titers in all the groups tested. After virus stimulation, antibody titers in the groups that received KV alone or Ad prime-KV boost, were indistinguishable ($P = 0.800$). Protection from challenge was similar (75%) in the groups of animals that received Ad prime-Hs boost or Ad prime-KV boost, or two doses of oil-adjuvanted KV. The data presented in this study suggest that sequential immunization with viral vectors-based vaccines combined with protein-based vaccines have the potential to enhance the quality of the immune response against FMDV.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: CEVAN-CONICET, Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein, Saladillo 2468, C1440FFX Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Tel.: +54 11 4686 6225; fax: +54 11 4686 6225.

E-mail addresses: nmattioncevan@centromilstein.org.ar, nora.mattion@gmail.com (N. Mattion).

¹ These authors contributed equally to this work.

1. Introduction

FMD is a very contagious disease whose consequences are extremely damaging. It causes significant distress and suffering to animals, impacts on the livelihood of the farmers and produces huge economic losses (Doel, 2003). Killed FMDV (KV) vaccines currently in use have been very successful in reducing the number of disease outbreaks in

many parts of the world where the disease is enzootic (Mattion et al., 2004). Nevertheless, there are a number of concerns and limitations regarding its use and production, particularly in FMDV-free countries, such as elevated costs of the high-containment facilities required for manufacturing, the potential escape of infectious virus to the environment, differentiation between antibodies produced by disease or vaccination, among others. For these and other reasons, systematic vaccination is not applied in many FMD-free countries, which are particularly interested in marker vaccines for emergency use, capable of generating fast early protective responses.

New generation vaccines against foot-and-mouth disease virus (FMDV) have been extensively explored, though they have not equaled the efficacy of the conventional killed virus vaccine in use.

Viral vectors capable of expressing FMDV empty capsids directly in the target animals have been used for experimental immunization, such as live replication-defective human adenovirus (Ad) vectors which resulted in protection from disease (Grubman et al., 1993; Mayr et al., 1999). In previous work, we have shown that HSV-1 amplicon vectors (Hs) provided protection from challenge in mice, with a significant reduction of viremia (D'Antuono et al., 2010). This type of vaccine has the additional advantage that they may be used as marker vaccines.

Over the past decade, studies have suggested that heterologous prime-boost (HetPB) vaccination approaches, in which the same antigen is administered sequentially by different delivery methods, might be more effective in enhancing cellular and humoral immune responses than two doses of the same type of vaccines (Lu, 2009; Vaine et al., 2010). The rapid progress of novel vaccination strategies, such as DNA vaccines and viral vector-based vaccines, has certainly further expanded the scope of HetPB vaccination (Woodland, 2004; Lu, 2009; Davtyan et al., 2010), including FMDV (Li et al., 2008).

Vaccine design strategies against FMD might benefit from focusing also on the simultaneous stimulation of humoral and cellular immune responses. The contribution of the humoral response to the *in vivo* protection against FMDV has been clearly established. In particular, a strong correlation was found in convalescent and conventionally vaccinated animals between neutralizing activity in sera and protection against FMDV challenge (Sobrino and Domingo, 2001). However, this correlation was not always found, and protection has been observed also in animals which showed no detectable neutralization antibody titers (Borrego et al., 2006). This phenomenon may be explained by additional immune mechanisms that exist in the host, such as innate immunity (Barnard et al., 2005) or cell-mediated immunity, which might contribute to protection (Sanz-Parra et al., 1999a; Borrego et al., 2011).

In the present study we aimed to assess if the use of priming with replication-defective viral vectors encoding proteins of FMDV, may improve the immune responses to subsequent inoculation of KV vaccines. For this purpose, groups of BALB/c mice were primed and boosted with recombinant Ad, Hs and/or KV vaccines and the immune responses to the different immunization

regimens were studied. We show that the priming of the immune system with recombinant Ad contributes to a more balanced immune response to KV vaccines. Moreover, combined immunization regimens including viral vectors might induce similar protection in mice than two doses of oil-adjuvanted inactivated FMD virus. The experiments described were performed using BALB/c mice, a well-studied murine model (Fernandez et al., 1986; Dus Santos et al., 2000; Borrego et al., 2006), to circumvent the problems and costs derived from handling a large number of experiments in FMDV natural hosts.

2. Materials and methods

2.1. Cells and viruses

Human embryonic kidney (HEK293) cells, transformed with sheared human adenovirus type 5 DNA, were acquired from Invitrogen (California, USA). African green monkey kidney cells expressing the HSV-1 immediate-early essential gene ICP27 (Vero 2-2), were kindly provided by Dr. Cornel Fraefel (University of Zürich). FMDV strain O1/Campos/Brazil/58 (O1/Campos) was supplied by SENASA (origin: PANAFITOSA, Brazil).

2.2. Generation of recombinant HSV-1 amplicons and adenovirus vectors encoding FMDV capsid proteins

The HSV-1 plasmid amplicon pHSV[P12A3C], containing the coding sequences of FMDV (O1/Campos strain) structural proteins, 2A protein and 3C protease, was constructed and packaged into virus particles as previously described (Saeki et al., 2001; D'Antuono et al., 2010), using a helper-free system, where the HSV-1 genome was provided *in trans* by a bacterial artificial chromosome (BAC) containing the HSV-1 genome with deletions in the DNA cleavage/packaging signals and the essential ICP27 gene (fHSV Δ pac Δ ICP27). Briefly, Vero2-2 cells were co-transfected with pHSV[P12A3C] DNA, the fHSV Δ pac Δ ICP27 BAC and the plasmid pEBHICP27 (which provides the HSV-1 ICP27 gene *in trans*), using Lipofectamine and Plus Reagent (Invitrogen). The amplicon particles generated were designed as Hs[P], where P12A3C was abbreviated as [P] for simplicity. Titers were calculated as described (D'Antuono et al., 2010) and expressed as Transducing Units/ml (TU/ml).

The adenovirus type 5 vector (Ad) carrying the same coding sequences from FMDV (O1/Campos strain) (Ad[P]) was obtained using the VirapowerTM Adenoviral System (Invitrogen, California, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, the [P] insert was cloned into the adenovirus shuttle vector pENTRTM-4, which was recombined *in vitro* into the pAd/CMV/V5-DESTTM Adenoviral Gateway[®] Vector. Titration of Ad[P] stocks was performed by the limiting dilution method, and expressed as plaque forming units (PFU)/ml. An Ad vector expressing the enhanced green fluorescent protein (GFP) reporter gene (Ad[G]) was generated and used as a negative control.

2.3. Experimental animals and immunization protocols

The experiments carried out in mice reported in this manuscript have been performed following internationally recognized guidelines with the approval of the Institutional Committee for Care and Use of Experimental Animals, CICUAE [approval reference CICUAE INTA-CICVyA 30/2010].

Groups of four mice (4–6-week-old male BALB/c mice) were immunized twice following the schedule shown in Table 1. Animals primed with Ad[P], were boosted either with the same vector, with the Hs[P] amplicon vector, or with the conventional KV vaccine (adjuvanted killed FMDV). Homologous prime-boost regimens such as Hs[P]/Hs[P] or KV/KV were also carried out for comparison. Inoculations with recombinant Ad vectors expressing GFP (Ad[G]), were carried out as a negative control.

To work on a limited dose level, 5×10^7 PFU of Ad[P] vector and 5×10^5 TU of Hs[P] amplicons per mouse were used (D'Antuono et al., 2010). Mimicking the classical commercial vaccine, KV was formulated with Marcol/Montanide[®] (Seppic, France). The virus antigenic mass used per dose was either 1 µg of 146S particles when used alone, or 0.5 µg in mixed prime-boost regimens.

At day 56 post vaccination (pv), duplicated groups of mice were killed and splenocytes were harvested for determination of lymphocyte proliferation and cytokines mRNA. The other groups were re-stimulated with 0.5 µg of KV at day 146 pv. The humoral immune response was analyzed in sera from blood collected at days 0, 28, 56, and 146 days post vaccination (dpv), and at days 153 and 174 (7 and 15 days post re-stimulation with inactivated virus).

For challenge experiments, groups of 4 mice were immunized twice following the schedule of Table 1, and challenged with live FMDV O1/Campos strain (10^4 PFU) at 56 dpv. Duplicate groups were challenged at 146 dpv, after a resting period of 4 months. A schematic representation of the experiments is provided in Fig. 1.

2.4. FMDV-specific antibodies titers

Anti-FMDV antibodies were detected by solid phase ELISA (spELISA), following a protocol modified from Seki et al. (2009). Briefly, ELISA microplates (MaxiSorp[™], Nunc, Rochester, USA) were coated with a rabbit antiserum against FMDV O1/Campos strain in carbonate-bicarbonate

buffer, pH 9.6, and incubated overnight at 4 °C. Inactivated virus was then added to the wells and incubated for 1 h at 37 °C. Subsequent steps were performed using blocking buffer (PBS containing 3% horse serum and 0.05% Tween 20). Murine sera to be tested were serially diluted in blocking buffer, and subsequently added to the coated ELISA plate and incubated for 60 min at 37 °C. Peroxidase-labeled anti-mouse IgG, IgG1 or IgG2a antibodies were used to develop the reactions. Antibody titers were expressed as the log₁₀ of the reciprocal of serum dilutions giving at least twice the absorbance at 495 nm recorded in the negative control wells. Isotyping of antibody responses was carried out in sera (dilution 1:200) at 56 dpv.

An ELISA-based antibody avidity assay was performed incorporating a urea elution step, as previously described (Perciani et al., 2007). The avidity of each serum was evaluated through its ability to be displaced from the plates by increasing molar (M) concentrations of urea, and expressed as the urea concentration required to displace 50% of IgG initially bound on the plate.

2.5. Detection of cytokines mRNA

The levels of mRNA accumulation of several representative cytokines were detected, as previously described (Zhang et al., 2011), with minor modifications. Briefly, fresh murine spleen cells were plated in 6-well microtiter plates at a density of 3.3×10^7 cells per well. The lymphocytes were incubated ON, in triplicate wells, with inactivated FMDV O1/Campos antigen (40 µg/ml) or Concanavalina A (Con A, 2.5 µg/ml) in RPMI-1640 containing 10% FCS at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. After RNA extraction, RT-PCR was performed using the primers described in Table 2. The housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a normalizing control. The PCR products were subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gels and photographed under the UV light.

2.6. T lymphocyte proliferation

Splenocytes from immunized mice harvested at sacrifice were incubated in 96-well plates (10^6 cells per well) and stimulated with inactivated FMDV O1/Campos antigen (5 µg/ml) or ConA (2.5 µg/ml) for 2 days at 37 °C, in a 5% CO₂ incubator. The in vitro cell proliferation was measured

Table 1
Schedule of mice immunization and challenge.

Group (n = 4)	Immunogen		Adjuvant	Imm. Route	Dose (TU)	Challenge (O1/Campos 10^4 PFU)	
	Prime (Day 0)	Boost (Day 28)				56 dpv	146 dpv
1	Ad[P]	Ad[P]	–	im	5×10^7	yes	yes
2	Hs[P]	Hs[P]	–	im	5×10^5	no	no
3	Ad[P]	Hs[P]	–	im	$5 \times 10^7/5 \times 10^5$	yes	yes
4	Ad[P]	KV	–/MM	im/ip	$5 \times 10^7/0.5 \mu\text{g}$	yes	no
5	KV	KV	MM/MM	ip	1 µg	yes	no
6	Ad[G]	Ad[G]	–	im	5×10^7	yes	yes

Ad, adenovirus vector; Hs, herpesvirus amplicon; KV, killed FMDV; P, FMDV capsid proteins plus 2A and 3C protease; G, GFP; MM: Marcol–Montanide, Seppic[®]. TU: transducing units; PFU: plaque forming units.

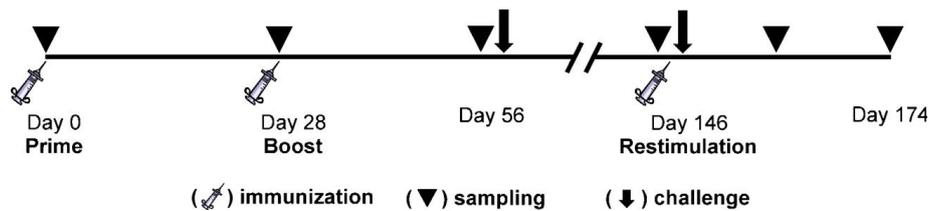


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design. Four- to 6-week-old BALB/c mice ($n = 4$) were immunized twice with a 28 days interval using the different prime-boost inoculation regimens shown in Table 1. At day 56 pv, duplicated groups of mice were killed and splenocytes were harvested for the analysis of cellular immune response, or challenged with live FMDV O1/Campos strain at 56 or 146 dpv. After a resting period of 146 days, other similarly vaccinated groups of mice were re-stimulated with 0.5 μg of KV. Blood samples were collected at 0, 28, 56, 146, 153 and 174 dpv.

by incorporation of [3H] thymidine as previously described (D'Antuono et al., 2010). The Stimulation Index (SI) was calculated as the ratio of the average counts per minute (cpm) \pm SD (Standard Deviation) from triplicate wells containing antigen-stimulated cells, to the average cpm value of wells without FMDV antigen. Statistical analyses were performed based on the logarithmic transformation of the cpm ratios.

2.7. Viral challenge

Mice were challenged with live FMDV in the facilities located in INTA, Castelar, Buenos Aires, by intraperitoneal (ip) inoculation of 10^4 TCID₅₀ of O1/Campos strain per mouse. The groups of mice 1, 3, 4, 5, and 6 described in Table 1 were challenged at 56 dpv in BSL-3A (BSL-4 OIE) facilities and analyzed for the presence of viremia 24 hours post challenge. Other three duplicate groups of mice (vaccinated like groups 1, 3 and 6, Table 1) were challenged at 146 dpv.

Protection against FMDV was assessed as described previously, with minor modifications (Carrillo et al., 1998; Quattrocchi et al., 2011). Twenty-four hours after challenge, the animals were anesthetized and bled by the retro orbital route. Heparinized blood was spread undiluted on BHK-21 cell monolayers and after virus adsorption; monolayers were washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS). Fresh DMEM with 2% fetal calf serum was added and the cells were kept for 48 h at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. An animal was considered protected if the cell monolayer did not present cytopathic effect (cpe) after two blind passages. Percentages of protection were calculated as $P\% = (\text{number of protected mice}/\text{number of challenged mice}) \times 100$.

2.8. Statistical analyses

Data analysis was performed with IBM SPSS Statistic software v17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and OriginPro v7.5 (OriginLab, Northampton, MA, USA), respectively. Data were analyzed for homogeneity of variances using Levene's test for equality, and for normal distribution using Shapiro–Wilk test. Mean differences between groups were determined using ANOVA with Tukey Honestly Significantly Different post hoc test. *P*-Values of less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Combined prime-boost immunization regimens induced high antibody titers against FMDV in mice

After the first dose (28 dpv), significant differences could not be established in specific antibody titers of the different experimental groups of mice (Fig. 2). However, these titers significantly increased in all groups after a booster immunization (56 dpv, Fig. 2). There was a clear significant difference in the antibody titers of the group vaccinated with two doses of adjuvanted KV ($P < 0.002$) with all the other groups. Interestingly, animals primed with Ad[P] and boosted with either Hs[P] or with 0.5 μg of KV, elicited specific FMDV antibody titers which were significantly higher ($P < 0.0001$) compared with mice that received a prime-boost with the same vector (Ad[P]/Ad[P] or Hs[P]/Hs[P]), suggesting that mixed regimens might be also a powerful tool for generating high and durable titers of anti-FMDV antibodies.

3.2. Stimulation of mice with inactivated virus at 146 dpv resulted in a fast increase of antibody titers

FMD virus-specific antibodies were maintained for at least 5 months in the vaccinated mice. After a new virus encounter, a notable increment in anti-FMDV antibody titers were detected by sPELISA as early as 7 days post re-stimulation in all the experimental groups (Fig. 2, 153 dpv), including the groups primed-boosted with the same vectors, but not in mice inoculated with the negative control Ad[G]. The antibody titers further increased at 28 days post re-stimulation (Fig. 2, 174 dpv), showing a clear difference in the antibody titers of the group vaccinated with two doses of KV and the group primed with Ad and

Table 2
Primers used for RT-PCR detection of mRNA of cytokines.

Target gene	Primer sequence	Fragment length
GAPDH	5' ggCACAgTCAAggCTgAgAAC 3' CATACTCggCACCAgCATCA	112 bp
IFN- γ	5' CATTgAAAgCCTAgAAAg 3' gAAATgCATCCTTTTTTCg	263 bp
IL-4	5' gCCATATCCACggATgCg 3' TgCAgCTTATCgATgAATCC	285 bp
IL-2	5' TCCACTTgAAgCTCTACAg 3' gAgTgAAATCCAgAACATgCC	244 bp

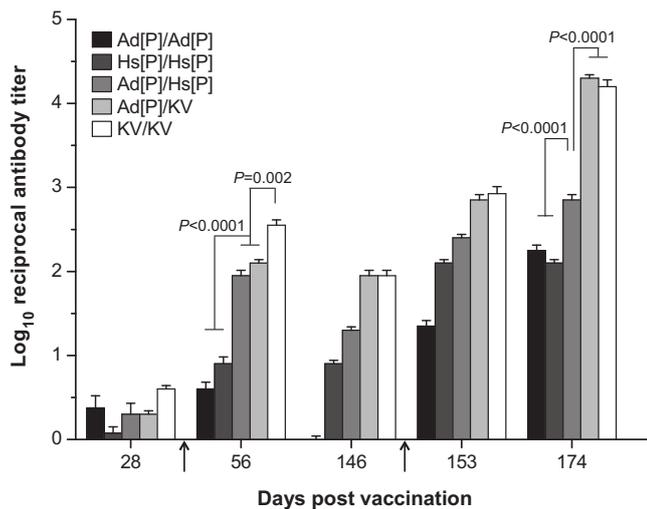


Fig. 2. Specific titers to FMDV induced in mice following different prime-boost vaccination strategies. The specific antibody titers were measured by spELISA. Each bar represents the mean ($n=4$) of the \log_{10} of the reciprocal antibody titer values \pm S.E.M., at 28, 56, 146, 153, and 174 dpv. The background signal obtained with the negative control, Ad[G]/Ad[G] group, have been subtracted from the titers of all the groups. The significance of the differences in antibodies titers between groups at days 156 and 174 dpv are indicated at the top of the bars. The arrows indicate the boost and re-stimulation, respectively. KV: killed FMD virus; [P]: FMDV capsid proteins plus 2A and 3C protease. [G]: GFP.

boosted with half dose of KV, compared to all the other groups ($P < 0.0001$). This rise in antibody titers correlated with an increment in the number of FMDV specific antibody secreting cells (ASC, data not shown).

It is important to emphasize that: (i) the immunization with KV/KV and the combined immunization with Ad[P]/KV reached the highest antibody titers, with no significant differences between them ($P=0.8$); (ii) the vaccination strategy that used a combination of both viral vectors (Ad[P]/Hs[P]) in the absence of KV, elicited very high titers, which were significantly different from the previously mentioned groups and from the homologous vector immunization groups (Ad[P]/Ad[P] and Hs[P]/Hs[P], $P=0.00004$, Fig. 2).

After prime-boost immunization (56 dpv) the avidity of the elicited antibodies was significantly higher in the groups boosted with KV (Ad[P]/KV and KV/KV) ($P < 0.0001$) and was rather low in the groups immunized with viral vectors alone (Fig. 3). However, antibody avidity increased dramatically in the groups primed with viral vectors after stimulation with virus ($P < 0.0001$), while the increment was not significant in the group that received KV ($P=0.32$). Statistical significance of the rise in each group primed with vectors is shown in Fig. 3.

3.3. Analysis of T cell responses

T cell stimulation in splenocytes derived from animals primed-boosted with Ad[P]/Hs[P], Ad[P]/KV, or KV/KV, was found significantly higher ($P < 0.01$) than in those of the negative control group (Ad[G]). In contrast, no significant differences in T cell stimulation was found for the group primed-and-boosted with Ad[P] and the negative control, while the group of mice immunized with two doses of

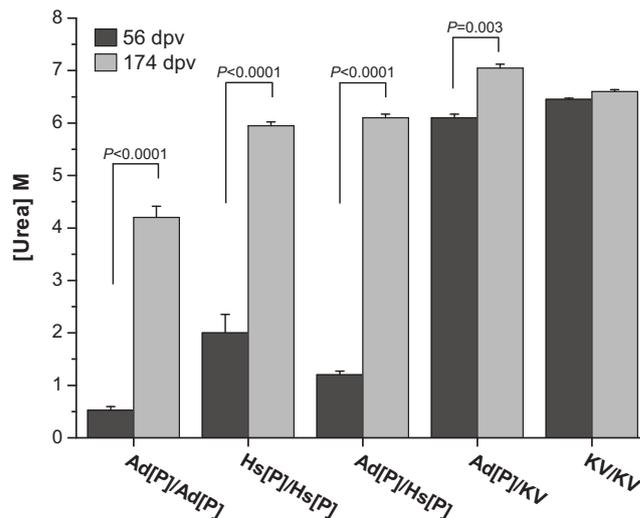


Fig. 3. Evaluation of specific antibody avidity elicited by the different immunization regimens. Binding avidity of the antibodies elicited in mice was analyzed using a urea displacement ELISA at 56 and 174 dpv, after re-stimulation with 0.5 μ g of virus. The results are expressed the urea molar concentration ([Urea] M) required to displace 50% of IgG initially bound on the plate. The significance of the increased affinity maturation after re-stimulation is shown for each mice group at the top of the bars. KV: killed FMD virus; [P]: FMDVcapsid proteins plus 2A and 3C protease.

Hs[P] showed a SI similar to the heterologous immunization regimens (Table 3).

3.4. Antibody and cytokine profile of the immune responses induced in mice by the different immunization protocols

To further characterize the antibody response resulting from the different immunization approaches, the FMDV-specific IgG1 and IgG2a subclasses were measured. In mice primed with viral vectors, regardless of the boost, a predominance of IgG2a was observed, with lower levels of IgG1 (IgG1/IgG2a = 0.5–0.8), suggesting a bias toward a Th1 type response.

The levels of both IgG1 and IgG2a increased when the animals were primed with Ad[P] and boosted with KV, whereas the IgG subclasses ratio remained similar to the other groups immunized with viral vectors (IgG1/IgG2a = 0.8). As expected, in mice primed-and-boosted with KV, IgG1 was found to be the predominant IgG

Table 3
Lymphoproliferation responses induced by different prime-boost vaccination regimens at 56 dpv.

Vaccine	T cell Stimulation Index	p-Values
Ad[P]/Ad[P]	1.0 \pm 0.30 ^a	0.385
Hs[P]/Hs[P]	2.5 \pm 0.50	0.0003 ^b
Ad[P]/Hs[P]	2.7 \pm 0.50	0.0002 ^b
Ad[P]/KV	2.9 \pm 0.70	0.0001 ^b
KV/KV	3.9 \pm 1.1	0.00001 ^b
Ad[G]/Ad[G]	0.6 \pm 0.35	–

^a Standard Deviation.

^b Significant difference compared to the group inoculated with 2 doses of the negative control Ad[G]; KV: killed FMD virus; [P]: FMDV capsid proteins plus 2A and 3C protease; [G]: GFP.

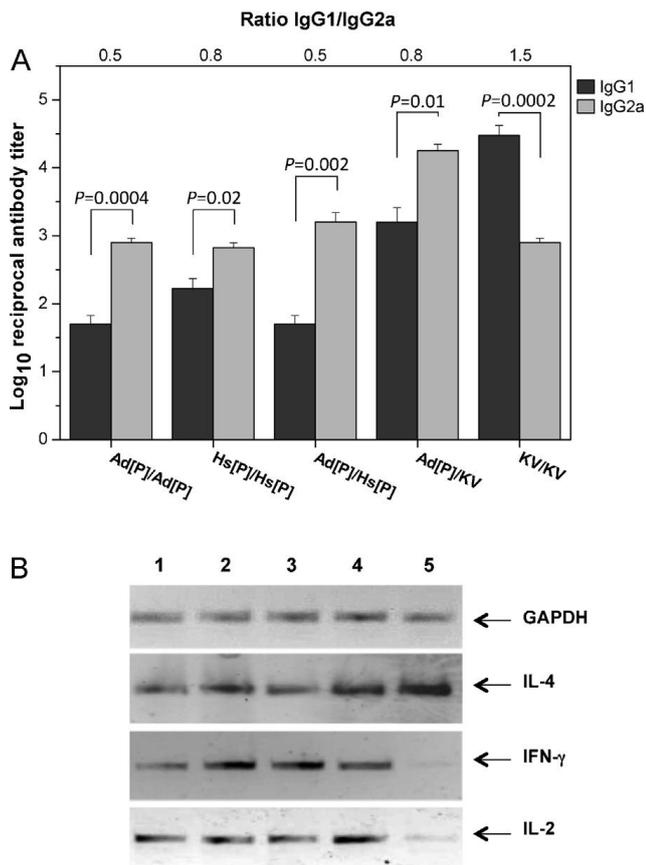


Fig. 4. Type of immune response. (A) Analysis of serum IgG1 and IgG2a specific responses at 56 dpv. ELISA titers of anti-FMDV specific IgG1 or IgG2a are shown. The ratio IgG1/IgG2a is displayed at the top of the graph. The consistency of IgG ratios was assessed through the determination of the significant differences in the titers of both isotypes in each group (shown at the top of the bars). (B) mRNA accumulation of IL-4, INF γ and IL-2 evaluated by RT-PCR in cultured splenocytes obtained from mice sacrificed at 56 dpv and stimulated with O1/Campos virus strain. The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA level was used as normalization control. Lane 1: Ad[P]/Ad[P]; lane 2: Hs[P]/Hs[P]; lane 3: Ad[P]/Hs[P]; lane 4: Ad[P]/KV; lane 5: KV/KV. KV: killed FMDV virus; [P]: FMDV capsid proteins plus 2A and 3C protease.

subclass (IgG1/IgG2a = 1.5). These results suggested that the system used for priming may be dominant in the induction and activation of the type of response elicited (Fig. 4A).

The highest IgG1 titer was induced by two doses of adjuvanted KV ($P=0.0002$) and the highest IgG2a titer corresponded to the group primed with Ad[P] and boosted with KV ($P=0.01$).

Statistical soundness of the IgG ratios was established through the significance of the differences between the levels of IgG1 and IgG2a in each experimental group, indicated in Fig. 4A for each pair of bars.

The results described above were further corroborated by monitoring the mRNA accumulation of representative Th1 (IL-2 and INF γ) and Th2 (IL-4) types of cytokines, by RT-PCR, in cultured splenocytes obtained from mice sacrificed at 56 dpv and stimulated with O1/Campos virus strain. The groups of mice that were primed with viral vectors (Fig. 4B, lanes 1–4) showed a similar pattern of IL-2, INF- γ and IL-4 mRNA accumulation. In contrast, mice

Table 4

Protection of mice after challenge with FMDV O1/Campos strain.

Group	Protection 56 dpv (%)	Protection 146 dpv (%)
Ad[P]/Ad[P]	0/4 ^a (0%)	0/4 (0%)
Ad[P]/Hs[P]	3/4 (75%)	4/4 (100%)
Ad[P]/KV	3/4 (75%)	ND
KV/KV	2/3 ^b (67%)	ND
Ad[G]/Ad[G]	0/4 (0%)	0/4 (0%)

^a Number of protected/total number of mice.

^b One mouse died previous to challenge, by unrelated causes.

ND, not done; Ad, adenovirus vector; Hs, herpesvirus amplicon; KV, killed FMDV; P, FMDV capsid proteins plus 2A and 3C protease; G, GFP.

primed and boosted with KV vaccine showed a higher level of accumulation of IL-4 mRNA than the other groups, and only marginal accumulation or mRNA of IL-2 and INF- γ (Fig. 4B, lane 5). No cytokine mRNAs could be detected when naive control splenocytes were stimulated or when splenocytes were cultured in the absence of inactivated virus (data not shown).

3.5. Protection from challenge

After the viral challenge performed at 56 dpv, protection was found in 3 out of 4 mice (75%) of the groups primed-boosted with Ad[P]/Hs[P] and Ad[P]/KV, and in 2 out of 3 mice (67%) of the KV primed-and-boosted group. One mouse in the latter group died of unrelated causes before challenge. No protection (0%) was found in the groups 1 and 6, immunized with 2 doses of Ad[P] or Ad[G], respectively (Table 4). Mice in the protected groups developed highly variable levels of neutralizing antibodies, but in all the animals of the non-protected groups the titers were found below the test detection limit (data not shown).

Challenge of other three groups of 4 mice was performed at 146 dpv (Table 4). A group immunized with Ad[P] and boosted with Hs[P] was totally protected from challenge (100%), while one group of mice immunized with 2 doses of Ad[P] and the negative control group Ad[G] were not protected (0/4 protected in both groups). This result highlights that the sequential inoculation of mice with different viral vectors (Ad[P]/Hs[P]) was able to elicit high levels of protection that persisted at least over a period of 4 months after the boost immunization. Similar protection results have been consistently found in this murine model when mice were challenged after vaccination with two doses of KV (Berinstein et al., 1991; Zamorano et al., unpublished).

4. Discussion

The development of different types of recombinant FMDV vaccines has been extensively explored (Sanz-Parra et al., 1999b; Grubman et al., 1993; Grubman, 2005; Borrego et al., 2006; D'Antuono et al., 2010, among others). Although they are not as effective as the conventional inactivated virus vaccine, they may contribute to other valuable properties, mostly related to safety and type of immune response. Heterologous prime-boost vaccination strategies may offer a suitable technology platform to

improve the performance of FMDV conventional or novel vaccines, enhancing the immune responses against the shared antigen.

In the present study, we examined the influence of prime–boost immunization regimens on their ability to promote the development of a protective immune response against FMDV, using either a combination of two viral vectors, or priming with Ad and boosting with the conventional KV vaccine.

A significant finding reported herein is that, combining Ad prime with either Hs or KV boost, it was possible to elicit a sustained and strong response, which was able to protect mice from challenge with FMDV (O1/Campos strain) for at least 5 months after primary immunization (Table 4), similarly than two doses of conventional inactivated vaccine.

Antibody titers after prime-boost were significantly higher in the group that received two doses of adjuvanted KV ($P < 0.002$), followed by the group sequentially vaccinated with different vectors instead of either vector alone ($P < 0.0001$), suggesting that the use of an alternative mode of antigen presentation markedly enhanced the immune response against the shared antigen (here, the P transgene), as it has been previously reported for other pathogens (Sun et al., 2010; Lin et al., 2011; Reyes-Sandoval et al., 2012). Sustained high titers of specific antibodies were maintained up to 146 dpv (Fig. 2).

Analysis of anti-FMDV IgGs isotype profile revealed that both IgG1 and IgG2a were induced in all the immunized groups (Fig. 4A), consistent with a T cell-dependent response against FMDV (Collen et al., 1989). The highest IgG1 titer was induced by two doses of adjuvanted KV ($P = 0.0002$), which is in agreement with previous findings in cattle and pigs (Mulcahy et al., 1990; Cox et al., 2003), while the highest IgG2a titer corresponded to the group primed with Ad[P] and boosted with KV ($P = 0.01$). These data indicate that Ad[P] prime followed by Hs[P] or KV boost promoted a cytokine milieu favoring the switching of IgG isotypes toward IgG2a, thus skewing the immune responses toward a Th1 type. It has been reported for HIV recombinant vaccines, that in prime–boost combinations of Ad and Hs vectors, the initial priming can shape the immune response quality after a boost (Duke et al., 2007). Our results are consistent with this observation, since following the re-stimulation with 0.5 μg of KV at 146 dpv, the groups of animals immunized with either Ad[P]/Hs[P] or Ad[P]/KV increased the total antibody response without changing the IgG1/IgG2a ratio determined at 56 dpv (data not shown). Thus, the initial Ad-priming may play a role in shaping the qualitative nature of the immune response after boosting, as it was previously reported by others (Rodriguez et al., 2008; Lin et al., 2011; Reyes-Sandoval et al., 2012).

Protection against FMDV challenge was observed at 56 and 146 dpv in animals receiving Ad[P] prime – Hs[P] boost, with a variable level of neutralizing antibodies and a predominance of the IgG2a isotype. The immunogen combinations that include at least one viral vector were able to trigger both Th1 and Th2 types of immune responses, which might have acted in concert to induce FMDV-specific antibodies and the proliferation of CD4+

and CD8+ FMDV specific T-cells (Fig. 4 and Table 3). In fact, we observed mRNA accumulation of representative cytokines of both types of immune response (IL-2, IFN- γ and IL-4) in cultured splenocytes from mice receiving the combined immunization, whereas IL-4 but not IFN- γ was present in KV/KV immunized mice.

Upon long-term re-exposure to O1/Campos virus, we observed a strong induction of specific antibodies with high avidity (Figs. 2 and 3), and an augmented population of FMDV-specific splenic ASC (data not shown). This anamnestic response upon exposure to the pathogen might be critical for its rapid elimination before the host is overwhelmed by the infection (Doel, 1999). Interestingly, antibody avidity, which was lower in the experimental groups that include only viral vectors, increased significantly after re-exposure to the virus, showing that these groups can quickly mature their response after a virus encounter (Fig. 3). Heterologous prime-boost vaccination regimens might induce the appearance and persistence of antigen presenting cells, responsible of maintaining the levels of newly synthesized anti-FMDV antibodies, which could be very important in the development of efficient vaccines against the disease (Wigdorovitz et al., 1997).

The use of the in situ antigen expression driven by viral vectors is a relatively recent approach in the FMD vaccinology field. The data presented in this study suggest that the combination of Ad vectors with either Hs or KV in heterologous prime-boost regimens have the potential to enhance the quality and magnitude of the immune response against FMDV, compared to prime-boost with the same viral vectors. In addition, the data generated suggest that an immunization regimen of Ad prime-Hs boost elicited a sustained and strong response, which was able to protect mice from challenge with FMD virus for at least five months after primary immunization. Although these studies were carried out in a mouse model that has shown certain parallelism with protective responses in cattle (Fernandez et al., 1986; Dus Santos et al., 2000), it will be very important to try in the future these combinations in the natural hosts (pigs or cattle). Moreover, this study also supports the rationale for continuing FMDV vaccine studies with combinations of different vectors in a prime-boost regimen since this strategy would allow the discrimination between antibody responses of vaccinated or infected animals.

Acknowledgements

We thank Cristina Seki, Silvia Rojana and Virginia Tribulatti for their technical assistance. This work was supported by FONCYT (PAE-PICT 2007-0025) and the National Research Council of Argentina (CONICET). CEVAN, ICT Milstein-CONICET and INTA are members of the Argentine FMD Inter-institutional Network for Research and Development in Foot-and-mouth Disease (RIIDFA).

References

Barnard, A.L., Arriens, A., Cox, S., Barnett, P., Kristensen, B., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2005. Immune response characteristics

- following emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease. *Vaccine* 23, 1037–1047.
- Berinstein, A., Piatti, P., Gaggino, O.P., Schudel, A., Sadir, A., 1991. Enhancement of the immune response elicited with foot-and-mouth disease virus vaccines by an extract of the *Mycobacterium* sp. wall. *Vaccine* 9, 883–888.
- Borrego, B., Fernandez-Pacheco, P., Ganges, L., Domenech, N., Fernandez-Borges, N., Sobrino, F., Rodriguez, F., 2006. DNA vaccines expressing B and T cell epitopes can protect mice from FMDV infection in the absence of specific humoral responses. *Vaccine* 24, 3889–3899.
- 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.
- Carrillo, C., Wigdorovitz, A., Oliveros, J.C., Zamorano, P.I., Sadir, A.M., Gomez, N., Salinas, J., Escribano, J.M., Borca, M.V., 1998. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J. Virol.* 72, 1688–1690.
- Collen, T., Pullen, L., Doel, T.R., 1989. T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *J. Gen. Virol.* 70, 395–403.
- Cox, S.J., Aggarwal, N., Statham, R.J., Barnett, P.V., 2003. Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines. *Vaccine* 21, 1336–1347.
- D'Antuono, A., Laimbacher, A.S., La Torre, J., Tribulatti, V., Romanutti, C., Zamorano, P., Quattrocchi, V., Schraner, E.M., Ackermann, M., Fraefel, C., Mattion, N., 2010. HSV-1 amplicon vectors that direct the in situ production of foot-and-mouth disease virus antigens in mammalian cells can be used for genetic immunization. *Vaccine* 28, 7363–7372.
- Davtyan, H., Mkrtichyan, M., Movsesyan, N., Petrushina, I., Mamikonyan, G., Cribbs, D.H., Agadjanyan, M.G., Ghochikyan, A., 2010. DNA prime-protein boost increased the titer, avidity and persistence of anti-Abeta antibodies in wild-type mice. *Gene Ther.* 17, 261–271.
- Doel, T.R., 1999. Optimisation of the immune response to foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 17, 1767–1771.
- Doel, T.R., 2003. FMD vaccines. *Virus Res.* 91, 81–99.
- Duke, C.M., Maguire, C.A., Keefer, M.C., Federoff, H.J., Bowers, W.J., Dewhurst, S., 2007. HSV-1 amplicon vectors elicit polyfunctional T cell responses to HIV-1 Env, and strongly boost responses to an adenovirus prime. *Vaccine* 25, 7410–7421.
- Dus Santos, M.J., Wigdorovitz, A., Maradei, E., Periolo, O., Smitsaart, M.V., Borca, M.V., Sadir, A.M., 2000. A comparison of methods for measuring the antibody response in mice and cattle following vaccination against foot and mouth disease. *Vet. Res. Commun.* 24, 261–273.
- Fernandez, F.M., Borca, M.V., Sadir, A.M., Fondevila, N., Mayo, J., Schudel, A.A., 1986. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet. Microbiol.* 12, 15–24.
- Grubman, M.J., 2005. Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. *Biologicals* 33, 227–234.
- Grubman, M.J., Lewis, S.A., Morgan, D.O., 1993. Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine* 11, 825–829.
- Li, Y., Stirling, C.M., Denyer, M.S., Hamblin, P., Hutchings, G., Takamatsu, H.H., Barnett, P.V., 2008. Dramatic improvement in FMD DNA vaccine efficacy and cross-serotype antibody induction in pigs following a protein boost. *Vaccine* 26, 2647–2656.
- Lin, S.C., Huang, M.H., Tsou, P.C., Huang, L.M., Chong, P., Wu, S.C., 2011. Recombinant trimeric HA protein immunogenicity of H5N1 avian influenza viruses and their combined use with inactivated or adenovirus vaccines. *PLoS ONE* 6, e20052.
- Lu, S., 2009. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 346–351.
- Mattion, N., König, G., Seki, C., Smitsaart, E., Maradei, E., Robiolo, B., Duffy, S., Leon, E., Piccone, M., Sadir, A., Bottini, R., Cosentino, B., Falczuk, A., Maresca, R., Periolo, O., Bellinzoni, R., Espinoza, A., La Torre, J., Palma, E., 2004. Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: characterization of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease. *Vaccine* 22, 4149–4162.
- Mayr, G.A., Chinsangaram, J., Grubman, M.J., 1999. Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* 263, 496–506.
- Mulcahy, G., Gale, C., Robertson, P., Iyisan, S., DiMarchi, R.D., Doel, T.R., 1990. Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 8, 249–256.
- Perciani, C.T., Peixoto, P.S., Dias, W.O., Kubrusly, F.S., Tanizaki, M.M., 2007. Improved method to calculate the antibody avidity index. *J. Clin. Lab. Anal.* 21, 201–206.
- 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.
- Reyes-Sandoval, A., Rollier, C.S., Milicic, A., Bauza, K., Cottingham, M.G., Tang, C.K., Dicks, M.D., Wang, D., Longley, R.J., Wyllie, D.H., Hill, A.V., 2012. Mixed vector immunization with recombinant adenovirus and MVA can improve vaccine efficacy while decreasing antivector immunity. *Mol. Ther.* 20, 1633–1647.
- Rodriguez, A., Goudsmit, J., Companjen, A., Mintardjo, R., Gillissen, G., Tax, D., Sijtsma, J., Weverling, G.J., Holterman, L., Lanar, D.E., Havenga, M.J., Radosevic, K., 2008. Impact of recombinant adenovirus serotype 35 priming versus boosting of a *Plasmodium falciparum* protein: characterization of T- and B-cell responses to liver-stage antigen 1. *Infect. Immun.* 76, 1709–1718.
- Saeki, Y., Fraefel, C., Ichikawa, T., Breakefield, X.O., Chioocca, E.A., 2001. Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. *Mol. Ther.* 3, 591–601.
- Sanz-Parra, A., Jimenez-Clavero, M.A., Garcia-Briones, M.M., Blanco, E., Sobrino, F., Ley, V., 1999a. Recombinant viruses expressing the foot-and-mouth disease virus capsid precursor polypeptide (P1) induce cellular but not humoral antiviral immunity and partial protection in pigs. *Virology* 259, 129–134.
- Sanz-Parra, A., Vazquez, B., Sobrino, F., Cox, S.J., Ley, V., Salt, J.S., 1999b. Evidence of partial protection against foot-and-mouth disease in cattle immunized with a recombinant adenovirus vector expressing the precursor polypeptide (P1) of foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 80, 671–679.
- Seki, C., Robiolo, B., Periolo, O., Iglesias, M., D'Antuono, A., Maradei, E., Barros, V., La Torre, J., Mattion, N., 2009. Rapid methodology for antigenic profiling of FMDV field strains and for the control of identity, purity and viral integrity in commercial virus vaccines using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 133, 239–251.
- Sobrino, F., Domingo, E., 2001. Foot-and-mouth disease in Europe. FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. *EMBO Rep.* 2, 459–461.
- Sun, Y., Li, N., Li, H.Y., Li, M., Qiu, H.J., 2010. Enhanced immunity against classical swine fever in pigs induced by prime-boost immunization using an alphavirus replicon-vectored DNA vaccine and a recombinant adenovirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137, 20–27.
- Vaine, M., Wang, S., Hackett, A., Arthos, J., Lu, S., 2010. Antibody responses elicited through homologous or heterologous prime-boost DNA and protein vaccinations differ in functional activity and avidity. *Vaccine* 28, 2999–3007.
- Wigdorovitz, A., Zamorano, P., Fernandez, F.M., Lopez, O., Prato-Murphy, M., Carrillo, C., Sadir, A.M., Borca, M.V., 1997. Duration of the foot-and-mouth disease virus antibody response in mice is closely related to the presence of antigen-specific presenting cells. *J. Gen. Virol.* 78, 1025–1032.
- Woodland, D.L., 2004. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol.* 25, 98–104.
- Zhang, C., Wang, B., Wang, M., 2011. GM-CSF and IL-2 as adjuvant enhance the immune effect of protein vaccine against foot-and-mouth disease. *Virol. J.* 8, 7.



Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Evaluation of the immune response to *Anaplasma marginale* MSP5 protein using a HSV-1 amplicon vector system or recombinant protein



Carlos Palacios^a, Susana Torioni de Echaide^b, Nora Mattion^{a,*}

^a Centro de Virología Animal, Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. Cesar Milstein, CONICET, Saladillo 2468, C1440FFX, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

^b Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Ruta 34 Km 227, CP 2300, Rafaela, Santa Fe, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2014

Accepted 10 October 2014

Keywords:

Anaplasma marginale

MSP5

Herpesvirus amplicon vectors

Prime-boost vaccination

ABSTRACT

Anaplasma marginale is an intraerythrocytic vector-borne infectious agent of cattle. Immunization with the current vaccine, based on parasitized erythrocytes with live *Anaplasma centrale*, shows some constraints and confers partial protection, suggesting the feasibility for the development of new generation of vaccines. The aim of the present study was to assess the effect of sequential immunization of BALB/c mice, with herpesvirus amplicon vector-based vaccines combined with protein-based vaccines, on the quality of the immune response against the major surface protein 5 of *A. marginale*. The highest antibody titers against MSP5 were elicited in mice that received two doses of adjuvanted recombinant protein ($p < 0.0001$). Mice treated with a heterologous prime-boost strategy generated sustained antibody titers at least up to 200 days, and a higher specific cellular response. The results presented here showed that sequential immunization with HSV-based vectors and purified antigen enhances the quality of the immune response against *A. marginale*.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Anaplasmosis is a relevant vector-borne hemoparasitic rickettsial disease of ruminant livestock, caused by the intraerythrocytic rickettsia *Anaplasma marginale* (Dumler et al., 2001), in tropical and subtropical regions of the world, including South America (Brayton et al., 2009; Guglielmo, 1995; Suarez and Noh, 2011). It is transmitted either biologically by ixodid ticks or mechanically through needles and biting flies. The replication of the rickettsia in erythrocytes of infected cattle, results in anemia, weight loss, abortions, and eventually death. Infection is characterized by sequential cycles of rickettsemia, which occurs as a logarithmic increase in the parasite population, followed by a dramatic decline. Each cycle reflects the emergence of a new generation of bacteria expressing variants of the major surface protein 2 (MSP2) (French et al., 1999).

In cattle that survive clinical disease, the microorganisms persist indefinitely after infection, although at low levels, acting as reservoirs for further transmission (Aubry and Geale, 2011; Kuttler et al., 1984; Vidotto et al., 1994), and remaining protected against subsequent homologous challenge (Aubry and Geale, 2011).

The vaccine against bovine anaplasmosis, currently used in several countries, is based on live *A. centrale*, multiplied in splenectomized calves. Although one dose of this vaccine confers immunity for several years, it has the drawbacks of requiring exhaustive quality

control to prevent the presence of other blood-borne organisms in the donor calves and the induction of only partial protection from challenge with virulent *A. marginale*.

New generation vaccines, such as those based on recombinant DNA methodologies, are not available yet for anaplasmosis control (OIE, 2012). Nevertheless, it has been reported that cattle immunized with an outer membrane fraction of *A. marginale* were protected from clinical disease following homologous challenge (Noh et al., 2008; Tebele et al., 1991), and that antibody titers against some members of outer membrane proteins, correlated with protection against anemia (Vidotto et al., 1994).

Several immunization strategies have been experimentally evaluated to protect cattle against anaplasmosis (Brown et al., 1998; McGuire et al., 1994; Tebele et al., 1991); however neither one prevents cattle from becoming persistently infected with *A. marginale*, as reviewed elsewhere (Aubry and Geale, 2011; Kocan et al., 2003).

Despite the advances in vaccine development, further studies are needed in order to evaluate the combination of novel antigen-delivery systems in the improvement of protection of cattle from *A. marginale* infection, and in blocking its biological transmission. Viral vectors represent an interesting delivery tool for DNA vaccines, which have not been extensively studied for anaplasmosis.

In this regard, HSV-1 amplicon vectors have a large transgene capacity (up to 150 kb), which allows the encapsidation of multiple genes or multiple copies of a transgene. Additional advantages of HSV-1 derived vectors include (i) low toxicity and low immunogenicity, in particular when helper virus-free amplicon vectors are used, (ii) high transduction efficiencies both in quiescent and

* Corresponding author. Tel.: +54 11 4686 6225; fax: +54 11 4686 6225.

E-mail address: nmattioncevan@centromilstein.org.ar (N. Mattion).

proliferating cells from most mammalian species, including antigen-presenting cells *in vivo*, (iii) genetic stability, and (iv) strong adjuvant effects, very long-lived immune responses, and the capacity of generating both humoral and cellular immune response and mucosal immunity (Cuchet et al., 2007; De Silva and Bowers, 2009; Epstein, 2009; Hocknell et al., 2002; Kaur et al., 2007; Laimbacher and Fraefel, 2014).

In this study, genetic vaccines based on HSV-1 amplicon vectors are explored as vehicles to deliver DNA encoding *A. marginale* Major Surface Protein 5 (MSP5) to assess the immune response generated in mice, in homologous viral vector vaccination, or in combination with recombinant protein.

2. Materials and methods

2.1. Cells and viruses

Vero, MA104, Vero-7b (Krisky et al., 1998; Marconi et al., 1996) and human glioma Gli36 (Kashima et al., 1995) cells were propagated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml). Vero-7b cell line provides the essential ICP4 and ICP27 immediate-early (IE) herpesvirus gene functions *in trans*, to support the *in vitro* propagation of replication defective HSV-1-LaLΔJ virus (Zaupa et al., 2003), used as helper in the production of the amplicon vectors. For culturing Vero-7b cell line, Geneticin® (500 µg/ml, Invitrogen, CA, Carlsbad, USA) was included in the medium.

2.2. Construction of amplicon plasmids

Amplicon DNA plasmids were constructed using the *pHSV*s plasmid system, as previously described (D'Antuono et al., 2010). The main genetic elements of *pHSV*s are: (i) a transcription unit including the HSV-1 IE 4/5 promoter to support transgene expression and an IRES element followed by EGFP as reporter gene for titration; (ii) a prokaryotic origin of DNA replication (*colE1*) and the ampicillin resistance gene (*AmpR*), to allow the propagation of the plasmids in *E. coli*; (iii) two functional HSV sequences (*ori* and *pac*) that support replication of the amplicon DNA and the packaging into HSV-1 particles.

The *msp5* open reading frame (Acc. num.: M93392.1) was PCR amplified from recombinant plasmid *pGEM/AmMSP5* using specific primers (sense: 5'-GTCCGACATGAGAATTTCAAGATTGT-3' and antisense: 5'-TTCGAACTAAGAATTAAGCATGTGAC-3'). The resulting product was inserted into the *Sall* and *BstBI* restriction sites of *pHSV_s*, generating *pHSV/MSP5* amplicon plasmid. An amplicon vector expressing the EGFP gene, *pHSV-EGFP* (D'Antuono et al., 2010), was used as negative control in immunofluorescence assays and immunization experiments. *pHSV-EGFP* possesses a transcription unit composed by the HSV-1 IE4/5 promoter, the EGFP coding sequence, and the SV40 early region polyadenylation site.

2.3. Stocks of amplicon vectors

In order to generate stocks of amplicon vectors, the amplicon plasmid DNA was transfected into T75 flasks of 70% confluent Vero-7b cells, using Lipofectamine™ and Plus™ Reagent (Invitrogen), following manufacturer's instructions. Transfected cells were infected the next day with HSV-1-LaLΔJ helper virus, at a multiplicity of infection (MOI) of 0.3 PFU/cell in medium 199 (M199, Invitrogen) supplemented with 1% FBS. When total cytopathic effect was observed, cells were scraped off and centrifuged at 2000 × g 5 min at 4 °C and the pellets were resuspended in 400 µl of M199 1% FBS and subjected to three cycles of freezing/thawing. The suspended pellets were sonicated on ice for 10 s, and clarified at 3000 × g, 10 min

at 4 °C. Released amplicon vectors were passaged once in Vero-7b cells, by adding HSV-1-LaLΔJ at an MOI of 0.1 helper virus per cell. Titers of helper virus in viral stocks were determined by plaque assay on Vero-7b cells (PFU/ml) and amplicon vectors titers were assessed on Gli36 cells by scoring the number of GFP positive cells under a fluorescence microscope, and expressed as Transducing Units per milliliter (TU/ml).

2.4. Immunofluorescence analysis

For immunofluorescence analysis, Vero or MA104 cells were seeded on round 12-mm cover glasses placed in 24-well plates at a density of 10⁵ cells per well. After 24 h, the monolayers were washed with PBS, and infected at a MOI of 0.1 TU/cell with amplicon vectors diluted in DMEM. The particles were allowed to adsorb for 1 h at 37 °C, 5% CO₂, washed with PBS, overlaid with DMEM supplemented with 10% FBS, and incubated at 37 °C, 5% CO₂. At 24 h post infection (hpi), the cells were washed once with cold PBS, fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS at room temperature (RT) for 15 min, and neutralized for 5 min with 100 mM glycine in PBS. After being washed with PBS, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 15 min at RT, and blocked with PBS supplemented with 3% bovine serum albumin (PBS-B) for 30 min at RT. Fixed cells were first incubated during 1 h in a humid chamber with the anti-MSP5 monoclonal antibody (MAb) ANAF16C1 (VMRD, Inc.) 2 µg/ml in PBS-B. After three washes with PBS, the cells were incubated, with a rabbit anti-mouse IgG Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody (Molecular Probes), diluted at 2 µg/ml in PBS-B buffer. All incubations were carried out at RT. Cell nuclei were stained with 300 nM DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen) in PBS for 5 min. The monolayers were washed three times with PBS, once with distilled water, and mounted using FluorSave™ Reagent (CalBiochem®) to preserve the fluorescence-labeled samples. Images were acquired using a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with the Nikon DS-Fi1 camera. Images were processed with ImageJ software (Schneider et al., 2012).

2.5. Expression of recombinant MSP5 protein

Two different recombinant MSP5 proteins were produced for different purposes: MSP5-Maltose Binding Protein (MBP) fusion and MSP5-6xHis (H₆) tagged. To obtain the recombinant proteins, *msp5* open reading frame was amplified by PCR (sense: 5'-GGATCCATGAGAATTTCAAGATTGT-3' and antisense: 5'-CTGCAGCTAAGATAAGCATGTGAC-3') and subcloned into the *BamHI* and *PstI* sites of *pMAL-c2x* (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA) or *pRSET* (Invitrogen) plasmids, respectively.

The recombinant plasmid *pMAL/MSP5* was used to transform *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen), and the rMSP5-MBP fusion protein produced was purified by affinity chromatography on an amylose resin (New England Biolabs, Inc., MA, USA), as described elsewhere (Knowles et al., 1996). This protein was used for animal immunization, and a competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA).

For lymphoproliferation and total antibody ELISA assay, the recombinant MSP5 protein with a 6xHistidine tag was used (MSP5-H₆). For this purpose, the *pRSET/MSP5* plasmid was used to transform *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen Corporation), and the recombinant MSP5-H₆ protein produced was purified by nickel metal affinity chromatography. Briefly, 3 ml of an overnight culture was inoculated into 300 ml of LB medium with 100 µg of ampicillin and 34 µg of chloramphenicol per milliliter, and grown at 37 °C to 0.5 OD_{600nm}. At that point, the expression of rMSP5-H₆ was induced by the addition of 1 mM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside. The bacteria were incubated at 37 °C for 3 additional hours, and harvested by centrifugation at 3500 × g for 20 min and the pellet was

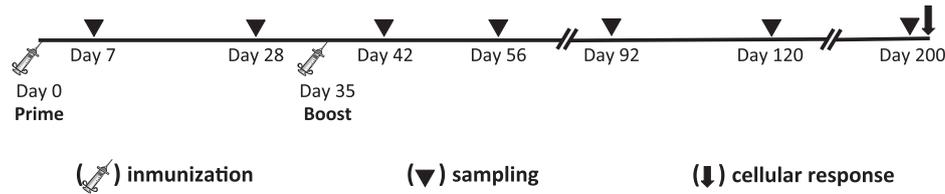


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design. BALB/c mice (six animals per group) were immunized twice with 35 days interval using the different regimens shown in Table 1. At day 200 post-vaccination, mice were killed and splenocytes harvested for the analysis of cellular immune response (↓). Blood samples were collected at the indicated times (♦).

suspended in 30 ml of binding buffer (20 mM sodium phosphate buffer, 500 mM NaCl, 25 mM imidazole, pH = 7.8). Cells were disrupted by sonication in an ice-chilled water bath (2.5 min in 30-s pulse, 90 W), treated with DNase (5 µg/ml) and RNase (5 µg/ml) 20 min at 4 °C. Clarified cell extract was prepared by centrifugation at 12000 × g, 4 °C, and filtered through a 0.45 µm filter. The purification process was carried out in a Fast Performance Liquid Chromatography ÄKTA purifier system, using a 5 ml HisTrapFF column (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), following an adapted protocol from a previous report (Zimmerman et al., 2006). Aliquots of isolated recombinant proteins were collected from the fractions across the major peak, purity assessed by SDS-PAGE, concentration by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and protein identity was determined by Western Blot using a MAb anti-polyHistidine antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.6. Experimental animals

Five-weeks-old BALB/c mice were obtained from the animal facilities of Pablo Cassará Laboratory, and maintained in animal Biosafety Level-2 facilities. Prior to immunization, mice were bled and sera were collected for subsequent ELISA. Five groups (G) of six mice were immunized according to the schedule described in Fig. 1. For immunizations using recombinant protein, mice received an intramuscular (IM) injection of 10 µg of rMSP5-MBP, formulated with Montanide™ISA50 (Seppic S. A., Paris, France), prepared according to the manufacturer's instructions. For immunizations using packaged amplicon particles, mice received 1×10^6 TU via the IM route (Table 1). Booster immunizations were administered 5 weeks after priming, and mice were sacrificed at 23 weeks following the boost. Blood samples were collected 1 week after each injection and at different time points during a period of 4 months (Table 1), and the obtained sera stored at -20 °C until required. The animals were maintained in accordance with federal guidelines and institutional policies.

2.7. Analysis of antibody responses

The humoral immune responses were evaluated by measuring total specific IgG by standard indirect ELISA using rMSP5 protein,

and epitope specific IgG using cELISA, in plates coated with rMSP5-MBP fusion protein.

The cELISA with MSP5-MBP was modified from a previously described assay used to detect antibody against MSP5 in *A. marginale* infected cattle (Knowles et al., 1996). Briefly, purified rMSP5-MBP was serially diluted in coating buffer (0.05 M carbonate/bicarbonate, pH 9.6) and incubated in microtiter plates. The appropriate antigen dilution was determined through a checkerboard titration of rMSP5-MBP and MAb ANAF16C1. The mix, in PBS pH 7.2 containing 20 mM MgCl₂, was used to coat individual wells of flat-bottomed 96-well plates (Greiner-BioOne, Frickenhausen, Germany) for 1 h at 37 °C. Coated plates were blocked with 100 µl per well of coating buffer, supplemented with 10% of non-fat dry milk, for 1 h at 28 °C. Blocked plates were washed five times with PBS-T (0.01 M PBS containing 0.02% Tween 20). Mice sera were diluted 1:100 in PBS/0.075 M EDTA-EGTA (pH 6.3) with 10% non-fat milk and incubated and 100 µl samples were added to wells, incubated for 1 h at 28 °C, and washed five times with PBS-T. Horse-radish peroxidase-conjugated MAb ANAF16C1 was added at 0.2 µg per well, incubated for 1 h at 28 °C. Following washing, bound MAb was detected by addition of 100 µl of 3% H₂O₂/0.04 MABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] substrate, the reaction was terminated with 2N H₂SO₄, and optical density at 405 nm was recorded with an ELISA reader, after 30 min of reaction.

2.8. Lymphocyte proliferation assay

For proliferation assay of lymphocytes from immunized mice, spleen cells were harvested at sacrifice, cultured in 100 µl of RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, in 96-well plates (10⁶ cells per well), and stimulated with rMSP5-H₆ (12.5 µg/ml) or ConA (2.5 µg/ml) for 3 days at 37 °C, in a 5% CO₂ incubator. The in vitro cell proliferation was measured by scintillation counting, when pulsed, during the last 20 h of the experiment, with 1 µCi of [methyl-³H]-thymidine. Proliferative responses were calculated as the mean of triplicate wells and expressed as a Stimulation Index (SI) calculated as mean counts per min in the presence of the antigen/mean counts per min in the absence of antigen. The SI per group was expressed as the arithmetic mean ± standard error of the mean (SEM).

2.9. Statistical analysis

Data analyses and graphs were performed using GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) or IBM SPSS Statistics software v17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data were analyzed for homogeneity of variances using Levene's test for equality, and for normal distribution using Shapiro-Wilk test. Mean group differences were analyzed using Tukey test *post hoc* the one-way analysis of variance. Data were expressed as mean ± SEM and differences were considered significant for $p < 0.05$.

Table 1
Mice immunization groups.

Groups (n = 6)	Prime (day 0)	Boost (day 35)	Adjuvant	Dose
1	rMSP5	rMSP5	ISA50*	10 µg/10 µg
2	rMSP5	HSV[MSP5]	ISA50/-	10 µg/10 ⁶ TU
3	HSV[MSP5]	rMSP5	-/ISA50	10 ⁶ TU/10 µg
4	HSV[MSP5]	HSV[MSP5]	-/-	10 ⁶ /10 ⁶ TU
5	HSV[GFP]	HSV[GFP]	-/-	10 ⁶ /10 ⁶ TU

rMSP5: recombinant MSP5-MBP fusion protein; HSV[MSP5]: herpesvirus amplicon vector expressing MSP5; HSV[GFP]: control herpesvirus amplicon vector expressing GFP; ISA50: Montanide™ ISA50; TU: Transducing Units.

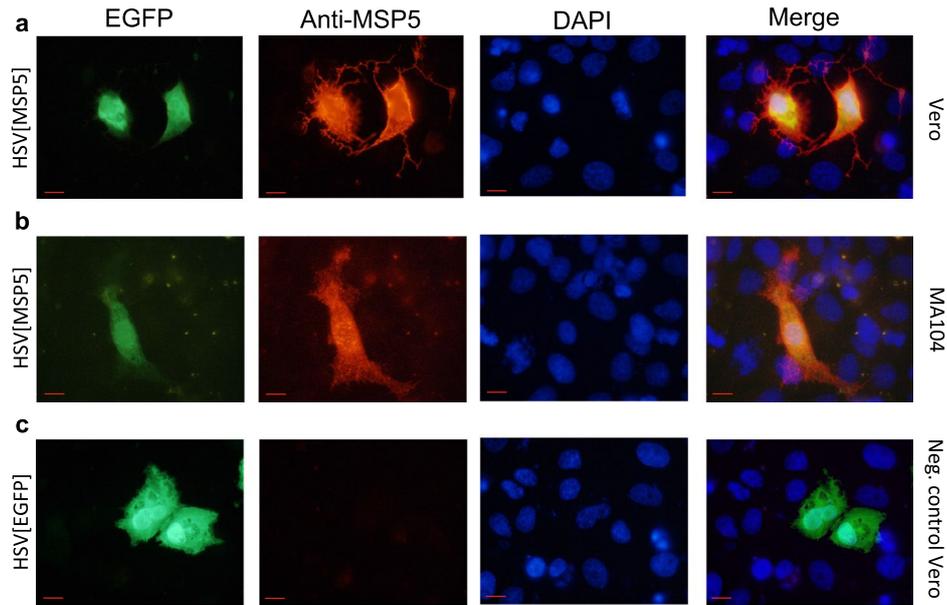


Fig. 2. Intracellular expression of *A. marginale* MSP5 and GFP proteins driven by HSV-1 derived amplicons. Vero and MA104 cells, were transduced with HSV[MSP5] (a) and (b), respectively, or HSV[GFP] amplicons (c), as indicated at the left of the panels. Different cell treatments are indicated at the top of the panel. Nuclei DNA was stained with DAPI. GFP fluorescence was observed under the microscope. Permeabilized cells were probed with MAb ANAF16C in order to detect expression of MSP5. The right panels are merged images and bars represent 10 μ m.

3. Results

3.1. Characterization of amplicon vectors

Vero and MA104 cell monolayers infected with HSV[MSP5] were stained with the MAb ANAF16C1, after 24 hpi, and vector-mediated MSP5 expression was observed under a fluorescence microscopy (Fig. 2a and b, respectively). The infected cells showed a cell membrane pattern very different from control-infected cells (Fig. 2c), indicating that the MSP5 over expression would affect the cell morphology. EGFP expression was used to identify vector-infected cells. Cells infected with HSV[EGFP] did not show immunoreactivity with the MAb ANAF16C1 (Fig. 2c).

3.2. Expression of rMSP5-H₆ and rMBP-MSP5

The recombinant protein rMSP5-H₆ was obtained in bacterial cultures in both soluble and insoluble fractions, while rMBP-MSP5 was expressed mainly in the soluble fraction. Both recombinant proteins migrated in SDS-PAGE close to their expected molecular weight, 27 and 66 kDa, respectively (Fig. 3, panels a and b).

The chimeric proteins were purified by affinity chromatography with amylose resin (rMBP-MSP5, Fig. 3a) and nickel-sepharose resin (rMSP5-H₆, Fig. 3b), and the final yield was of 2.29 and 0.072 g/l, respectively. Endotoxins were removed as previously described (Zimmerman et al., 2006). The rMSP5-MBP protein was used for mice immunization (Groups 1–3, Table 1) and for antibody

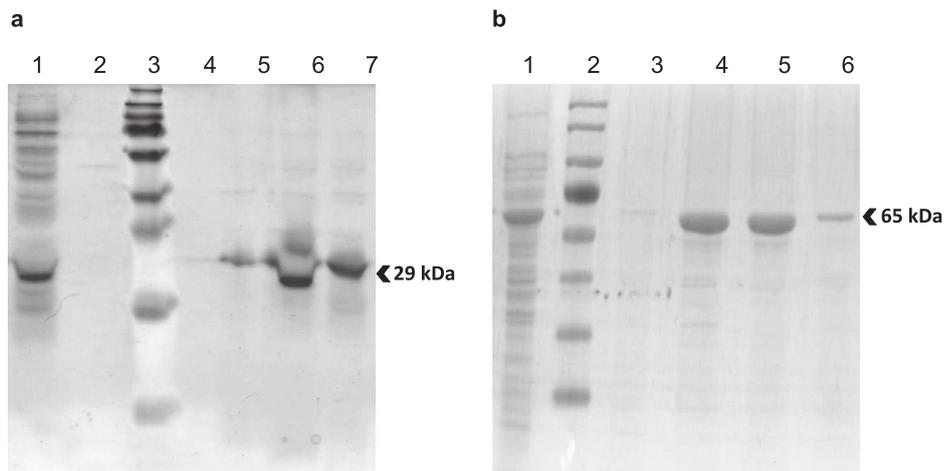


Fig. 3. Expression and purification of rMSP5-H₆ and rMSP5-MBP proteins. (a) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of purified rMSP5-H₆ protein expressed in bacteria. Lane 1, *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pRSET/AmMSP5] induced culture, 4 h after induction; lane 2, flow through; lane 3, molecular weight markers (PAGE-Ruler, Fermentas); lane 4, column wash; lanes 5–6, eluted fractions 8, 11 and 12, respectively. (b) SDS-PAGE of purified rMSP5-MBP protein expressed in bacteria. Lane 1, *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pMAL-c2X/AmMSP5] induced culture, 4 h after induction; lane 2, molecular weight markers (PAGE-Ruler, Fermentas); lane 3, column wash; lanes 4–7, eluted fractions 1–4, respectively. Arrowheads indicate recombinant rMSP5-H₆ and rMSP5-MBP proteins.

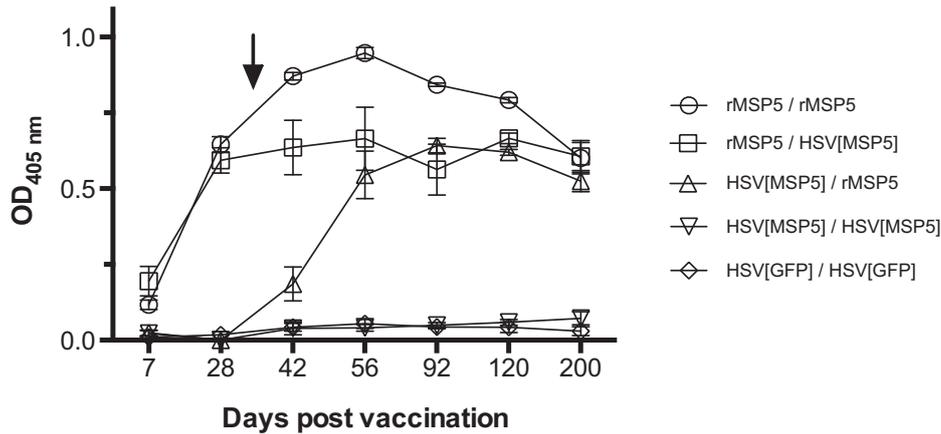


Fig. 4. Antibody responses elicited in mice after administration of HSV[MSP5] and/or rMSP5-MBP. Specific antibodies were measured by a competitive ELISA. Days post-vaccination are shown on the X-axis. Data represent the mean of OD_{405nm} reached in each group of mice at the different time points. Error bars show the standard errors of the mean. Groups: rMSP5/rMSP5 (○); rMSP5/HSV[MSP5] (□); HSV[MSP5]/rMSP5 (△); HSV[MSP5]/HSV[MSP5] (▽); HSV[GFP]/HSV[GFP] (◇).

quantification by ELISA, and rMSP5-H₆ protein was used in lymphoproliferation assays.

3.3. Antibody response to MSP5

Vaccination with 10 µg of oil adjuvanted rMBP-MSP5 rapidly raised a specific antibody response at 28 dpv (OD = 0.646). Following a boost with the same antigen at 35 dpv, it reached the maximum level at 56 dpv (OD = 0.947, Fig. 4). A booster immunization with 10⁶ TU of HSV[MSP5] (Group 2, Table 1) did not increase the antibody levels, but titers were maintained up to 200 dpv (OD = 0.606). Priming with the HSV[MSP5] (Group 3) did not induce detectable antibody titers at 28 dpv, although a fast increase in specific antibodies was observed after boosting the animals with purified rMSP5 (OD = 0.525 at 200 dpv, Fig. 4). At the end of the experiment, 200 days after the prime inoculation, there were no significant differences in the levels of antibody titers elicited with two doses of purified protein, or a prime with the amplicon vector followed by a boost of protein ($p = 0.839$) or the reverse sequence regimen ($p = 0.999$, Groups 2 and 3). Homologous prime-and-boost with the amplicon vector alone (Group 4) did not elicit detectable

antibodies and was indistinguishable from the negative control group (Group 5) inoculated with HSV[GFP] ($p = 0.502$).

3.4. Lymphoproliferation assays

Lymphoproliferation assays were carried out at 200 dpv to monitor the cellular response after stimulation of splenocytes cultures from mice of each group with purified rMSP5-H₆ or ConA. SI calculated from groups of mice that received one or two doses of amplicon vectors were higher than that achieved in the group vaccinated with two doses of purified protein (Fig. 5). The highest SI came out from the group immunized with a heterologous prime-boost schedule, which was primed with purified protein and followed by inoculation on 10⁶ TU of the amplicon vector expressing MSP5 *in situ* ($p = 0.01$).

4. Discussion

It has been shown that protective immunity against *A. marginale* requires the presence of humoral and cellular responses, with antibodies directed to outer membrane epitopes, and a coordinated

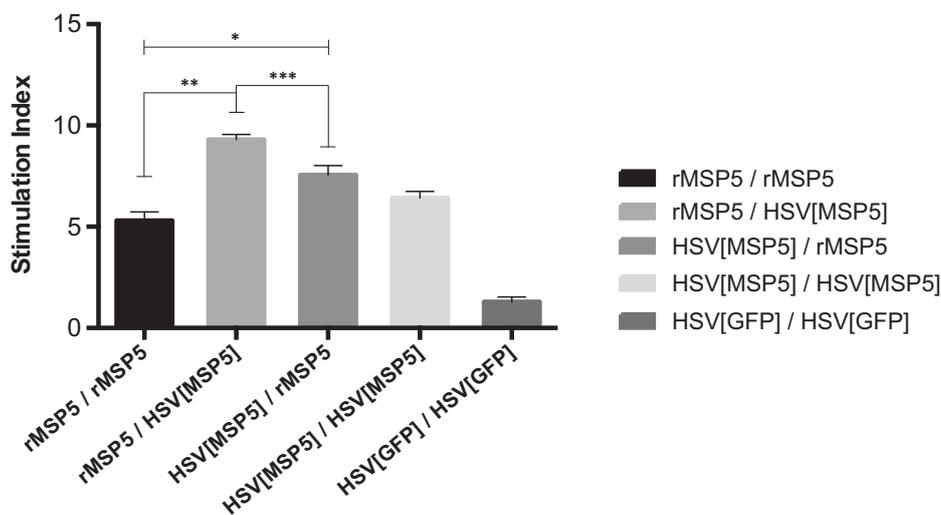


Fig. 5. Lymphoproliferation assays. Lymphocyte proliferative response, measured at 200 days post priming. SI, Stimulation Index. Data represent the mean of each group of mice. Error bars show the SD and asterisks shown above bars denote the relevant p values: * $p = 0.04$; ** $p = 0.01$; *** $p = 0.0006$.

activation of macrophages to enhance phagocytosis and killing (Brown et al., 1998). Regarding to the prevention of clinical disease, the *A. marginale* spp. *centrale* strain is currently used as a live vaccine, but it is not approved in the USA or the European Union because it is a blood-based vaccine (Hammac et al., 2013). This vaccine does not prevent infection, and persistently infected cattle are the major reservoir of *A. marginale* (Kocan et al., 2003).

In this work we evaluated a novel vaccination approach, studying the immune responses elicited by vaccines based on a herpesvirus derived amplicon vector expressing the major surface protein MSP5. The amplicon vectors were inoculated either alone or in combination with the recombinant protein expressed in bacteria, in a heterologous prime-and-boost immunization regimen.

The recombinant protein rMSP5 was highly immunogenic, as shown by prime-boost strategies with the homologous regimen rMSP5/rMSP5 (Group 1) or the combination rMSP5/HSV[MSP5] (Group 2) or HSV[MSP5]/rMSP5 (Group 3). In contrast, although HSV[MSP5] amplicons drove the *in situ* expression of MSP5, which was recognized by MAb ANAF16C1 in transduced Vero or MA104 cells (Fig. 2), the strategy involving prime-boost with HSV[MSP5] alone (Group 4) did not result in detectable antibodies measured by cELISA, and its profile was indistinguishable from that displayed by a negative control group (Group 5, $p = 0.501$).

Despite the different antibodies kinetics observed among groups 1, 2 and 3, at the end of the experience (200dpv) the antibody levels showed no significant differences among the three groups ($p = 0.824$, Fig. 4). A similar pattern was observed when total IgG against rMSP5 was measured (not shown).

Interestingly, the cellular immunity of animals that were subjected to heterologous vaccination regimens, and which included at least one inoculation with the amplicon particles (e.g., rMSP5 protein followed or preceded by HSV[MSP5]), was higher than in the animals treated with two doses of adjuvanted recombinant protein ($p = 0.01$ and $p = 0.04$, respectively). Of note, the group immunized only with amplicons (Group 4), which did not denote an increase in antibodies titers, showed significant cellular proliferation, at similar levels than the animals inoculated with adjuvanted protein ($p = 0.12$, Group 1). As the vaccine design strategies against anaplasmosis might take advantage of the simultaneous stimulation of humoral and cellular immune responses, this is an interesting result.

Groups 2 and 3, immunized using heterologous prime-boost regimens (protein and viral vectors) showed a long-term and balanced humoral and cellular response, almost independently of the immunogen used for the priming. These results are partially supported by a previous report in which, using one immunization with a HSV-1-based vector, elicited a long-term and protective immune response against the intracellular bacteria *Lysteria monocytogenes* (Lauterbach et al., 2004).

Protection in cattle immunized with purified MSPs was associated with a MSP-specific CD4+ T cells response, including the production of IFN- γ , TNF- α and the induction of specific antibodies promoting the opsonization of bacteria, stimulation of macrophages to perform phagocytosis, production of other cytokines and nitric oxide, which help eliminate intracellular bacteria (Brown et al., 1998; Palmer et al., 1999). Nevertheless, it has been reported that *A. marginale* specific CD4+ T cells primed during infection develop a poor memory response, probably preventing development of the proinflammatory mechanisms required for clearance of the pathogen (Han et al., 2010). During persistent infection, the adaptive immune response is able to control, but not to clear the infection. The inability to clear the infection is thought to be due to the generation of antigenically variant surface proteins, which escape detection and allow for a window of pathogen replication (Palmer et al., 2009). It has been hypothesized that different immunologic mechanisms control bacteremia in infected animals as

compared with immunized animals, although the reason is still unknown, animals immunized with outer membrane proteins were better able to control bacteremia as compared with infected animals (Noh et al., 2010). Thus, in contrast to naturally acquired immunity, sterile immunity to *A. marginale* can be induced by immunization with formulations of outer membrane proteins. The difference between the evasion of immunity resulting in persistent infection and the immunization-induced complete clearance is likely due to induction of antibody to conserved proteins that occurs following immunization, but does not occur during natural infection. Noh et al. (2010) studied several different epitopes of MSP2, which was a likely candidate for protection, concluding that protective antibodies were not directed against this outer protein. Nevertheless, it has been suggested that shifting the immune response toward other conserved epitopes that are poorly recognized during infection may be the key to effective vaccine development.

In this regard, conserved epitopes of MSP5 or other proteins might be properly exposed to the immune system through *in situ* expression driven by herpesvirus vectors, and therefore, future work using this system to express different *A. marginale* proteins may be of interest.

Moreover, the ability of the amplicon vectors to incorporate several copies of the same or different genes (Laimbacher and Fraefel, 2014) and the fact that they are barely affected by preexisting immunity (Brockman and Knipe, 2002), makes them promising tools to be explored. HSV-1 amplicons may accommodate multiple transcription units to co-express selected antigens (Bozac et al., 2006; D'Antuono et al., 2010; Laimbacher et al., 2012; Romanutti et al., 2013; Santos et al., 2006), such as other outer membrane proteins, multi-epitope sequences, cytokines or immunomodulatory molecules. The use of multi-antigenic vaccines may provide knowledge about the immunological synergies or interferences between different *A. marginale* antigens.

As it has previously reported using vaccines formulated with different antigens (Kano et al., 2008; Kawasaki et al., 2007; McGuire et al., 1994; Silvestre et al., 2014), we have shown as proof of concept, that the experimental vaccines based on *in situ* expression of antigens driven by HSV amplicon vectors were able to induce specific immune responses against *A. marginale* in a controlled *in vivo* experiment.

The evaluation of vaccines against anaplasmosis still relies on bovine tests, and no other animal model has been consistently established for this disease. Nevertheless, infection of BALB/c mice with *A. marginale* has been recently reported (Santos et al., 2013) and might prove to be a valuable tool to evaluate novel antigens. Further studies in the target host, or in an experimental animal model with correlation with protection in the host animal, will be necessary to assess the protective potential of these experimental vaccines.

Acknowledgments

This work was partially supported by the National Science and Technology Agency (FONCyT, PICT 2007-0025). CP is a fellow of CONICET. We thank Lorena Boado, Silvia Rojana, Paola Amherdt, Leandro Díaz, and Dr. Luana de Borba for their technical support.

References

- Aubry, P., Geale, D.W., 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary Emerging Diseases* 58, 1–30.
- Bozac, A., Berto, E., Vasquez, F., Grandi, P., Caputo, A., Manservigi, R., et al., 2006. Expression of human immunodeficiency virus type 1 tat from a replication-deficient herpes simplex type 1 vector induces antigen-specific T cell responses. *Vaccine* 24, 7148–7158.
- Brayton, K.A., Dark, M.J., Palmer, G.H., 2009. Anaplasma. In: Nene, V., Kole, C. (Eds.), *Genome Mapping and Genomics in Animal-Associated Microbes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 85–116.

- Brockman, M.A., Knipe, D.M., 2002. Herpes simplex virus vectors elicit durable immune responses in the presence of preexisting host immunity. *Journal of Virology* 76, 3678–3687.
- Brown, W.C., Shkap, V., Zhu, D., McGuire, T.C., Tuo, W., McElwain, T.F., et al., 1998. CD4(+) T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infection and Immunity* 66, 5406–5413.
- Cuchet, D., Potel, C., Thomas, J., Epstein, A.L., 2007. HSV-1 amplicon vectors: a promising and versatile tool for gene delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy* 7, 975–995.
- D'Antuono, A., Laimbacher, A.S., La Torre, J., Tribulatti, V., Romanutti, C., Zamorano, P., et al., 2010. HSV-1 amplicon vectors that direct the in situ production of foot-and-mouth disease virus antigens in mammalian cells can be used for genetic immunization. *Vaccine* 28, 7363–7372.
- De Silva, S., Bowers, W.J., 2009. Herpes virus amplicon vectors. *Viruses* 1, 594–629.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., et al., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combination and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 2145–2165.
- Epstein, A.L., 2009. HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties – a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 399–410.
- French, D.M., Brown, W.C., Palmer, G.H., 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infection and Immunity* 67, 5834–5840.
- Guglielmo, A.A., 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology* 57, 109–119.
- Hammac, G.K., Ku, P.-S., Galletti, M.F., Noh, S.M., Scoles, G.A., Palmer, G.H., et al., 2013. Protective immunity induced by immunization with a live, cultured *Anaplasma marginale* strain. *Vaccine* 31, 3617–3622.
- Han, S., Norimine, J., Brayton, K.A., Palmer, G.H., Scoles, G.A., Brown, W.C., 2010. *Anaplasma marginale* infection with persistent high-load bacteremia induces a dysfunctional memory CD4+ T lymphocyte response but sustained high IgG titers. *Clinical Vaccine Immunology* 17, 1881–1890.
- Hocknell, P.K., Wiley, R.D., Wang, X., Evans, T.G., Bowers, W.J., Hanke, T., et al., 2002. Expression of human immunodeficiency virus type 1 gp120 from herpes simplex virus type 1-derived amplicons results in potent, specific, and durable cellular and humoral immune responses. *Journal of Virology* 76, 5565–5580.
- Kano, F.S., Tamekuni, K., Coelho, A.L., Garcia, J.L., Vidotto, O., Itano, E.N., et al., 2008. Induced immune response of DNA vaccine encoding an association MSP1a, MSP1b, and MSP5 antigens of *Anaplasma marginale*. *Vaccine* 26, 3522–3527.
- Kashima, T., Vinters, H.V., Campagnoni, A.T., 1995. Unexpected expression of intermediate filament protein genes in human oligodendrogloma cell lines. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 54, 23–31.
- Kaur, A., Sanford, H.B., Garry, D., Lang, S., Klumpp, S.A., Watanabe, D., et al., 2007. Ability of herpes simplex virus vectors to boost immune responses to DNA vectors and to protect against challenge by simian immunodeficiency virus. *Virology* 357, 199–214.
- Kawasaki, P.M., Kano, F.S., Tamekuni, K., Garcia, J.L., Marana, E.R.M., Vidotto, O., et al., 2007. Immune response of BALB/c mouse immunized with recombinant MSPs proteins of *Anaplasma marginale* binding to immunostimulant complex (ISCOM). *Research in Veterinary Science* 83, 347–354.
- Knowles, D., Torioni de Echaide, S., Palmer, G., McGuire, T., Stiller, D., McElwain, T., 1996. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2225–2230.
- Kocan, K.M., De la Fuente, J., Guglielmo, A.A., Meléndez, R.D., Melendez, R.D., 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 698–712.
- Krisky, D.M., Wolfe, D., Goins, W.F., Marconi, P.C., Ramakrishnan, R., Mata, M., et al., 1998. Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus reduces cytotoxicity and permits long-term gene expression in neurons. *Gene Therapy* 5, 1593–1603.
- Kuttler, K.L., Zaugg, J.L., Johnson, L.W., 1984. Serologic and clinical responses of premunized, vaccinated, and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. *American Journal of Veterinary Research* 45, 2223–2226.
- Laimbacher, A.S., Fraefel, C., 2014. HSV-1 amplicon vectors as genetic vaccines. *Methods in Molecular Biology* 1144, 99–115.
- Laimbacher, A.S., Esteban, L.E., Castello, A.A., Abdusetir Cerfoglio, J.C., Argüelles, M.H., Glikmann, G., et al., 2012. HSV-1 amplicon vectors launch the production of heterologous rotavirus-like particles and induce rotavirus-specific immune responses in mice. *Molecular Therapy* 20, 1810–1820.
- Lauterbach, H., Kerksiek, K.M., Busch, D.H., Berto, E., Bozac, A., Mavromara, P., et al., 2004. Protection from bacterial infection by a single vaccination with replication-deficient mutant herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 78, 4020–4028.
- Marconi, P., Krisky, D., Oligino, T., Poliani, P.L., Ramakrishnan, R., Goins, W.F., et al., 1996. Replication-defective herpes simplex virus vectors for gene transfer in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11319–11320.
- McGuire, T.C., Stephens, E.B., Palmer, G.H., McElwain, T.F., Lichtensteiger, C.A., Leib, S.R., et al., 1994. Recombinant vaccinia virus expression of *Anaplasma marginale* surface protein MSP-1a: effect of promoters, leader sequences and GPI anchor sequence on antibody response. *Vaccine* 12, 465–471.
- Noh, S.M., Brayton, K.A., Brown, W.C., Norimine, J., Munske, G.R., Davitt, C.M., et al., 2008. Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization. *Infection and Immunity* 76, 2219–2226.
- Noh, S.M., Zhuang, Y., Futse, J.E., Brown, W.C., Brayton, K.A., Palmer, G.H., 2010. The immunization-induced antibody response to the *Anaplasma marginale* major surface protein 2 and its association with protective immunity. *Vaccine* 28, 3741–3747.
- OIE (Office International des Epizooties), 2012. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 7th Edition, Office International des Epizooties, Paris, France, [Chapter 2.4.1].
- Palmer, G.H., Rurangirwa, F.R., Kocan, K.M., Brown, W.C., 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitology Today* 15, 281–286.
- Palmer, G.H., Bankhead, T., Lukehart, S.A., 2009. "Nothing is permanent but change" – antigenic variation in persistent bacterial pathogens. *Cellular Microbiology* 11, 1697–1705.
- Romanutti, C., D'Antuono, A., Palacios, C., Quattrocchi, V., Zamorano, P., La Torre, J., et al., 2013. Evaluation of the immune response elicited by vaccination with viral vectors encoding FMDV capsid proteins and boosted with inactivated virus. *Veterinary Microbiology* 165, 333–340.
- Santos, K., Duke, C.M.P., Dewhurst, S., 2006. Amplicons as vaccine vectors. *Current Gene Therapy* 6, 383–392.
- Santos, P.S., Sena, A.S., Nascimento, R., Araújo, T.G., Mendes, M.M., Martins, J.R.S., et al., 2013. Epitope-based vaccines with the *Anaplasma marginale* MSP1a functional motif induce a balanced humoral and cellular immune response in mice. *PLoS ONE* 8, e60311.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–675.
- Silvestre, B.T., Rabelo, É.M.L., Versiani, A.F., da Fonseca, F.G., Silveira, J.A.G., Bueno, L.L., et al., 2014. Evaluation of humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized with a recombinant fragment of MSP1a from *Anaplasma marginale* using carbon nanotubes as a carrier molecule. *Vaccine* 32, 2160–2166.
- Suarez, C.E., Noh, S., 2011. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology* 180, 109–125.
- Tebele, N., McGuire, T.C., Palmer, G.H., 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infection and Immunity* 59, 3199–3204.
- Vidotto, M.C., McGuire, T.C., McElwain, T.F., Palmer, G.H., Knowles, D.P., 1994. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity* 62, 2940–2946.
- Zaupa, C., Revol-Guyot, V., Epstein, A.L., 2003. Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes. *Human Gene Therapy* 14, 1049–1063.
- Zimmerman, T., Petit Frère, C., Satzger, M., Raba, M., Weisbach, M., Döhn, K., et al., 2006. Simultaneous metal chelate affinity purification and endotoxin clearance of recombinant antibody fragments. *Journal of Immunological Methods* 314, 67–73.



MICROBIOLOGICAL IMAGE

Rotavirus VP6 protein expressed in cell culture by HSV-1-based vectors

Expresión en cultivo celular de la proteína VP6 de rotavirus mediante el uso de vectores virales basados en HSV-1

Carlos A. Palacios^{a,*}, Juan Claus^b, Nora Mattion^a

^a Centro de Virología Animal, Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. Cesar Milstein, CONICET, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

^b Laboratorio de Virología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

Received 9 September 2014; accepted 4 October 2014

Available online 5 March 2015

Herpes simplex virus (HSV)-based vectors have been used as platforms for the generation of genetic vaccines against different viruses. Some of the advantages of defective HSV-1 vectors include: (a) HSV-1 can infect most cell types, including antigen-presenting cells; (b) HSV-1 vectors have a large transgene capacity (up to 150-kbp); (c) HSV-1 vectors can be designed to cause no toxicity; (d) different studies showed that mice vaccinated with such vectors encoding antigens from different pathogens were partially protected^{1,3}, indicating that HSV-1 based vectors are attractive tools for the development of safe genetic vaccines.

There are two main platforms of HSV-1-derived vectors: defective recombinant viruses (deleted in ICP4, ICP27 and ICP22 genes) and amplicons. Defective HSV-1 viruses can only be propagated using a complementing cell line. Production of amplicons depends on helper functions, provided *in trans*. In both systems, different genetic elements were intentionally introduced to conduct the heterologous gene expression and to allow the titration of the vector stocks in different cell lines^{2,4}.

In our group, HSV-1 vectors were developed for the expression of several rotavirus genes. Genes from other pathogens were also expressed, thus generating a set of

tools to be tested as new vaccine candidates against different diseases.

In this section, we show two different HSV-1 vectors that express the VP6 protein from different rotavirus strains. **Figure 1** shows a defective recombinant virus expressing simultaneously Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) and VP6 from murine rotavirus strain EC, in **Figure 2** and movie S1, an amplicon vector overexpressing VP6 from a Wa strain of human rotavirus is shown. In both cases, the VP6 proteins were recognized by a monoclonal antibody and were found extensively expressed forming filaments along the cells, showing a typical intra-cellular pattern, in the absence of other rotavirus protein. These results show that the recombinant proteins maintain the specific capacity of self-assembly of the native protein and, therefore, are potential vaccine candidates to be explored. Recently, results obtained by our group and in collaboration with others, have demonstrated the feasibility of these systems to induce protective immune responses against different viral infections^{1,3}.

Ethical disclosures

Protection of human and animal subjects. The authors declare that the procedures followed were in accordance with the regulations of the relevant clinical research ethics committee and with those of the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

* Corresponding author.

E-mail address: cpalacioscevan@centromilstein.org.ar (C.A. Palacios).

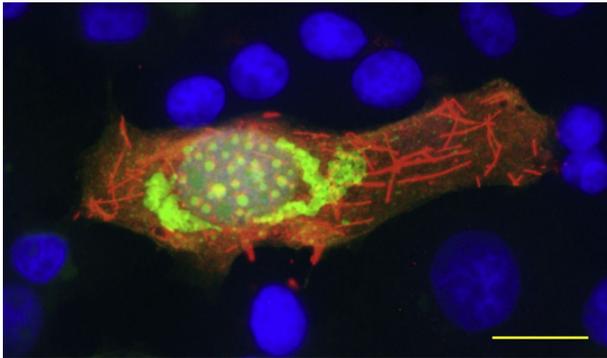


Figure 1 MDBK cells were transduced with T0EC-VP6 recombinant vector. Permeabilized cells were probed with monoclonal antibody (MAb) 2F, directed against the UK strain rotavirus VP6, followed by Alexa-594 anti-mouse antibody (Molecular Probes, USA). Nuclear DNA was stained with 4',6,-Diamidino-2-Phenylindole, Invitrogen (DAPI). Wa-VP6 and EGFP expression were observed under the microscope and the obtained images were merged into the same picture. Bar, 20 μ m.

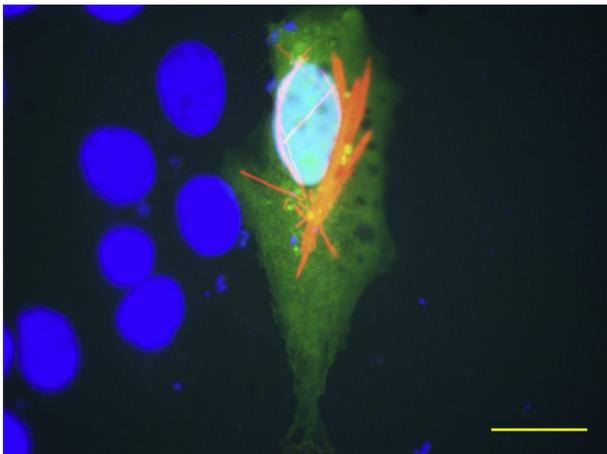


Figure 2 Vero cells were transduced with HSV [Wa-VP6] amplicon vector. Permeabilized cells were probed with MAb 2F, followed by Alexa-594 anti-mouse antibody (Molecular Probes, USA). Nuclear DNA was stained with 4',6,-Diamidino-2-Phenylindole, Invitrogen (DAPI). Wa-VP6 and EGFP expression were observed under the microscope, and the obtained images were merged into the same picture. The bar indicates 20 μ m.

Confidentiality of data. The authors declare that no patient data appear in this article.

Right to privacy and informed consent. The authors declare that no patient data appear in this article.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ram.2014.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ram.2014.10.002).

References

1. D'Antuono A, Laimbacher AS, La Torre J, Tribulatti V, Romanutti C, Zamorano P, Quattrocchi V, Schraner EM, Ackermann M, Fraefel C, Mattion N. HSV-1 amplicon vectors that direct the in situ production of foot-and-mouth disease virus antigens in mammalian cells can be used for genetic immunization. *Vaccine*. 2010;28:7363–72.
2. Fraefel C, Marconi P, Epstein AL. Herpes simplex virus type 1-derived recombinant and amplicon vectors. In: Merten OW, Al-Rubeai M, editors. *Viral vectors for gene therapy: methods and protocols*, 737. New York: Springer; 2011. p. 303–43.
3. Laimbacher AS, Esteban LE, Castello AA, Abdusetir Cerfoglio JC, Argüelles MH, Glikmann G, D'Antuono A, Mattion N, Berois M, Arbiza J, Hilbe M, Schraner EM, Seyffert M, Dresch C, Epstein AL, Ackermann M, Fraefel C. HSV-1 amplicon vectors launch the production of heterologous rotavirus-like particles and induce rotavirus-specific immune responses in mice. *Mol Ther*. 2012;20:1810–20.
4. Laimbacher AS, Fraefel C. HSV-1 amplicon vectors as genetic vaccines. In: Diefenbach RJ, Fraefel C, editors. *Herpes simplex virus: methods and protocols*, 1144. New York: Springer; 2014. p. 99–115.