



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Cátedra de Inmunología Básica

Departamento de Química Orgánica



PROVINCIA DE SANTA FE

Ministerio de la Producción

Dirección de Sanidad Animal

Laboratorio de Diagnóstico e

Investigaciones Agropecuarias

"Estudio de la capacidad antigénica e inmunogénica de péptidos sintéticos correspondientes a epitopes conservados de las proteínas estructurales del Virus de la Anemia Infecciosa Equina"

Autor: Soutullo, Adriana Rosa

Directora: Dra Malan Borel, Ileana

Co-Directora: Dra Tonarelli, Georgina

Año: 2008

“Muchas pequeñas derrotas pueden llevar a una gran victoria”.

Proverbio chino.

A mi familia, por tener que soportar convivir con una esposa y madre “part time”, sin dejar de alentarme, brindándome su amor y comprensión, en todo momento.

A mi padre, con quien me hubiera gustado compartir la realización de esta Tesis, y a mi madre, quienes me enseñaron que la generosidad y la tenacidad solo limitan en el horizonte de nuestros campos.

Agradecimientos

Quien encabeza como autor una tesis solo es la punta del iceberg que asoma, siendo su verdadero sustento esa gran base, sin la cual su vértice no podría emerger. Quisiera agradecer a todas aquellas personas que conformaron esta gran base.

A la Doctora **Ileana Malan Borel**, quien no solo fue mi brújula en el recorrido del campo del conocimiento inmunológico con elevado nivel científico-académico, sino que además agradezco su generosidad de espíritu por haberme permitido realizar esta tesis en un tema tan diverso, cuyos límites se confunden con muchos campos vecinos, tales como el de la salud animal, el de la química orgánica y el de la virología. Además, mas que una directora sentí su compañía codo a codo no solo en los buenos y malos resultados, sino también en los buenos y malos momentos de la vida.

A la Doctora **Georgina Tonarelli**, quien me inculcó el entusiasmo por trabajar con pépticos sintéticos, brindándome sus valiosos conocimientos en el campo de la química orgánica.

A la Magíster **Ana María Canal**, quien me brindó la posibilidad de realizar parte de esta tesis con absoluta libertad en los laboratorios de Sanidad Animal, del Ministerio de la Producción, gestionando parte de los recursos necesarios, al entender la importancia de desarrollar este tema en el ámbito provincial, en cooperación con la Universidad Nacional del Litoral.

A mi amiga y colega del alma, **María Inés García**, quien no solo compartió conmigo todas las experiencias del laboratorio dándome sus manos, sus ideas y su gran capacidad de análisis, sino también lo mas grande que tiene... su corazón, para que yo pudiera realizar esta Tesis.

A mi amiga, **Graciela Capello**, por colaborar, en parte, con las experiencias pero por sobre todo, por compartir y soportar mis “enojos”, mate en mano, los días en que las leyes de Murphy gobernaban dictatorialmente, haciendo peligrar la finalización de esta Tesis.

A mis compañeras, amigas “gauchas”, **Andrea Racca, Alejandra Bailat y Carolina Veaute**, de la Cátedra de Inmunología Básica, por no haber dudado jamás en ayudarme cuando necesité de sus sugerencias, brindándome siempre aliento y acompañándome con sus valiosos consejos.

Al grupo de síntesis de péptidos, del Departamento de Química Orgánica, **Maria Santi, Javier Lottersberger, Juan Carlos Perin y Carolina Rey**, por haber sintetizado y caracterizado los péptidos utilizados en la presente Tesis.

Al “gauchazo” **Hector Cejas**, compañero y especialista en extracción de muestras de sangre equina, con quien compartí viajes, mates y anécdotas en los polvorientos caminos rurales de nuestra costa santafesina.

A los gauchos del actual milenio, Médico Veterinario **Eduardo Lucca y** Licenciada **Victoria Vicario**, quienes me abrieron las tranqueras de sus campos al igual que las de su corazón, permitiendo que sus caballos sean muestreados tantas veces así lo requirieran las experiencias aquí presentadas.

A la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**, de la Universidad Nacional del Litoral, por brindarme las instalaciones donde se realizó parte de la presente Tesis Doctoral.

Al Doctor **Ronald Frank**, del Departamento de Química Biológica del Centro Helmholtz de Investigaciones Infecciosas de Alemania, por haberme brindado parte de las bibliotecas peptídicas empleadas en la presente Tesis.

Al Médico Veterinario **Roberto Pauli y** Bioquímico **Carlos Passeggi**, pioneros que contribuyeron al conocimiento de esta patología en la región, por impulsarme a comenzar a estudiar la respuesta inmune de esta infección, allá por 1985.

A quienes hicieron posible que nuestra Facultad tuviese una biblioteca confortable donde escribí gran parte de mis ensayos, con grandes ventanales como cuadros vivos, mostrando las garzas y los negruchos ubicados en los pantanos, en primer plano, con un fondo típico de nuestra laguna Setúbal. Este pequeño espacio y paisaje me dieron marco real al problema que estudié: la Anemia Infecciosa Equina, o fiebre de los pantanos, tal como se la denomina en otros lugares con idénticos ecosistemas.

*A todos ellos, nuevamente, muchas gracias por conformar esa
“gran base del iceberg”.*

Parte de los resultados que se describen en este trabajo han sido dados a conocer en las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos.

PUBLICACIONES

- Design and validation of an ELISA for Equine Infectious anemia (E.I.A.) diagnosis using synthetic peptides. Soutullo, A.; Verwimp, V.; Riveros, M.; Pauli, R.; Tonarelli, G. *Veterinary Microbiology* 79 (2001) 111-121.
- Antibodies and PBMC from EIAV infected carrier horses recognize gp45 and p26 synthetic peptides. Soutullo, A., Garcia, M.I., Bailat, A., Racca, A., Tonarelli, G., Malan Borel, I. *Immunology and Immunopathology Veterinary* 108 (2005) 335-343.
- Systematic epitope analysis of the p26 EIAV core protein. Soutullo, A.; Santi, M.N.; Perin, J.C.; Beltramini, L.M.; Malan Borel, I.; Frank, R. & Tonarelli, G.G. (2007). *Journal of Molecular Recognition*, 20: 1-11.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- Synthetic Epitopes from equine infectious anemia virus (EIAV) surface and core proteins” Soutullo, A.; Santi, M.; Perin, J.C.; Lottersberger, J; Beltramini, L.; Tonarelli, G. *Peptides: The wave of the future. 2nd International Peptide Symposium, San Diego, California, E.U., Junio, 2001*
- Structural features of Synthetic antigens from Equine Infectious Anemia Virus (EIAV). Tonarelli, G.; Garay S.; Perin, J.C.; Soutullo, A.; Lottersberger, J.; Santi, M.; Burton, G., Beltramini, L.; Rodriguez, D. *International Workshop Spectroscopy for Biology, Sao Paulo, Brasil, Octubre 2001*
- Efecto del péptido sintético análogo al extremo C- terminal de la glicoproteína gp 90 del Virus de la Anemia Infecciosa Equina, sobre el balance de citoquinas tipo 1/tipo 2 .Soutullo, A; Garcia, M.I.; Racca, A.; Tonarelli, G; Lottersberger, J.; Malan Borel, I. *Medicina- Vol 61 N°5/2, Buenos Aires, Argentina, 2001.*
- Immune response of the Equine Infectious Anemia disease viral gp 45 protein to a synthetic peptide in mice. Soutullo, A.; Garcia, M.I.; Racca, A.; Capello, G.; Perin, J.C.; Tonarelli, G.; Malan Borel, I.. *6^a Congreso Latinoamericano de Inmunología, La Habana, Cuba, Diciembre 2002*
- Evaluación de la respuesta inmune viral mediante péptidos sintéticos que imitan regiones conservadas del Virus de la Anemia Infecciosa Equina. Soutullo, A., García, M. I.; Bailat, A.; Capello G.; Racca, A.; Tonarelli, G.; Lucca E., Malan Borel, I. *Medicina, Vol 63. N° 5/2, Buenos Aires, 2003.*

- Epitopes antigénicos cíclicos del virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) y su evauación biológica mediante enzimoimmunoensayos. Lorenzon, E.; Soutullo, A.; Santi, M. N.; Tonarelli, G. XII Jornadas de Jovenes Pesquisadores de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo. Curitiba, Brasil, 2004.
- Presencia de anticuerpos y linfocitos capaces de reconocer peptidos sintéticos de las proteínas gp45 y p26, en equinos portadores asintomáticos del virus de la Anemia Infecciosa Equina. Soutullo, A; Garcia, MI; Bailat, A; Racca, A; Capello, G, Lucca, H; Tonarelli, G; Malan Borel, I. III Encuentro Bioquímico del Litoral y VI Jornadas de comunicaciones técnico-científicas, Santa Fe, Argentina, 2005.
- Expression of Toll-like Receptor-4 (TLR-4) in horses. Its association with IFN γ in equine infectious anemia. Bailat, A.; Veaute, C.; Soutullo, A.; Racca, A.; Garcia, M.I.; Malan Borel, I. VII Latin American Congress of Immunology. Córdoba, Argentina, Octubre, 2005.
- Anemia Infecciosa Equina: participación de la respuesta inmune celular durante la etapa asintomático de la enfermedad. Bailat, A.; Soutullo, A.; Veaute, C.; Garcia, M.I.; Racca A.; Malan Borel, I. Medicina vol. 66 Suplemento II, 2006.
- Avances en la detección del Virus de la Anemia Infecciosa Equina. Soutullo, A.; Garcia, M.I.; Bailat, A.; Veaute C.; Lucca, E.; Perin, J.C.; Lottersberger, J.; Tonarelli, G.; Malan Borel, I. XVI Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Mar del Plata, Argentina, 2006.
- Respuesta inmune frente a un modelo de Lentivirus equino. Bailat, A.; Garcia, L.; Soutullo, A.; Garcia, M.I.; Veaute, C.; Racca, A.; Malan Borel, I. Medicina, Vol 67. Suplemento III, 2007.
- Efecto de péptidos sintéticos virales sobre la expresión de citoquinas durante la etapa asintomático de la infección por el virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE). Bailat, A.; Soutullo, A.; Garcia, M.I.; Garcia, L.; Veaute, C.; Racca, A.; Malan Borel, I. Medicina, Vol 67. Suplemento III, 2007.

Nomenclatura de los aminoácidos:

A	Alanina
G	Glicina
F	Fenilalanina
P	Prolina
M	Metionina
L	Leucina
I	Isoleucina
V	Valina
C	Cisteina
Y	Tirosina
D	Ácido Aspártico
S	Serina
T	Treonina
E	Ácido Glutámico
H	Histidina
N	Asparagina
R	Arginina
Q	Glutamina
K	Lisina
W	Triptofano

Abreviaturas generales:

aa	Aminoácidos
Ac(s)	Anticuerpo/s
ACF	Adyuvante Completo de Freund
ADCC	Citotoxicidad Celular Anticuerpo Dependiente
Ag(s)	Antígeno/s
AGID	Test de Inmunodifusión radial Doble en Gel de Agarosa
AIE	Anemia Infecciosa Equina
APC	Célula/s Presentadora/s Antigénica/s
BCIP	Bromo Cloro Indolil Fosfato
BrdU	Bromo d-Uridina
BSA	Seroalbumina Bovina
CA	Antígeno de Cápside
CBS	Solución Salina Citratada
CD	“Clustter” de Diferenciación
CELISA	Enzimoimmunoensayo Competitivo
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
csp	Cantidad suficiente para
C-terminal	Carboxilo terminal
CpG	Oligodeoxinucleótidos

Abreviaturas

CN	Control Negativo de amplificación
CP	Control Positivo de amplificación
DAB	Diamino Bencidina
DC	Célula dendrítica(s)
DICD	Disopropilcarbodimida
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DNAv	Ácido Desoxiribonucleico viral
dNTP	Deoxinucleótidos trifosfatos
DO	Densidad Óptica
DOB	Densidad Óptica Blanco
DOCPR	Densidad Óptica Control Positivo de Referencia
DOEB	Densidad Óptica Estimulación Basal
DOE	Densidad Óptica Estimuladas
DOSCN	Densidad Óptica Suero Control Negativo
dUTPasa	Deoxi Uridina Trifosfatasa
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EMDM	Macrófagos derivados de Monocitos Equinos
ELA	Antígeno Leucocitario Equino
ELISA	Enzimoimmunoanálisis
ELR	Receptor Linfocitario Equino.
Env	Envoltura.
FEK	Células fetales equinas de riñón
Fmoc	9-fluorenil-metoxycarbonilo
FHA	Fitoheмоaglutinina
FP	Factor de pureza
Fd	Factor de dilución
Gag	Grupo antígeno específico de género
GM-CSF	Factor de estimulación del crecimiento de macrófagos-granulocitos
gp	Glicoproteína
H	Hélice.
HPLC	Cromatografía Líquida de alta Presión
HVR	Región de hipervariabilidad
IFNγ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IP	Índice de proliferación
IR	Índice de reactividad
ISCOMS	Complejo inmunoestimulante.
kDa	Kilodalton

Abreviaturas

KLH	“Keyhole lympet hemocyanin”
LB	Linfocito B
LMP	“Low Melting Point”
LT	Linfocito T
LTc	Linfocito T citotóxico
LTh	Linfocito T colaborador
LTm	Linfocito T de memoria
LTR	“Long terminal repeat”
M_{100 pb}	Marcador de 100 a 1000 pares de bases
M_{25 pb}	Marcador de 25- 450 pares de bases
MA	Antígeno de Matriz
MAP	Múltiples Antígenos Peptídicos
MHR	Región de Homología Mayor
MM	“Master mix”
MTT	Bromuro de dimetiliazol difeniltetrazolium
NBT	“Nitroblue tetrazolium”
NK	“Natural Killer”
NTD	Dominio Aminoterminal
NTE	Tampon Tris EDTA
N- terminal	Amino terminal
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
ORF	“Small Open Reading Frames”
p	Proteína
pa	Proanálisis
PAGE	Gel de electroforesis en poliacrilamida
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución fisiológica tamponada
PBS-T	PBS suplementado con Tween 20
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PID	Dominio Inmunodominante Principal
PF	Péptido de Fusión
PND	Dominio Principal de Neutralización
Pol	Polimerasa
Pr 55 gag	Poliproteína precursora gag
PP	Porcentaje de Positividad
Pu.1	Factor específico de macrófago
Rev	Proteína trans activadora post transcripción
Rf	Factor Relativo
RNA	Ácido Ribonucleico

Abreviaturas

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	Revoluciones por minuto
RTasa	Retrotranscriptasa Reversa
RTNFα	Receptor del TNF α
RT-PCR	Retrotranscriptasa Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa
SCID	Síndrome de Inmunodeficiencia Severa Combinada
SDS	Duodecil Sulfato de Sodio
SEM	Error Estándar de la Media
SFB	Suero Fetal Bovino
SU	Unidad de Superficie
TAE	Solución salina tamponada Tris Acetato EDTA
Taq	Termus acuaticus
Tat	Transactivadora de la Transcripción
TBS	Solución Salina Tamponada
TBS-T	TBS suplementado con Tween 20
TCID_{50%}	Dosis Infecciosa en Cultivo Tisular
TCR	Receptor Linfocito T
TEMED	Tetramethylethylenediamina
TLR	Receptor tipo Toll
TM	Transmembrana
TMB	Tetrametilbencidina
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral alfa
Tnp	Células T no polarizadas
UI	Unidad Internacional
UV	Ultravioleta
Vif	Factor Viral de infectividad
VG	Valor de Gris
VAEC	Virus de la Artritis-Encefalitis Caprina
VAIE	Virus de la Anemia Infecciosa Equina
VIB	Virus de la Inmunodeficiencia Bovina
VIF	Virus de la Inmunodeficiencia Felina
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VIS_{AGM}	Virus de la Inmunodeficiencia Simia, Mono Verde Africano
VIS_{CPZ}	Virus de la Inmunodeficiencia Simia, Chimpancé
VIS_{SMM}	Virus de la Inmunodeficiencia Simia, Mono Sooty Mangabey
VIS_{MND}	Virus de la Inmunodeficiencia Simia, del Mandril
VIS_{SYK}	Virus de la Inmunodeficiencia Simia, del Mono Sykes
VLB	Virus de la Leucosis Bovina
VVM	Virus Visna Maedi

A. Introducción

A.1 Anemia Infecciosa Equina. Generalidades	1
A.2 Patogenia	1
A.3 Virus de la Anemia Infecciosa Equina	4
A.3.1 Estructura	5
A.3.2 Replicación viral	8
A.3.3 Proteínas virales estructurales	10
A.3.3 a) Glicoproteínas de envoltura	10
A.3.3 b) Proteína de la cápside, p26	19
A.4 Respuesta inmune durante la infección	26
A.5 Control de la patología	35

B. Objetivos

B.1 Objetivo general	42
B.2 Objetivos parciales	42

C. Materiales y Métodos

C.1 Soluciones	43
C.1.1 Soluciones salinas	43
C.1.2 Reactivos para reacciones enzimáticas	44
C.1.3 Solución fenólica saturada	44
C.1.4 Medios de cultivos y aditivos	44
C.2 Péptidos sintéticos	45
C.2.1 Descripción de los péptidos sintéticos	45
C.2.2 Bibliotecas peptídicas de las proteínas gp90 y p26, sobre membranas de celulosa (método Spot)	46
C.2.2.a) Bibliotecas peptídicas de la proteína de superficie (gp90)	47
C.2.2.b) Bibliotecas peptídicas de la proteína de la cápside (p26)	47

C.3 Animales	48
C.3.1 Equinos	48
C.3.2 Ratones BALB/c	49
C.4 Planes de inmunización en ratones BALB/c	49
C.4.1 Preparación del inmunógeno	49
C.4.2 Protocolo de inmunización	50
C.5 Test de Coggins	50
C.5.1 Antígeno de Coggins	50
C.5.1 a) Obtención y purificación	50
C.5.1 b) Fraccionamiento, transferencia y evaluación de las proteínas obtenidas	51
C.5.2 Obtención de gammaglobulina total equina	53
C.5.3 Test de Coggins	53
C.6 Enzimoinmunoensayos (ELISA)	54
C.6.1 Indirecto no competitivo cualitativo	54
C.6.2 Indirecto no competitivo semicuantitativo	55
C.6.3 Indirecto no competitivo cuantitativo de captura	56
C.6.4 Indirecto en membranas de celulosa, método spot	57
C.7 Reacción en cadena de la polimerasa	58
C.7.1 Extracción de DNA	58
C.7.2 Detección de DNA viral que codifica la secuencia del péptido sintético gp45 ₍₅₂₂₋₅₄₆₎	59
C.7.3 Electroforesis en geles de agarosa	61
C.8 Ensayos de linfoproliferación	61
C.8.1 Obtención de células mononucleares de ratones BALB/c	61
C.8.2 Obtención de células mononucleares de equinos	62
C.8.3 Conservación celular a -180°C	62
C.8.4 Cultivos celulares	62
C.8.5 Evaluación de la linfoproliferación	63

C.9 Inmunohistoquímica	64
C.10 Análisis estadístico	65
<i>D. Resultados</i>	
D.1 Evaluación de la inmunidad específica, humoral y celular, en animales naturalmente infectados con el VAIE	66
D.1.1 Detección de animales infectados con el VAIE	66
D.1.1.1 Detección de anticuerpos anti-virales	66
D.1.1.1.a Inmunodifusión radial doble (Test de Coggins)	66
D.1.1.1.b ELISA indirecto no competitivo cualitativo	72
D.1.1.2 Detección de DNA _v en leucocitos equinos por PCR-gp45 ₍₅₂₂₋₅₄₅₎	73
D.1.2 Evaluación de la inmunidad humoral frente a los péptidos sintéticos de las proteínas gp90, gp45 y p26	77
D.1.2.1 Mediante la utilización de las bibliotecas peptídicas sintetizadas por el sistema spot	77
D.1.2.2 Mediante la utilización de los péptidos sintéticos gp90 ₍₄₁₆₋₄₄₄₎ , gp45 ₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26 ₍₃₁₈₋₃₄₆₎	93
D.1.3 Evaluación de la inmunidad celular. Reconocimiento de linfocitos T, provenientes de equinos persistentemente infectados, por los péptidos sintéticos gp90 ₍₄₁₆₋₄₄₄₎ , gp45 ₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26 ₍₃₁₈₋₃₄₆₎	94
D.2 Evaluación de la respuesta inmune en ratones BALB/c inmunizados con péptidos sintéticos	97
D.2.1 Ratones inmunizados con gp90 ₍₄₁₆₋₄₄₄₎	97
D.2.1.1 Evaluación de la inmunidad humoral	97
D.2.1.1a Determinación de los niveles séricos de anticuerpos anti-gp90 ₍₄₁₆₋₄₄₄₎	97
D.2.1.1b Reconocimiento de los anticuerpos anti-péptido por el epítopo nativo de la proteína viral gp90	98

D.2.1.2 Evaluación de la inmunidad celular	100
D.2.1.2a Determinación de los niveles séricos de IFN γ	100
D.2.1.2b Determinación de los niveles séricos de IL-4	101
D.2.2 Ratones inmunizados con gp 45 ₍₅₂₂₋₅₄₆₎	103
D.2.2.1 Evaluación de la inmunidad humoral	103
D.2.2.1a Determinación de los niveles séricos de anticuerpos anti-gp 45 ₍₅₂₂₋₅₄₆₎	103
D.2.2.1b Reconocimiento de los anticuerpos anti-péptido por el epítopo nativo de la proteína viral gp 45 ₍₅₂₂₋₅₄₆₎	104
D.2.2.2 Evaluación de la inmunidad celular. Determinación de linfoproliferación específica e inespecífica	106
D.2.3 Ratones inmunizados con p26 ₍₃₁₈₋₃₄₆₎	107
D.2.3.1 Evaluación de la inmunidad humoral	107
D.2.3.1a Determinación de los niveles séricos de anticuerpos anti-p26 ₍₃₁₈₋₃₄₆₎	107
D.2.3.1b Reconocimiento de los anticuerpos anti-péptido por el epítopo nativo de la proteína viral p26	108
D.2.3.2 Evaluación de la inmunidad celular	109
D.2.3.2a Determinación de los niveles séricos de IFN γ	109
D.2.3.2b Determinación de los niveles séricos de IL-4	111
D.2.3.2c Determinación de la linfoproliferación específica e inespecífica	113
<i>E. Discusión y conclusiones</i>	114
E.1 Antigenicidad de los péptidos sintéticos presentes en las proteínas gp90, gp45 y p26	114
E.2 Inmunogenicidad de los péptidos sintéticos gp90 ₍₄₁₆₋₄₄₄₎ , gp45 ₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26 ₍₃₁₈₋₃₄₆₎	123
E.3 Diagnóstico de la infección	129

<i>F. Resumen</i>	132
<i>G. Summary</i>	135
<i>H. Bibliografía</i>	138

Índice de figuras, fotografías y tablas

Figuras:

Figura 1.	Estructura del VAIE.	6
Figura 2.	Ubicación de los epitopes y regiones de mayor reconocimiento, presentes en la glicoproteína gp90 del VAIE.	15
Figura 3.	Ubicación de los epitopes y regiones de mayor reconocimiento, presentes en la glicoproteína gp45 del VAIE.	18
Figura 4.	Ubicación de los epitopes y regiones de mayor reconocimiento, presentes en la proteína p26 del VAIE.	25
Figura 5.	Curva estándar de BSA.	67
Figura 6.	Cálculo de los pesos moleculares relativos.	69
Figura 7.	Cálculo del peso molecular relativo de la fracción p26.	70
Figura 8.	Cálculo de los pares de bases de los <i>productos</i> de amplificación.	75
Figura 9.	Índices de reactividad (IR) correspondientes a la biblioteca peptídica de la proteína gp90.	79
Figura 10.	Biblioteca peptídica de la proteína gp90 del VAIE.	80
Figura 11.	Índices de reactividad (IR) correspondientes a la biblioteca peptídica de la región C-terminal (417-444) de la proteína gp90.	83
Figura 12.	Biblioteca peptídica del extremo C-terminal (417-444) de la proteína gp90 del VAIE. Identificación de epitopes mínimos	84
Figura 13.	Índices de reactividad (IR) correspondientes a la biblioteca peptídica de la proteína p26	88
Figura 14.	Biblioteca peptídica de la proteína p26 del VAIE.	89
Figura 15.	Índices de reactividad (IR) correspondientes a la biblioteca peptídica de la región C-terminal (277-359) de la proteína p26.	90
Figura 16.	Biblioteca peptídica del dominio C-terminal (277-359) de la proteína p26 del VAIE.	91
Figura 17.	Reactividad de anticuerpos anti-VAIE frente a los péptidos p26 ₍₃₁₈₋₃₄₆₎ , gp 45 ₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y gp90 ₍₄₁₆₋₄₄₄₎	93
Figura 18.	Índices de proliferación (IP), evaluados mediante ensayos de proliferación de células mononucleares equinas de sangre periférica, extraídas de 19 caballos con serología positiva (A) y de 16 con serología negativa (B).	95
Figura 19.	Niveles séricos de anticuerpos anti-gp90 ₍₄₁₆₋₄₄₄₎ , evaluados por ELISA, en ratones BALB/c (n=15) inoculados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 µg (grupo 3) de gp 90 ₍₄₁₆₋₄₄₄₎ .	98
Figura 20.	Curva estándar de IFN γ .	100
Figura 21.	Niveles séricos de IFN γ , evaluados por ELISA de captura, en ratones BALB/c (n=15) inoculados con 0 (Grupo 1), 20 (Grupo 2) y 100 µg (Grupo 3) de gp90 ₍₄₁₆₋₄₄₄₎ .	101
Figura 22.	Curva estándar de IL-4.	102

Figura 23. Niveles séricos de IL-4, evaluados por ELISA de captura, en ratones BALB/c (n=15) inoculados con 0 (Grupo 1), 20 (Grupo 2) y 100 µg (Grupo 3) de gp 90 ₍₄₁₆₋₄₄₄₎ .	103
Figura 24. Niveles séricos de anticuerpos anti-gp45 ₍₅₂₂₋₅₄₆₎ , evaluados por ELISA, en ratones BALB/c (n=15) inoculados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 µg (grupo 3) de gp45 ₍₅₂₂₋₅₄₆₎ .	104
Figura 25. Índice de proliferación, evaluados mediante incorporación de BrdU en células mononucleares esplénicas de ratón, inmunizados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) o 100 (grupo 3) µg de gp45 ₍₅₂₂₋₅₄₆₎ .	106
Figura 26. Niveles séricos de anticuerpos anti-p26, evaluados por ELISA, en ratones BALB/c (n=15) inoculados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 µg (grupo 3) de p26 ₍₃₁₈₋₃₄₆₎ .	107
Figura 27. Curva estándar de IFN γ .	110
Figura 28. Niveles séricos de IFN γ , evaluados por ELISA de captura, en ratones BALB/c (n=15) inoculados con 0 (Grupo 1), 20 (Grupo 2) y 100 µg (Grupo 3) de p26 ₍₃₁₈₋₃₄₆₎ .	111
Figura 29. Curva estándar de IL-4.	112
Figura 30. Niveles séricos de IL-4, evaluados por ELISA de captura, en ratones BALB/c (n=15) inoculados con 0 (Grupo 1), 20 (Grupo 2) y 100 µg (Grupo 3) de p26 ₍₃₁₈₋₃₄₆₎ .	112
Figura 31. Índices de proliferación, evaluados mediante incorporación de BrdU en de células mononucleares esplénicas de ratón, inmunizados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) o 100 (grupo 3) µg de p26 ₍₃₁₈₋₃₄₆₎ .	113

Fotografías:

Fotografía 1. Fraccionamiento de las proteínas presentes en el antígeno de Coggins mediante SDS-PAGE en geles de acrilamida-Bisacrilamida al 12%.	68
Fotografía 2. "Western Blot" de la fracción p26, reconocida por un anticuerpo murino anti-p26 ₍₃₁₈₋₃₄₆₎ .	70
Fotografía 3. Amplificación de DNA viral por doble PCR.	74
Fotografía 4. Biblioteca peptídica correspondiente a la secuencia completa de la proteína gp 90 del VAIE.	78
Fotografía 5. Biblioteca peptídica correspondiente al extremo C-terminal ₍₄₁₇₋₄₄₄₎ de la proteína gp90 del VAIE.	82
Fotografía 6. Biblioteca peptídica correspondiente a la secuencia completa de la proteína p26 del VAIE.	87
Fotografía 7. Biblioteca peptídica correspondiente al extremo C-terminal ₍₂₇₇₋₃₅₉₎ de la proteína p26 del VAIE.	90

Fotografía 8. Células mononucleares esplénicas provenientes de animales infectados con el VAIE incubadas con a) suero murino del grupo 3 inoculado con gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ (día 90), o con b) suero murino del grupo 1 (día 90) y luego con un conjugado anti murino biotinilado 99

Fotografía 9. Células mononucleares esplénicas provenientes de animales infectados con el VAIE incubadas con a) suero murino del grupo 3 inoculado con gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ (día 90), o con b) suero murino del grupo 1 (día 90) y luego con un conjugado anti murino biotinilado. 105

Fotografía 10. Células mononucleares esplénicas provenientes de animales infectados con el VAIE incubadas con a) suero murino del grupo 3 inoculado con p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ (día 90), o con b) suero murino del grupo 1 (día 90) y luego con un conjugado anti murino biotinilado. 109

Tablas:

Tabla 1. Resultados del Test de Coggins, por establecimiento. 72

Tabla 2. Resultados del ELISA, por establecimiento. 73

Tabla 3. Resultados de la doble PCR, por establecimiento. 76

A. Introducción

A.1. Anemia Infecciosa Equina. Generalidades.

La Anemia Infecciosa Equina (AIE) es una enfermedad infectocontagiosa, causada por un virus RNA que solo afecta a los equinos, provocándoles una infección persistente de por vida (Issel y Coggins, 1979; Montelaro y col., 1984^a).

Esta patología fue descrita por primera vez en Francia por Ligné en 1843 y en nuestro país por Monteverde, Moran y Garbers en 1964 (Mascaro, 1975). Recién en 1904, Carré y Vallé atribuyen su origen a un “agente filtrable”, tal como eran denominados los virus a principios de siglo XX. Este hallazgo contribuyó a dilucidar la causa de la AIE, siendo ésta la primera patología en ser descubierta por causa viral. Años más tarde fue el primer retrovirus identificado dentro de la subfamilia de los lentivirus (Mascaro, 1975; Clements y Zink, 1996; Leroux y col., 2004).

El VAIE se transmite principalmente por la picadura de tábanos y moscas hematófagas infectadas (familias *Tabanidae* y *Stomoxidae*), de allí que haya una mayor incidencia en períodos húmedos del año y/o en regiones tropicales y subtropicales, condiciones que favorecen la proliferación de estos insectos vectores, donde el virus es capaz de permanecer hasta cuatro horas. Otras formas de difusión son por el empleo de agujas y material quirúrgico contaminado, por contacto sexual y/o transmisión feto-materna (Stein y col., 1942; Issel y Foil, 1984; Grund y col., 1994, Hammond y col., 1997).

A.2. Patogenia.

La Anemia Infecciosa Equina o fiebre de los pantanos es una infección que sólo afecta a la familia *Equidae*, y dentro de la misma los *Equus asinus* (asnos) son menos susceptibles a contraer la enfermedad que los *Equus caballus* (ponies y caballos) y *Equus asinus x caballus* (mulas) (Cook y col., 2001).

Una de las principales características que distinguen al VAIE de los otros lentivirus es la naturaleza de la enfermedad clínica. Mientras que muchas de las infecciones por lentivirus tienen un curso lento, crónico y progresivo, la infección por VAIE, en sus fases iniciales, resulta rápida, variable y dinámica con episodios agudos, causados por una replicación viral agresiva, acompañada de picos febriles intensos. A esta fase inicial le sigue una fase crónica donde aparecen episodios febriles recurrentes entre períodos quiescentes, sin signos clínicos detectables. Luego se alcanza un estado asintomático donde los animales, si

bien logran controlar la replicación viral, se comportan como portadores virales durante el resto de sus vidas manteniendo su capacidad infectiva (Issel y col., 1985; Hammond y col., 1997; Leroux y col., 2004).

Si bien estas tres fases son las generalmente descritas, el curso de la enfermedad difiere no sólo de la cepa infectante, sino de cada animal, aún infectados en iguales condiciones y con las mismas cepas (Cook y col., 2001; Leroux y col., 2001). Es así que, mientras muchos animales cursan la enfermedad con los tres ciclos bien diferenciados (animales de evolución progresiva) otros, al infectarse, solo presentan un ciclo agudo y luego son portadores asintomático de por vida, sin atravesar previamente por la fase crónica (animales con infección no progresiva). Solo unos pocos animales no logran sobrevivir y mueren durante el primer ciclo virémico (Hammond y col., 2000; Cook y col., 2003; Leroux y col., 2001). La diferencia clínica entre los animales que cursan con evolución progresiva de la no progresiva tiene su correlato con la viremia. Los primeros presentan elevados niveles de RNA viral plasmático, en cambio los segundos presentan niveles muy bajos de carga viral, pudiendo aún no ser detectables (Hammond y col., 2000; Leroux y col., 2001; Mealey y col., 2003; Leroux y col., 2004).

Durante la fase inicial aguda, los equinos infectados presentan un pico febril (hasta 41°C) que dura de 3 a 5 días, coincidente con trombocitopenia y anemia debida a la lisis de glóbulos rojos asociada, en un principio, a la formación de complejos inmunes, aunque se ha observado que animales SCID (Síndrome de Inmunodeficiencia Severa Combinada) infectados también cursan el pico febril con anemia y trombocitopenia (Mc Guire, 1986; Russell y col., 1999; Mealey y col., 2001; Leroux y col., 2004). En esta etapa el animal presenta anorexia, letargia, debilitamiento rápido y progresivo, con sed, sudoración, epítasis, astenia y marcha insegura con debilidad de miembros posteriores. Se observan petequias en la conjuntiva ocular, mucosa lingual y vulvar, hemorragias pericorneales y lagrimeo con secreción ocular espesa lo que otorga un aspecto aceitoso en la superficie de la cornea (Mascaro, 1975).

Luego de resolverse el primer episodio virémico febril, la mayoría de los animales progresan a una fase crónica, caracterizada por ciclos recurrentes e

irregulares de ascensos y descensos bruscos de temperatura y viremia, asociados a una variante viral antigénicamente diferente de la aislada en el pico anterior. Entre estos picos febriles se ha podido detectar, en plasma, RNAv (Clements y Zink, 1996; Hammond y col., 1997; McGuire y col., 1997; Hammond y col., 2000).

En aquellos animales con evolución progresiva, los signos clásicos de esta enfermedad, pérdida de peso, anemia y edema, se presentan en la fase crónica durante el primer año de la enfermedad (Montelaro y col., 1984^a). Los episodios agudos, presentes en fase crónica, se suceden cuando hay causas asociadas a estrés, a otras enfermedades, a ciertas drogas como esteroides o bien por mutación del virus a cepas más virulentas. Como síntomas complementarios se suele observar un cuadro hepatorenal, diarrea sanguinolenta y retención urinaria, a veces seguida de poliuria. Estos episodios agudos se tornan menos frecuentes y severos y son típicamente resueltos dentro de los 8 a 12 meses post infección, momento en que los animales son considerados “portadores virales asintomáticos” (Mascaro, 1975; Langemeier y col., 1996; Hammond y col., 1997; McGuire y col., 1997; Hammond y col., 2000; Harrold y col., 2000; Cook y col., 2001).

Tanto en los animales de evolución progresiva como en los de evolución no progresiva, el estado de portador asintomático perdurará el resto de sus vidas. En esta etapa los niveles de carga viral son muy bajos o aún nulos, lo que indicaría que existe un control efectivo de la replicación viral y por ende de la enfermedad. Evidencias de la permanencia de su poder infectivo, es que es posible infectar animales sanos inoculándolos con sangre extraída de equinos “portadores virales asintomáticos”. Por otra parte, aquellos animales infectados asintomáticos que son expuestos a situaciones de estrés o a la administración de inmunosupresores, presentan episodios febriles similares a los sucedidos en la fase crónica de la enfermedad (Hammond y col., 2000). Esto sugiere que la respuesta inmune intacta sería la responsable de mantener una baja la replicación viral (Hammond y col., 1997; McGuire y col., 1997).

A.3. Virus de la Anemia Infecciosa Equina.

El Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) pertenece a la familia Retroviridae, por cuanto posee la habilidad de transcribir DNA a partir de RNA viral, mediante la enzima transcriptasa reversa (polimerasa DNA dependiente de RNA). Está incluido en el género lentivirus (It. *lento*: lento), por ser una infección de evolución lenta con largos períodos asintomáticos. Comparten este género aquellos virus que no solo son específicos de especie, sino que además tienen estrecha similitud morfológica entre sus viriones y son capaces, en cada replicación viral, de generar especies virales mutantes (cuasiespecies) altamente divergentes en sus características fenotípicas y genotípicas. Por otra parte, los lentivirus infectan monocitos y/o linfocitos, los que al madurar o activarse en tejidos, activan su replicación en los órganos afectados (Montelaro y col., 1984^a; Montelaro y col., 1988; Grund y col. 1994; Leroux y col, 1997; Campbell y Robinson, 1998; Spyrous y col., 2003; Murphy y col., 1999^b).

Según el árbol filogenético construido al comparar las secuencias de los genes que codifican a la polimerasa (*pol*) de los lentivirus, se han establecido 5 grupos. El VAIE comparte el 5º grupo junto al virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), con el que presenta una relación genética mayor (Murphy y col., 1999^a).

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
VIH-2	VIS _{SYK}	VIH-1	VIS _{AGM}	VIS _{MND}
VIS _{SMM}		VIS _{CPZ}		VVM
				VAEC
				VAIE
				VIB
				VIF

Donde,

VIH-1: Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1.

VIH-2: Virus de la Inmunodeficiencia Humana 2.

VIS_{SMM}: Virus de la Inmunodeficiencia Simia, del mono sooty mangabey.

VIS_{SYK}: Virus de la Inmunodeficiencia Simia, del mono sykes (sykes monkey).

VIS_{CPZ}: Virus de la Inmunodeficiencia Simia, del chimpancé.

VIS_{AGM}: Virus de la Inmunodeficiencia Simia, del mono verde africano (African green monkey)

VIS_{MND}: Virus de la Inmunodeficiencia Simia, del mandril.

VVM: Virus Visna Maedi.

VAEC: Virus de la Artritis-Encefalitis Caprina.

VAIE: Virus de la Anemia Infecciosa Equina.

VIB: Virus de la Inmunodeficiencia Bovina.

VIF: Virus de la Inmunodeficiencia Felina.

Los VVM, VAEC y VAIE replican preferencialmente en monocitos/macrófagos, en tanto que los VIB y VIF del grupo V y los incluidos en los restantes grupos replican preferencialmente en lineajes linfocitos y/o mielocitos (Clements y Zink, 1996; Miller y col., 2000).

Los rasgos particulares del VAIE, que lo distinguen del resto del género, son principalmente:

- 1- Infecta solamente a la familia de mamíferos Equidae (Clements y Zink, 1996).
- 2- Es transmitido principalmente por vectores tales como insectos hematófagos, principalmente tábanos (Clements y Zink, 1996).
- 3- Induce Anemia por formación de inmunocomplejos, fijadores de complemento (Clements y Zink, 1996).
- 4- Presenta periodicidad clínica atípica para el grupo de lentivirus al cual pertenece (Clements y Zink, 1996).

A.3.1 Estructura.

Visto al microscopio electrónico el VAIE es de forma oval (Figura 1) con un diámetro de 100 nm, presentando 72 espículas (6-8 nm) en su superficie (Montelaro y col., 1984^a; Clements y Zink, 1996; Murphy y col., 1999^d). Cada espícula, denominada peplómero (*peplom*= envoltura), está compuesta por dos glicoproteínas oligoméricas, gp90, denominada SU (unidad superficial) y gp45, denominada TM (transmembrana), insertas en una bicapa lipídica derivada de las membranas de las células infectadas. Ambas proteínas son responsables de la adherencia viral a la membrana citoplasmática de la célula huésped (Cheevers y col., 1978; Clements y Zink, 1996; Flint y col., 2000; Spyrou y col., 2005).

En la superficie interna de la membrana viral subyacente, y en íntimo contacto con la bicapa lipídica, se encuentra una fosfoproteína periférica de la nucleocápside, denominada p15 o antígeno de matriz (MA), que participa en los estadios iniciales del ciclo de replicación (Provitera y col., 2000; Hatanaka y col., 2002). Esta proteína envuelve a un núcleo oblongo, constituido por el genoma viral encapsulado por la proteína estructural de la cápside, p26 o antígeno de la cápside (CA) (Grund y col., 1994; Birkett y col., 1997; Leroux y col., 2004; Chen y col., 2007). En su interior se encuentran las proteínas estructurales internas

(nucleoproteínas), tales como la proteína básica p11, que se une al ácido nucleico, y la proteína ácida p9, única en los lentivirus, además de la proteína enzimática retrotranscriptasa reversa (RTasa) (Montelaro y col., 1984^a; Clements y Zink, 1996; Murphy y col., 1999^a).

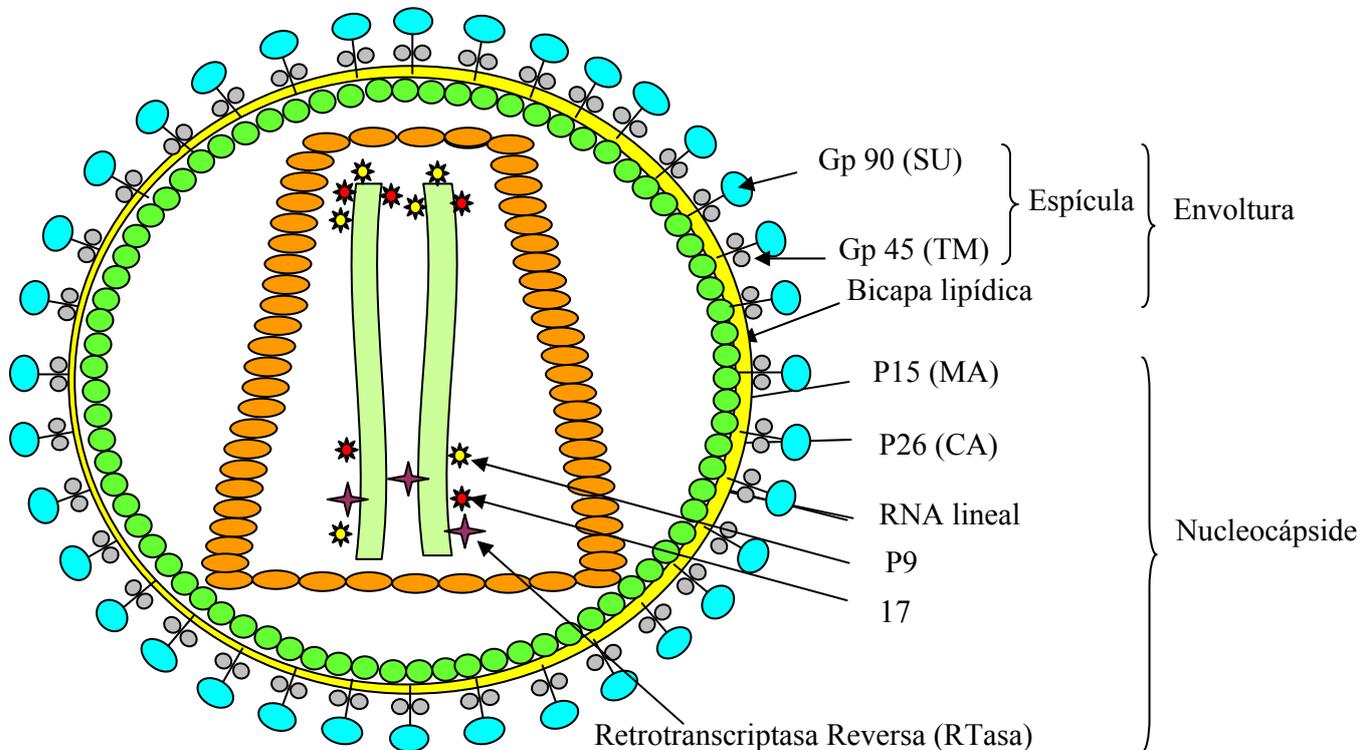


Figura 1. Estructura del VAIE.

El genoma viral está constituido por dos moléculas de RNA lineales asociadas a la enzima transcriptasa reversa. Esta enzima presenta cuatro actividades diferentes: DNA polimerasa dependiente de RNA, DNA polimerasa dependiente de DNA, integrasa y RNAasa (Montelaro y col., 1984^a; Clements y Zink, 1996; Murphy y col., 1999^b). Cada molécula de RNA consta de tres genes principales, en sentido 5'-3': *Gag* (grupo antígeno específico de género) – *Pol* (polimerasa) – *Env* (envoltura) (Montelaro y col., 1984^a; Spyrou y col., 2003).

La secuencia *Gag* codifica a las proteínas estructurales internas del virión, correspondientes a la matriz y cápside, en el siguiente orden: NH₂-p15-p26-p9-p11-COOH. En general, estas secuencias génicas no sufren mutaciones o alteraciones génicas en la replicación (Montelaro y col., 1984^a; Montelaro y col., 1988; Grund y col., 1994; Clements y col., 1996; Leroux y col., 1997; Campbell y Robinson, 1998; Leroux y col., 2001; Spyrou y col., 2003).

La secuencia *Pol* codifica a las enzimas proteasas, transcriptasas reversas e integrasas. Entre los genes que sintetizan a las enzimas RNAsa e integrasa, se localizan los genes que codifican a una proteína enzimática con actividad dUTPasa, la que participa en la replicación del virus en macrófagos, células que por no dividirse, tienen niveles muy bajos de dUTPasa (McGuire y col., 1994^a; Clements y Zink, 1996).

Por último, la secuencia *Env* está constituida por 2577 nucleótidos, de los cuales 1332 codifican a la glicoproteína superficial gp90 de 444 aa (1-444) y los 1245 nucleótidos restantes codifican a la glicoproteína gp45 de 415 aa (445- 859) (Leroux y col., 1997).

Entre los genes *Pol* y *Env* se encuentran tres genes accesorios, denominados *ORFs* (small open reading frames), denominados *ORFS1*, *ORFS2* y *ORFS3*. *ORFS1* codifica a la proteína de transcripción transactivadora (Tat) de la retrotranscriptasa, que asociada a factores celulares del huésped, aumenta la actividad enzimática 1000 veces; *ORFS2* codifica al factor viral de infectividad (Vif), que facilita la infectividad y diseminación del virión y *ORFS3* codifica a la proteína trans activadora post transcripción (Rev). Esta última es la responsable del pasaje de RNA viral desde el núcleo al citoplasma y de controlar, junto con la proteína Tat, la expresión génica del virus. Se requiere de la proteína Rev para que las proteínas virales sean expresadas y haya producción viral (Sherman y col., 1988; Sellon y col., 1992^a; Martarano y col., 1994; Maury y col., 1994^b; Clements y Zink, 1996; Li y col., 1998; Leroux y col., 2004; Murphy y col., 1999^d, Fagerness y col., 2006).

En los extremos 5' y 3' del RNA viral existen largas secuencias repetidas de 600 nucleótidos, denominadas *LTR* (Long Terminal Repeat), que funcionan como sitios transcripcionales de iniciación y en ellas hay una región de hipervariabilidad, denominada *U3* (Leroux y col., 2004).

Numerosos trabajos demuestran que los factores de virulencia estarían relacionados con los genes *Env*, *Gag*, *LTR* y *ORFS3*, por cuanto éstos difieren según sea la patogenicidad y la capacidad de replicación de las distintas cepas del virus de AIE (Kono y Kobayashi, 1979; Maury y col., 1994^b; Payne y col., 1998; Cook y col., 1998; Li y col., 2000; Leroux y col., 2004; Ball y col., 2005). En efecto, las cepas Wyoming americana, la V26 japonesa o la LN40 China, son altamente virulentas y replican en cultivos primarios de macrófagos equinos, en tanto que estas mismas cepas atenuadas difieren en mutaciones puntuales en los genes que codifican a los

factores de virulencia, ocasionando cambios en las proteínas que sintetizan (Kono y Kobayashi, 1970; Kemeny y col., 1971; Leroux y col., 2004). Estas cepas no son patógenas y son capaces de replicarse en células fibroblásticas o en células de especies diferentes a la equina (Payne y col., 1994; Whetter y col., 1990, Shen y col., 2006).

A.3.2 Replicación viral.

Se ha demostrado en numerosas infecciones experimentales, que el virus infecta y replica principalmente en macrófagos tisulares, por lo que estará presente en todos los órganos durante la fase aguda, donde la replicación es activa. Cuando ésta se encuentra restringida, durante las fases subclínicas, el virus continúa replicándose en menor medida preferentemente en macrófagos de bazo, hígado, pulmones, nódulos linfáticos y riñón. *In vivo* se ha detectado que el virus también es capaz de infectar células endoteliales y renales mesangiales e *in vitro*, además de replicarse en cultivos primarios de monocitos sanguíneos, puede hacerlo en células dendríticas y fibroblastos dérmicos equinos (Sellon y col., 1992^b; Maury, 1994^a; Campbell y Robinson., 1998; Oaks y col., 1998; Leroux y col., 2004; Rivera y McGuire, 2005).

El VAIE ingresa a la célula huésped por un mecanismo de fusión donde las glicoproteínas de superficie interactúan con el receptor celular. Si bien éste aun no ha sido perfectamente definido, estudios realizados por Zhang y colaboradores, describieron a un receptor ELR1 (Equine Lentivirus Receptor 1) presente, en niveles elevados, en células susceptibles a la infección viral (Zhang y col., 2005). Este receptor integra la familia de los receptores de TNF α (RTNF α), junto a los receptores de herpesvirus humano tipo 1 y a los receptores de los retrovirus de la leucosis aviar y de la inmunodeficiencia felina (CD 134). El receptor ELR esta presente en las células mieloideas, tales como monocitos de sangre periférica y macrófagos tisulares del hígado, bazo, nódulos linfáticos y médula ósea, donde el VAIE tiene un tropismo selectivo. Se ha observado que, en monocitos circulantes, los niveles de expresión del ELR1 se hallan duplicados respecto a los hallados en células dérmicas, en tanto que se triplican en macrófagos titulares y cuadruplican en células fetales equinas (FEK) del riñón, línea celular de preferencia para la replicación viral *in vitro* (Jin y col., 2005).

Uno de los mecanismos de fusión propuesto sostiene que cuando la proteína gp 90 se une al ELR1, habría cambios conformacionales en la proteína gp 45, que permite la fusión del virus con la membrana citoplasmática de la célula a infectar (Montelaro y col., 1984^a, Clements y Zink, 1996; Flint y col., 2000).

Cuando el virus entra a la célula, es parcialmente descubierto liberando el genoma en el citoplasma de la célula huésped. El RNA viral es copiado, a través de la transcriptasa reversa, en una doble hebra de DNA. En la etapa inicial existen factores celulares que juegan un rol esencial en la replicación (Carvalho y col., 1993; Lichtenstein y col., 1995; Clements y Zink, 1996). Ese DNAv se dirige al núcleo integrándose al DNA celular como DNA proviral a través de los LTR, mediante la acción de las integrasas (Clements y Zink, 1996).

Un vez que el DNAv se integra en el genoma de los monocitos presentes en médula ósea o en circulación, el virus puede permanecer en forma latente sin expresarse, por lo que en este estadio estas células actuarían como verdaderos “caballos de troya” ya que transportarían al virus silenciosamente (Haase, 1986; Sellon y col., 1996; Clements y Zink, 1996; Oaks y col., 1998; Leroux y col., 2004).

Luego de la maduración y diferenciación de los monocitos infectados, tanto en tejido como en cultivo, sus factores celulares transcripcionales, tal como el factor específico de macrófago, (Pu.1), inician la transcripción viral por la acción de los genes *Rev*, con la consecuente producción de proteínas virales Gag, Pol y Env. Finalmente se produce la liberación de viriones por gemación de los macrófagos tisulares, observándose un aumento brusco del RNAv plasmático (10^6 TCID₅₀%/ ml) y de DNA viral en casi todos los tejidos, aunque preferentemente en bazo e hígado (Carpenter y Chesebro, 1989; Maury, 1994^b; Clements y Zink, 1996, Oaks y col., 1998; Murphy y col., 1999^d; Hammond y col., 2000, Cook y col., 2001).

Los lentivirus tienen mecanismos complejos por los cuales logran su persistencia mediante la regulación tanto de sus niveles de replicación como de su expresión génica. La replicación, y por ende la expresión génica, puede alterarse por variaciones en los elementos regulatorios LTR y *Rev* (Maury y col., 1997; Carpenter y col., 1991; Belshan y col., 2001).

En virtud de la elevada tasa replicativa en cada pico febril se producen errores en la transcripción del RNA a DNA, mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. Estas alteraciones ocurren principalmente en segmentos génicos que codifican a los sitios glicosilados de las proteínas de envoltura, generando, en tan solo dos semanas, variantes virales que reemplazan a las cepas anteriores con características fenotípicas diferentes (Montelaro y col., 1984^a; Carpenter y col., 1987; Ball y col., 1992; Greene y col., 1993; Kim y Casey, 1994; Suarez y Whestone, 1997, Leroux y col., 1997; Leroux y col., 2001). Se ha demostrado que en animales persistentemente infectados, en períodos con bajos niveles de viremia, debajo de 10^7 - 10^8 copias/ml de RNA_v, se generan también variantes virales, lo que contribuye a la persistencia de este lentivirus (Hammond y col., 2000; Leroux y col., 2001, Belshan y col., 2001; Leroux y col., 2004; Craigo y col., 2005)

A.3.3 Proteínas virales estructurales.

El virus de la AIE (Figura 1) presenta seis proteínas estructurales principales que constituyen el 60% del virión. Dos de ellas son las glicoproteínas de envoltura gp90 y gp45, y las cuatro restantes son proteínas internas no glicosiladas, denominadas p26, p15, p11 y p9, que integran la nucleocápside viral (Cheevers y col., 1978; Charman y col., 1979; Montelaro y col., 1984^a).

A.3.3 a) Glicoproteínas de envoltura:

Los genes *Env* codifican una proteína precursora de envoltura de 153 kDa altamente glicosilada, la que es clivada por proteasas celulares en dos proteínas gp90 y gp45, ambas unidas no covalentemente formando un complejo oligomérico gp90/gp45, cuyos dominios hidrofílicos se proyectan hacia la superficie externa de la membrana (Flint y col., 2000).

Glicoproteína gp90.

La proteína gp90 se caracteriza por ser una proteína que tiene 17 sitios de glicosilación, uniéndose a las moléculas de los hidratos de carbono mediante el nitrógeno de las asparaginas, principalmente y por el oxígeno de las serinas y/o treoninas en menor proporción (Murphy y col., 1999^d).

Esta proteína superficial presenta regiones conservadas entre regiones variables. Al igual que las glicoproteínas de los lentivirus VIH, VIF y VIB, está expuesta a permanentes modificaciones, asociadas a las sucesivas replicaciones

que sufre el virus como se describiera anteriormente (Leroux y col., 1997). De allí que las secuencias de las glicoproteínas de las diferentes cuasiespecies víricas varíen respecto a la secuencia consenso, principalmente en las regiones variables (V) (Perry y col., 1992; Leroux y col., 1997). Inicialmente fueron descritas dos regiones constantes ubicadas, una en el extremo aminoterminal (N-terminal), entre los aminoácidos (aa) 1-110, y otra, en el extremo carboxiloterminal (C-terminal), aa 370-444. Entre ambos extremos se ubica una región central variable, aa 111- 370, que a su vez presenta una región de hipervariabilidad (HVR) (306- 336) (Payne y col., 1987; Payne y col., 1989).

Hasta el presente, y en virtud de la máxima divergencia encontrada (30%) respecto de la secuencia consenso, se han definido 8 dominios variables: V1₍₂₆₋₄₁₎, V2₍₁₄₅₋₁₄₉₎, V3₍₁₈₆₋₂₀₀₎, V4₍₂₃₃₋₂₃₇₎, V5₍₂₇₅₋₂₈₅₎, V6₍₃₀₇₋₃₁₆₎, V7₍₃₆₆₋₃₇₆₎ y V8₍₃₉₃₋₄₀₂₎. El dominio V3₍₁₈₆₋₂₀₀₎ es el que presenta mayor variabilidad, que junto al V4₍₂₃₃₋₂₃₇₎ son los mas extensamente estudiados por adoptar la misma topología que las regiones V1 y V2 de la proteína gp120 del virus VIH (Zheng y col., 1997^b, Leroux y col., 1997, Leroux y col., 2001, Howe y col., 2002; Dai y col., 2003; Mealey y col., 2004; Sponseller y col., 2007; Li y col., 2005). En la figura 2 estos dominios se encuentran subrayados.

Dado que la glicoproteína gp90 presenta, en el curso de la enfermedad, elevado poder inmunogénico, varios investigadores han buscado definir a los epitopes T y B más relevantes (Hussain y col., 1988; O' Rourke y col., 1988; Perryman y col., 1990; Ball y col., 1992; Grund y col., 1996; Zheng y col., 1997^a; Mc Guire y col., 2002; McGuire y col., 2003; Mealey y col., 2004; Leroux y col, 2004). En la figura 2 se muestran en recuadros aquellas regiones de mayor reconocimiento por anticuerpos y se resaltan en letras de color los epitopes que hasta el presente se han definido.

Los epitopes B, ubicados en las regiones más conservadas, son reconocidos por anticuerpos no neutralizantes, en tanto que los ubicados en regiones variables son reconocidos por anticuerpos neutralizantes (Montelaro y col., 1984^b; Grund y col., 1996; Zheng y col., 1997^{a/b}).

Mediante el empleo de péptidos sintéticos y anticuerpos monoclonales, en el extremo N-terminal, Ball y colaboradores han encontrado 5 regiones (región 1, 4, 5A, 5B y 6) reconocidas por anticuerpos presentes en al menos el 70% de los equinos persistentemente infectados. Se observó, además, que un anticuerpo monoclonal no neutralizante reconocería al epitope lineal KEARDQEMN₍₅₀₋₅₈₎,

denominado gp 90-A, reconocido además por anticuerpos equinos presentes en el 30% de los animales analizados (figura 2) (Ball y col., 1992).

Dentro de la región variable central de la gp90 se ha identificado una región, denominada Dominio Neutralizante Principal (PND)₍₁₇₅₋₂₁₃₎, reconocida tanto por anticuerpos presentes en el 75% de los equinos persistentemente infectados como por anticuerpos generados en la fase aguda de las infecciones experimentales (Ball y col., 1992; Zheng y col., 1997^b). En ella se distingue una secuencia peptídica, denominada región V1₍₁₈₇₋₂₁₆₎, que ha sido reconocida por el 70 % de los sueros analizados (Ball y col., 1992). Dentro de la región PND, se han identificado además, dos epitopes denominadas Gp90-E_{NT} (SNSVRVEDVT)₍₁₉₁₋₂₀₀₎ y Gp90-D_{NT} (NTAEYWGFK)₍₂₀₁₋₂₀₉₎ reconocidos por anticuerpos monoclonales con capacidad para neutralizar al virus *in vitro* (Ball y col., 1992; Zheng y col., 1997^a). Ambos fueron también reconocidos por anticuerpos equinos presentes en el 40% y 15%, respectivamente, de los animales analizados (Ball y col., 1992). Por otra parte, en la región de estos epitopes B, se encontró un epitope T, denominado Env RW12 RVEDVTNTAEYW₍₁₉₅₋₂₀₆₎, reconocido por linfocitos T citotóxicos (LTc) en restricción al haplotipo ELA-A1 (Ridgely y McGuire, 2002; Mealey y col., 2003; Ridgely y col., 2003). McGuire y colaboradores han hallado que este epitope era reconocido por LTc provenientes de todos los animales analizados (n=15) (McGuire y col., 2003). Por otra parte, Fraser y colaboradores encuentran que una variante de este epitope (RVEDVMNTTEYW)₍₁₉₅₋₂₀₆₎, fue reconocida por linfocitos T provenientes de 6 de los 15 equinos analizados, cuyos haplotipos fueron A5/A6, A1/W11, A1, A6, A1/A5 (Fraser y col., 2003). Si bien se ha encontrado que dicho epitope T es inmunodominante por cuanto persiste durante los 127 días de infección experimental, se observó que no había correlación entre las células CD8⁺, específicas del epitope T Env RW12, con elevada avidéz, y el control de la carga viral en dos animales con haplotipo ELA-A1, infectados experimentalmente con el virus (Mealey y col., 2003; Mealey y col., 2005). Se observó que ambos epitopes B y T, al estar ubicados en una región de elevada tasa de mutación (V3)₍₁₈₆₋₂₀₀₎, perdían la capacidad de ser reconocidos por los LTc y por los anticuerpos específicos presentes en la etapa crónica de la infección. Esto ocasionaría que las cuasiespecies virales evolucionen hacia fenotipos

resistentes a los mecanismos efectores inmunológicos (Mealey y col., 2003). Este fenómeno, también documentado en VIH-1 y en VISmac 239, sería consecuencia de una acción selectiva del sistema inmune (Howe y col., 2002). Esto fue posteriormente comprobado al haberse observado que el grado de mutación viral en las regiones $V3_{(186-200)}/V4_{(233-237)}$, era significativamente superior en animales inmunocompetentes infectados que el observado en equinos SCID infectados (Mealey y col., 2004). En efecto, en animales inmunocompetentes infectados experimentalmente, el 68% de las cuasiespecies tenían mutaciones a nivel de $V3_{(186-200)}$ y el 50% en el epítipo Env RW12₍₁₉₅₋₂₀₆₎. En animales SCID infectados las variaciones fueron significativamente menores, encontrándose que sólo un 8,5 % de las cuasiespecies tuvieron mutaciones en $V3_{(186-200)}$ y un 6,4% en Env RW12₍₁₉₅₋₂₀₆₎. Al reconstituir en estos animales su sistema inmune, mediante transferencia de LB y LT derivados de animales inmunocompetentes, el 100 % de las cuasiespecies virales sufrieron cambios en $V3_{(186-200)}/V4_{(233-237)}$ y Env RW12₍₁₉₅₋₂₀₆₎, así como también a nivel de las regiones variables $V5_{(275-285)}$, $V6_{(307-316)}$ y $V7_{(366-376)}$ (Mealey y col., 2003; Mealey y col., 2004).

Dentro de la región variable central, no incluida en PND₍₁₇₅₋₂₁₃₎, Ball y colaboradores encontraron otras cinco regiones, denominadas $8V_{(138-160)}$, $V3_{(241-269)}$, $V4A_{(265-285)}$, $V4B_{(281-301)}$ y $V5B_{(313-331)}$, reconocidas por anticuerpos presentes en al menos el 70 % de los animales persistentemente infectados. Entre las regiones $8V_{(138-160)}$ y $V3_{(241-269)}$, mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal no neutralizante, se identificó un epítipo B, denominado gp90-B, cuya secuencia es NINDTDTWIP₍₂₃₁₋₂₄₀₎. Dentro de la región $V4A_{(265-285)}$, con el empleo de un anticuerpo monoclonal neutralizante, se definió un epítipo Gp90- C_{NT} (PPFFLVQEKGI) ₍₂₇₀₋₂₈₀₎. Ambos epítipos son reconocidas por anticuerpos presentes en el 45% de los animales persistentemente infectados (Ball y col., 1992).

Finalmente, en el extremo C-terminal, se han definido dos regiones reconocidas por anticuerpos provenientes de la mayoría de los equinos infectados. La mejor reconocida, identificada como región 12₍₄₁₆₋₄₄₁₎, no sólo fue reconocida por los anticuerpos presentes en el 100% de los animales infectados (n=20), sino también por aquellos generados en infecciones experimentales, durante las tres fases de la enfermedad. Por su naturaleza anfipática se propone

que esta región, además, podría ser reconocida por los TCR. Con menor reconocimiento también se ha determinado una segunda secuencia, identificada como region 11₍₃₉₅₋₄₂₀₎, reconocida por sueros proveniente del 85% de los animales en estudio (Ball y col., 1992).

Glicoproteína gp45.

La glicoproteína gp45, a diferencia de la proteína gp90, cuenta con tan sólo 5 sitios de glicosilación siendo también menos variable. En efecto, se ha demostrado que las distintas proteínas de membrana presentes en las cuasiespecies virales solo difieren en un 5% de la secuencia consenso (Perry y col., 1992; Leroux y col., 1997). En la figura 3 se muestra la secuencia lineal y en ella se marcan tanto los epitopes como las regiones de reconocimiento inmunológico.

La glicoproteína gp45 posee dos dominios hidrofóbicos en sus extremos: un péptido de fusión (PF) ₍₄₄₆₋₄₆₄₎ en la porción amino-terminal y en el carboxi-terminal el tallo intracitoplasmático, de 226 residuos, que, en el proceso de maduración celular, es clivado dando una proteína, p20, no glicosilada, con actividad lítica análoga a los péptidos líticos de las proteínas de membrana de otros lentivirus (Kowalski y col., 1987; Lynn y col., 1988; Venable y col., 1989; Hunter y Swanstrom, 1990; Segrest y col., 1990; Rice y col., 1990; Miller y col., 1991; Beisel y col., 1993; Pancino y col., 1994; Belshan y col., 2001; Leroux y col., 2004).

A los efectos de identificar regiones antigénicas en esta proteína, Chong y colaboradores han evaluado por Western Blot si los anticuerpos de equinos infectados crónicos eran capaces de reconocer a 17 fragmentos de esta proteína, obtenidos por recombinación génica. Si bien ellos encontraron que el 70% de dichos sueros presentaban anticuerpos capaces de reconocer al PF, la región de mayor reconocimiento estaba entre los dos dominios hidrofóbicos terminales. En esta región se identificaron dos secuencias, R32 ₍₅₂₂₋₅₃₄₎ y R51 ₍₅₃₄₋₅₄₇₎ que fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en el 100% y 90%, respectivamente, de los animales estudiados. Ambas secuencias están comprendidas dentro de un dominio inmunodominante principal (PID) ₍₅₁₁₋₅₅₇₎ altamente conservado, similar al descrito en otros lentivirus tales como el VIF, VIS y VIH-1 y 2 (Chong y col., 1991^a).

Hussain y colaboradores han producido dos anticuerpos monoclonales, gp45-A y gp45-B, no neutralizantes (Hussain y col., 1987). El primero de ellos fue capaz de reconocer al péptido sintético denominado R33 ₍₅₃₇₋₅₄₃₎ ERTHVFC constituido por los 7 aminoácidos que adoptan una estructura secundaria tipo β en virtud de

los dos residuos de cisteínas ubicados en las posiciones 535 y 543, unidos por un puente disulfuro. Esta misma secuencia sólo fue reconocida por el 45% de los sueros provenientes de animales infectados crónicos. Por otra parte, el anticuerpo monoclonal gp45-B reconoce a una secuencia peptídico REDTWDQAQHNIHLAGVTGGSGDKYCKQK₍₆₇₂₋₇₀₀₎, también reconocida por anticuerpos presentes en el 70% de los equinos evaluados (Chong y col., 1991^a).

Esta glicoproteína de transmembrana es reconocida además por LTc citotóxicos (haplotipos A7/W11 y A4/A5) de sangre periférica presentes en el 29% de equinos infectados (Hussain y col., 1988; McGuire y col., 2000, McGuire y col., 2002). Si bien hasta el presente aún no han sido localizado en animales infectados, en animales vacunados con la cepa AIEV_{D9}, Tagmyer y colaboradores han localizado 13 secuencias, identificados como péptidos 50₍₄₉₁₋₅₁₀₎; 52₍₅₁₁₋₅₃₀₎; 60₍₅₉₁₋₆₁₄₎; 66₍₆₅₀₋₆₇₀₎; 68₍₆₇₁₋₆₉₀₎, 70₍₆₉₁₋₇₁₀₎, 73₍₇₂₁₋₇₄₀₎, 74₍₇₃₁₋₇₅₀₎, 76₍₇₅₁₋₇₇₀₎, 77₍₇₆₁₋₇₈₀₎, 79₍₇₈₁₋₈₀₀₎, 81₍₈₀₁₋₈₂₀₎ y 83₍₈₂₁₋₈₄₀₎, reconocidas por LTh provenientes de al menos el 60% de los animales, habiéndose observado además que los péptidos 50₍₄₉₁₋₅₁₀₎ y 52₍₅₁₁₋₅₃₀₎, también fueron reconocidos por LTc (Craig y col., 2007^b; Tagmyer y col., 2007).

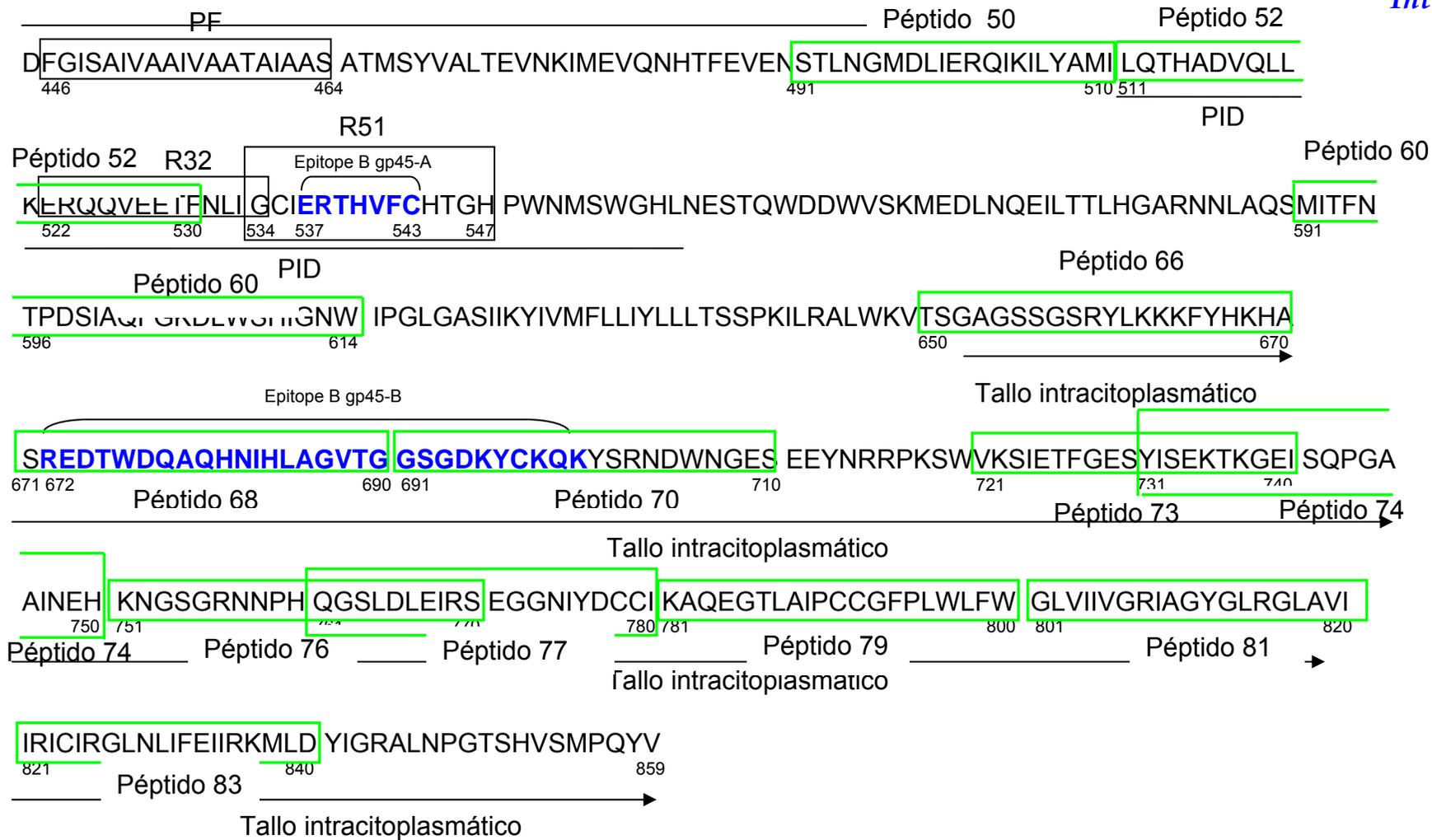


Figura 3. Ubicación de los epitopes y regiones de mayor reconocimiento, presentes en la glicoproteína gp45 del VAIE.

Se distinguen con letras de color a los epitopes B, en recuadros negros a las regiones reconocidas por los Acs y en verde a las reconocidas por los LTh.

A.3.3 b) Proteína de la cápside, p26:

La proteína p26 o antígeno de cápside (CA) es la proteína estructural más abundante presente en la cápside viral (Montelaro y col., 1984^a). Está codificada por el gen *Gag* y deriva de una poliproteína precursora (Pr55 gag), que al ser clivada por una proteasa viral, da como producto la proteína p26.

A diferencia de las glicoproteínas gp90 y gp45, la proteína p26 es la más conservada, habiéndose encontrado similitud no sólo entre las proteínas de las cuasiespecies virales sino también entre las proteínas capsídicas del VIF, VIH, VAEC y VIB (Stephens y col., 1986; Montelaro y col., 1988; Steinman y col., 1990; Grund y col., 1994; Egberink y col., 1990; Birkett y col., 1997). No obstante, se ha observado que existe una variabilidad de un 12% entre las proteínas p26 presentes en las distintas cepas virales salvajes y la cepa consenso, especialmente en dominios coincidentes con epitopes reconocidos por LTc, identificados como epitopes 18a ELA-A5.1 (HPLPNAPLV)₍₂₀₉₋₂₁₇₎ y 28b-1 (GTTKQKMML)₍₂₄₆₋₂₅₄₎ (Zhang y col., 1999, Nagarajan y Simard, 2007). Sin embargo, hasta el presente, la proteína p26 es la elegida para detectar la infección por ser la más conservada y la que predomina en el antígeno utilizado en el Test de Coggins (Coggins y Pattern, 1970; Coggins y Norcross, 1970).

Al igual que las proteínas de envoltura, la proteína p26 genera una respuesta celular y humoral, siendo esta última de 10 a 100 veces menor que la producida por las proteínas gp45 y gp90 (O'Rourke y col., 1988; Chong y col., 1991^b; Hammond y col., 1997). No obstante ello, se ha observado que la proteína p26 no solo fue reconocida por linfocitos CD4⁺, presentes en 5 de las 5 muestras de sangre periférica de equinos infectados, sino también por linfocitos CD8⁺ provenientes de 6 de los 7 equinos infectados con el VAIE (Lonning y col., 1999^a, McGuire y col., 2000). En virtud de ello, numerosos investigadores han analizado regiones de reconocimiento a efectos de definir epitopes B, Th y/o Tc, empleando polipéptidos recombinantes y/o péptidos sintéticos (McGuire y col., 1994a; McGuire y col., 1994^b; Zhang y col., 1998; Zhang y col., 1999; Lonning y col., 1999^{a/b}; McGuire y col., 2000, Ridgely y McGuire, 2002; Fraser y col., 2003; Chung y col., 2004; Mealey y col., 2005; Fraser y col., 2005).

En la figura 4 se representa la secuencia de la proteína p26 señalando las regiones de reconocimiento estudiadas (recuadros) y los epitopes (letras azules) definidos hasta el presente.

Estudios realizados por los grupos de investigación de Zhang y de McGuire han logrado demostrar que LT presentes en el 50% de los equinos infectados con el VAIE, eran capaces de reconocer algún epitope localizado dentro del extremo N- terminal, entre los aa 125- 245 (Zhang y col., 1998; McGuire y col., 2000). Dentro de esta región y mediante el empleo de secuencias peptídicas de menor longitud (15 a 20 aa), se definió una primera zona de reconocimiento, ubicada entre los aa 149-204, que comprende los péptidos 3_(149- 168), 4_(161- 180), 5₍₁₇₃₋₁₉₂₎ y 6₍₁₈₅₋₂₀₄₎ (Lonning y col., 1999^{ab}; McGuire y col., 2000; Chung y col, 2004). Mediante ensayos de linfoproliferación *in vitro* con péptidos sintéticos y marcación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, Lonning y colaboradores observaron que cada una de las secuencias peptídicas mencionadas eran reconocidas por LTh presentes en 3 de los 5 equinos evaluados (Lonning y col., 1999^a). Por otra parte, Chung y colaboradores encontraron que entre los péptidos 4₍₁₆₁₋₁₈₀₎ y 5₍₁₇₃₋₁₉₂₎, había una secuencia, FGILSVDCTSEEMNAFLDV₍₁₆₅₋₁₈₃₎, reconocida por linfocitos CD8⁺ presentes en 3 equinos, de los 17 animales infectados crónicos (Chung y col., 2004). En la figura 4 esta secuencia se halla encerrada en un recuadro rojo, al igual que las restantes secuencias reconocidas por los LTc. Las secuencias reconocidas por linfocitos LTh, se encierran en recuadros verdes.

Una segunda región de reconocimiento se ubica entre los aa 209- 273, conformada por las regiones denominadas péptido 18₍₂₀₉₋₂₂₈₎, Gag₂₂₁₋₂₄₅, Gag₂₄₂₋₂₆₁, Gag_{250- 269} y péptido 11_(254- 273). El péptido 18₍₂₀₉₋₂₂₈₎, estudiado por Zhang y colaboradores, fue reconocido por LTc de memoria con haplotipos A1/A5, A5/A6, A5/A8, presentes en los animales persistentemente infectados con el VAIE, que reconocieron también al extremo N- terminal de la proteína, anteriormente descrito (Zhang y col., 1998). Dentro del péptido 18₍₂₀₉₋₂₂₈₎ estos autores definieron a un epitope LTc, denominado 18a ELA-A5.1 (HPLPNAPLV)₍₂₀₉₋₂₂₈₎, el que fue reconocido en el contexto del ELA A1/A5.1. Por otra parte, Zhang y colaboradores demostraron que, pese a que los genes *Gag* son altamente conservados, había variación dentro de esta región

(HPLQNAPMV) que no afectaría el reconocimiento (Zhang y col., 1999). Este mismo epítopo fue estudiado por Ridgely y colaboradores e incluido en una vacuna a lipopéptidos, junto a epítopos Env. Si bien esta vacuna no evitó la infección, logró reducir los síntomas clínicos de la enfermedad (Ridgely y McGuire, 2002; Ridgely y col., 2003).

En esta segunda zona de reconocimiento (209- 273) se ha observado que el péptido sintético correspondiente a la región Gag 221-245, era reconocido por LTh presentes en 4 de los 5 equinos analizados (Lonning y col., 1999^a). Esta misma secuencia también fue estudiada por Fraser y colaboradores, entre otros epítopos, los que encontraron que también era reconocida por linfocitos Th1, productores de IFN γ , en 7 de los 10 equinos infectados experimentalmente en fase de portadores asintomáticos, animales que diferían en sus haplotipos DRA y DQA (Fraser y col., 2002, McGuire y col., 2002).

En virtud de estos hallazgos, Fraser y colaboradores incluyeron al péptido Gag 221-245 en una vacuna a lipopéptidos junto a otros péptidos con secuencias correspondientes a la región C- terminal. Si bien a una semana de haber inmunizado tuvieron respuesta celular a LTh y LTc, cuando estos animales fueron infectados con el VAIE, no se observó disminución en la carga viral ni en la severidad de la infección. Esto permitió estimar que estas secuencias, por más que sean fuertes inductoras de linfoproliferación y citotoxicidad, no eran capaces de generar una respuesta inmune que controle la infección (Fraser y col., 2005).

Otra región estudiada fue la comprendida entre los aa 242- 261 (Gag 242-261) donde los LTh, a diferencia de los LTc, presentes en sangre periférica en 4 de los 5 equinos infectados, fueron capaces de reconocerla (Zhang y col., 1998, Lonning y col., 1999^{a,b}, McGuire y col., 2002). Fraser y colaboradores encontraron además que dicha región era reconocida por LTh1 presentes en 5 de los 10 equinos infectados experimentalmente con la cepa WSU5, en estadio de portador inaparente (Fraser y col., 2002). Mediante ensayos de proliferación, se analizaron linfocitos provenientes de 15 animales infectados con las cepas WSU5 Wyoming y PV, observándose que en 9 de estos animales reconocieron a la región Gag 242- 261 y 13 a la región Gag 250-269 (Fraser y col., 2003).

Esta última región Gag 250-269 también fue incluida en la vacuna a lipopéptidos diseñada por Fraser y colaboradores ya mencionada (Fraser y col., 2005). Por otra parte, el péptido 11₍₂₅₄₋₂₇₃₎, que tiene una secuencia peptídica solapada en 16 aa con Gag 250- 269, también fue reconocida por LTh causando su proliferación. Los autores proponen que dicha región podría contener epitopes T “promiscuos” por cuanto fue reconocida por los linfocitos de todos los animales ensayados (n=5) con haplotipos disímiles (Lonning y col., 1999^a).

Empleando un polipéptido que representa a los últimos 82 aa del extremo C- terminal, McGuire y colaboradores demostraron que fue reconocido por LTc presentes en 4 de los 7 equinos infectados, con haplotipos A7/W11, A1/W11, A6/A9, A4/A5 (McGuire y col., 2000). Dentro de esta región Chung y colaboradores han observado dos regiones de reconocimiento de LTc, denominadas EC3₍₂₈₁₋₃₁₃₎ y EC4_(317- 359), la primera reconocida por LTc presentes en 9 animales (haplotipos A1, A4, A4/W11, A9, A7/W11, A1/W11), en tanto que EC4_(317- 359) fue reconocida por LTc presentes en 7 animales (haplotipos A4, A6, A9, A3/A5) de los 17 evaluados (Chung y col., 2004). Ambas regiones han sido extensamente estudiadas por otros autores, hallándose en ellas numerosas regiones de reconocimiento por parte de LT (Th y Tc) así como también por LB (Chong y col., 1991^b, Zhang y col., 1998, Lonning y col., 1999^a, Mealey y col., 2003, McGuire y col., 1994^a, Nagarajan y Simard, 2007).

Mediante el empleo de péptidos sintéticos en la región relacionada a EC3₍₂₈₁₋₃₁₃₎, se han estudiado dos péptidos que comparten una secuencia de 8 aa, denominados péptido 13₍₂₇₈₋₂₉₇₎ y 24₍₂₉₀₋₃₀₉₎, definiéndose dentro del primero un epitope B y un epitope CTL dentro de la secuencia compartida entre ambos (Zhang y col., 1998, Lonning y col., 1999^a, (Mealey y col., 2003 Chong y col., 1991^b). Por otra parte, Lonning y colaboradores reportaron que el péptido 13₍₂₇₈₋₂₉₇₎ era reconocido por LTh presentes en 4 de los 5 equinos infectados experimentalmente con dos años de evolución de la enfermedad (Lonning y col., 1999^a). Dentro de este péptido 13₍₂₇₈₋₂₉₇₎ se localiza la Región de Homología Mayor (MHR)₍₂₇₇₋₂₉₂₎, donde un 63% de su secuencia es idéntica a la MHR de la proteína p24 del VIH. En ambas regiones proteicas se han localizado dos epitopes B y un epitope T. En la proteína p26 del VAIE estos

epitopes se localizaron entre los aa 278-313. Esta region contiene un epitope B, denominado p26-D₍₂₈₂₋₂₉₆₎ cuya secuencia es KEPYPEFVDRLLSQI, fue reconocida por los anticuerpos presentes en el 65% de los animales persistentemente infectados. Por su similitud en secuencia y conformación con MHR de la proteína p24, se propone que los anticuerpos equinos anti p26-D₍₂₈₂₋₂₉₆₎ también reconocerían a esta proteína p24 (Chong y col., 1991^b). Dentro del epitope B p26-D₍₂₈₂₋₂₉₆₎, esta incluido el epitope Gag 288-297 (FVDRLLSQI), secuencia altamente conservada reconocida, con moderada avidez, por LTc (haplotipo A4) (Mealey y col., 2003). Ello corroboraría el hallazgo que anteriormente hicieran Zhang y colaboradores al haber observado que el péptido 24₍₂₉₀₋₃₀₉₎ era reconocido por los LTcm hallados en 2 (A7/W11 y A1/W11) de los 3 equinos infectados experimentalmente durante al menos 4 años de infección (Zhang y col., 1998). Dentro de la region 278-313 tambien se ha identificado un segundo epitope B, QEISKFLTD₍₃₀₃₋₃₁₁₎, denominado EIA6A1, e incluido en la región Sam 51₍₂₉₄₋₃₂₅₎, reconocida por anticuerpos presentes en el 90% de los sueros equinos infectados (Chong y col., 1991^b, McGuire y col., 1994^b).

En la región EC4₍₃₁₇₋₃₅₉₎ se han reportado los péptidos 16₍₃₁₄₋₃₃₃₎, 28₍₃₃₈₋₃₅₉₎, Sam 50₍₃₂₆₋₃₅₁₎ y un epitope B, identificado como 28b-1₍₃₄₆₋₃₅₄₎. Estudios efectuados por Lonning y colaboradores demostraron que el péptido 16₍₃₁₄₋₃₃₃₎ era reconocido por LTh presentes en 3 de 5 equinos, al proliferar *in vitro* en su presencia (Lonning y col., 1999^a). Este péptido comparte, 12 aa con Sam 51₍₂₉₄₋₃₂₅₎ y 8 con Sam 50₍₃₂₆₋₃₅₁₎, siendo esta última reconocida por anticuerpos presentes en el 100% de los equinos infectados con el VAIE (Chong y col., 1991^b). Por otra parte, Zhang y colaboradores han sintetizado un péptido, identificado con el número 28₍₃₃₈₋₃₅₉₎, reconocido por LTc de memoria, con haplotipos A7/W11, A1/W11, A6/A9, A1/A5, definiéndose en él un epitope Tc, cuya secuencia GTTKQKMML₍₃₄₆₋₃₅₄₎ es coincidente con el epitope B 28b-1₍₃₄₆₋₃₅₄₎, descrito anteriormente (Zhang y col., 1998, Zhang y col., 1999).

En virtud de lo expuesto se observa que la mayoría de los epitopes encontrados, ya sea B, LTh o LTc estarían ubicados en la región C- terminal, específicamente en la región comprendida entre los aa 281-359 (Ridgely y McGuire, 2002).

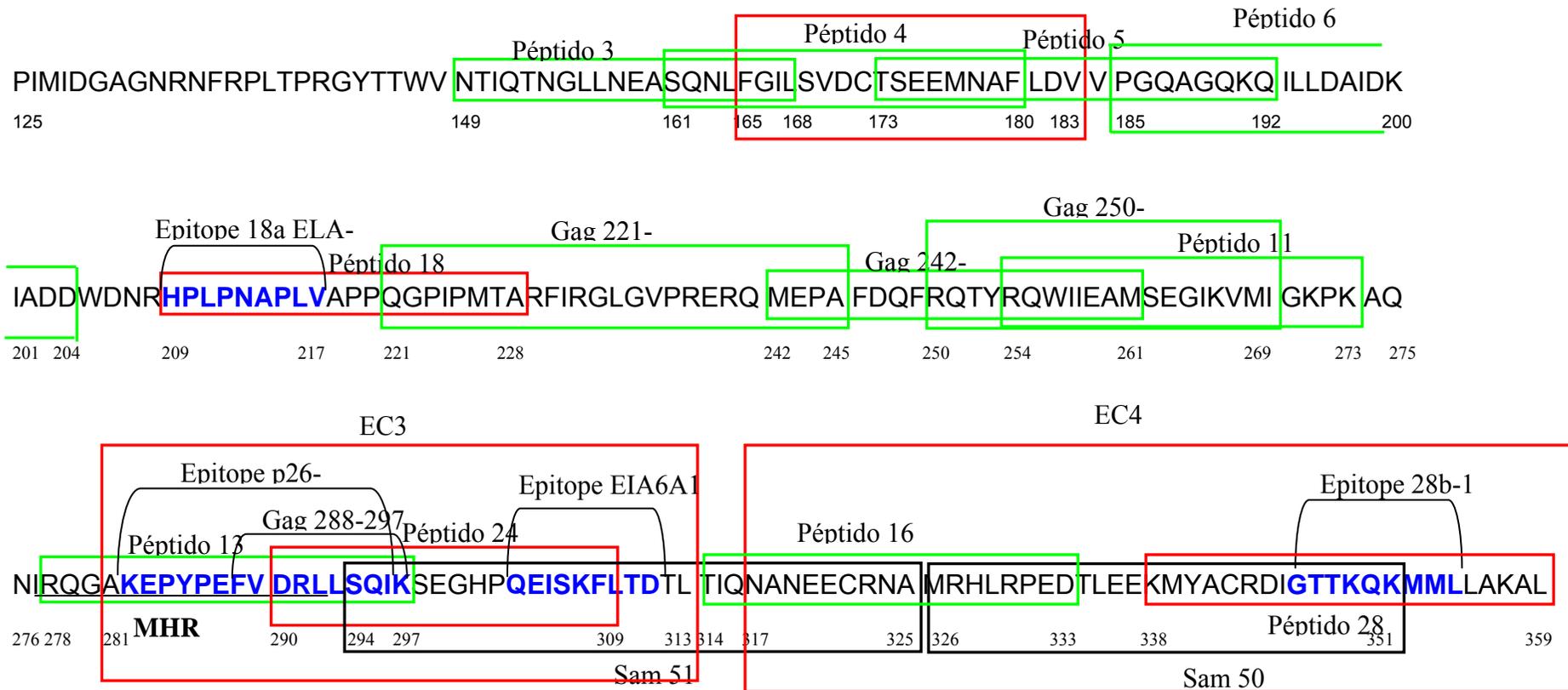


Figura 4. Ubicación de los epitopes y regiones de mayor reconocimiento, presentes en la proteína p26 del VAIE. Se distinguen con letras de color los epitopes B y/o T y en recuadros negros a las regiones reconocidas por los Acs, en verde a las reconocidas por los LTh y en rojo a las reconocidas por los LTc

A.4 Respuesta inmune durante la infección.

La Anemia Infecciosa Equina es una enfermedad viral persistente que transcurre, en delicado equilibrio, entre las sucesivas replicaciones virales y los mecanismos celulares y humorales capaces de limitarlas pero sin lograr eliminar totalmente al virus del huésped. Confirman este fenómeno la recurrencia de periodos agudos en equinos persistentemente infectados e inmunosuprimidos, tal como ya se mencionara, y que animales con síndrome de inmunodeficiencia severa combinada (SCID) e infectados con el VAIE, logran controlar la viremia una vez que su sistema inmune haya sido restablecido (Perryman y col., 1988; Kono, 1973; Kono y col., 1976; Tumas y col., 1994; McGuire, 1997; Hammond y col., 1998; Murakami y col., 1999; Hammond y col., 2000; Harrold y col., 2000; Mealey y col., 2001; Leroux y col., 2004).

Durante la etapa aguda, cuando el virus ingresa a dermis por picadura de tábanos hematófagos, es capaz de infectar tanto a las células dérmicas como a los macrófagos titulares a través del receptor ELR1, sin que medien correceptores, tal como sucede con los lentivirus simios, humanos y felinos (Jin y col., 2005). De allí que estas células presentadoras de antígeno sean un excelente reservorio permanente del VAIE (Raabe y col., 1998^b, Sellon y col., 1992^b; Maury, 1994^a; Clements y Zink, 1996; Hammond y col., 1997; Swardson y col., 1997; Harrold y col., 2000; Jin y col., 2005).

Una vez que el virus entra al macrófago, es procesado por la vía endocítica ácida clásica (vía dependiente del pH), a diferencia de los virus de la inmunodeficiencia humana y simia que emplean una vía independiente del pH (Jin y col., 2005; Brindley y Maury, 2005). Ello permitiría que estas células presenten sus antígenos al LTh por la vía exógena, y además que empleen esta misma vía para presentar los antígenos mediante las moléculas CMH-I a los LTc, en forma cruzada (Fainboin y Geffner, 2005^{a/c}). Sin embargo, cuando los macrófagos están infectados con cepas patogénicas (cepa EIAV p19/Wenv 17), su capacidad de presentación antigénica se ve afectada al estar disminuída la expresión de proteínas virales de envoltura y del núcleo, a pesar de que tengan 7 veces más DNA viral integrado/ng DNA génico que al estar infectados con cepas no patogénicas (cepa EIAV19) (Lim y col., 2005). Si bien ambas cepas tienen efectos citopáticos similares en la línea celular EMDM (macrófagos

equinos derivados de monocitos), la cepa virulenta, a diferencia de la avirulenta, logra además aumentar la producción de IL-1, IL-6, IL-10, TNF α (Hammond y col, 1999^a; Lim y col., 2005; Rivera y McGuire, 2005).

Estos resultados se correlacionan con lo observado *in vivo*, donde los niveles altos de IL-6 y de TNF α séricos se correlacionan con el aumento de la carga viral asociada a un recrudecimiento de la infección. En animales con SCID infectados también hay niveles séricos aumentados de TNF α , en tanto que en animales inmunocompetentes infectados con cepas no patogénicas, los valores de TNF α no estarían incrementados (Costa y col., 1997; Swardson y col., 1997; Rusell y col., 1998; Sellon y col., 1998).

Las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF α) serían las responsables de las manifestaciones clínicas asociadas con los ciclos de viremia (Leroux y col 2004). La IL-1 estimula la liberación de prostaglandinas, causando fiebre, anorexia y letargia, e induciendo la expresión de TNF α . Ambas citoquinas suprimen la eritropoyesis y activan la eritrofagocitosis, favoreciendo la anemia (Leroux y col., 2004; Lim y col., 2005). Por otra parte, la IL-1 también induce la expresión de IL-6, la que junto a la IL-10 actúa sobre los LB aumentando la producción de IgM y de este modo favorecería los fenómenos patológicos asociados a inmunocomplejos, tales como la anemia hemolítica, glomerulonefritis y hepatitis (Sellon y col., 1998; Lim y col., 2005). Las interleuquinas IL-1, IL-6, TGF β e IFN α serían también responsables de la trombocitopenia. Mientras que las dos primeras provocan una activación plaquetaria, las dos últimas, que se encuentran en niveles superiores a los normales en plasma de animales inmunocompetentes y en animales SCID infectados, son capaces de inhibir la proliferación de megacariocitos en cultivo (Lim y col., 2005; Toosi y col., 1995; Bar y col., 1997; Oleksowicz y col., 1994, Russell y col., 1999).

Si bien el receptor viral ELR1 aun no ha sido descrito en células dendríticas, se ha encontrado que estas células, con fenotipo mieloideo equino (DH59B), son capaces de ser infectadas *in vitro* por la cepa viral VAIE_{WSU5} sin que por ello sufran fenómenos citopáticos similares a los observados cuando esta misma cepa infecta a los macrófagos (Rivera y McGuire, 2005). Dichas células dendríticas no solo mantienen intacta su capacidad para procesar y presentar los antígenos virales a las células T vírgenes y a las células citotóxicas de

memoria *in vitro*, sino que son capaces de expresar proteínas virales de envoltura y del núcleo aun en mayor cuantía que los macrófagos infectados (Carbone y Heath, 2003; Rivera y McGuire, 2005). Por otra parte estas células dendríticas expresan TLR3 que, al reconocer a los PAMP (patrones moleculares asociados con patógenos) de los virus RNA doble cadena, desencadenan la producción de IFN tipo 1, en especial IFN β , además de estimular la producción de IL-12 (Siedek y col., 1997; Hammond y col., 1999^c; Fainboin y Geffner, 2005^{a/c}). Un estudio realizado con células dendríticas humanas maduras estimuladas con IL-4 y GM-CSF, demuestra que al ser transfectadas con el VAIE como vector, son capaces de disparar tanto la producción de IFN α/β como de citoquinas proinflamatorias *in vitro*, así como también de aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras y del CMH-II (Tan y col., 2005).

Luego de establecida la infección viral en el tejido periférico, las células dendríticas inmaduras son las encargadas de reconocer y captar al virus, procesar sus proteínas, e inducidas por las citoquinas IL-1, IFN α/β y TNF α presentes en la fase aguda de AIE, migrar a los ganglios linfáticos regionales. Ya como células dendríticas maduras, presentan sus péptidos antigénicos a través de moléculas del CMH, clases I y II, por vía endógena o exógena respectivamente, a los linfocitos T vírgenes, reclutados en los ganglios linfáticos secundarios (Horohov, 2000; Fainboin y Geffner, 2005^{a/c}). Dicho reclutamiento provoca una disminución de LT circulantes (relación LTh/LTc: 6) según lo observado por Murakami y col. durante la primer viremia de la etapa aguda (Murakami y col., 1999). Otros estudios revelaron que, a pesar de esta disminución linfocitaria, la respuesta linfoproliferativa específica frente a macrófagos autólogos infectados, estaba aumentada durante los picos febriles y que si bien ambas subpoblaciones proliferaban *in vitro*, un 85% era CD4⁺ (Hammond y col., 1997; Hammond y col., 2000).

Dada la acción ejercida por IFN α/β , IL-12 e IL-18 equinas, secretadas por los macrófagos y células dendríticas activadas, la población linfocitaria CD4⁺ se diferencia principalmente hacia un fenotipo Th1 secretante de IFN γ , IL-2 y TNF α/β , lo que favorece la activación de células NK, mecanismo con función relevante en el desarrollo de la inmunidad antiviral (Steinbach y col., 2002; Fainboin y Geffner, 2005^b).

Se ha demostrado que la respuesta Th1, conjuntamente con la producción de IFN γ , participa activamente en infecciones virales tales como pseudorrabia porcina, herpes bovino y equino (Fischer y col., 2000; Woolums y col., 2003; Breathnach y col., 2005; Gutmann y col., 2005). Particularmente en AIE se ha encontrado que las secuencias Gag 221-245 y Gag 242-261, ya reseñadas como epitopes de la proteína p26, conjuntamente con el péptido de la proteína polimerasa, Pol 323-344, eran capaces de estimular *in vitro*, la proliferación de clones LTh1, secretores de IFN γ , por lo que estar ían involucradas en el control de la replicación viral (Fraser y col., 2002). Refuerzan este concepto estudios recientes donde se ha evaluado la producción de las citoquinas IFN γ , IL-2 e IL-12 durante infecciones experimentales con cepas virales patógenas. En aquellos animales que murieron con posterioridad a la primer viremia, si bien tuvieron aumento transitorio de estas citoquinas, decayeron a valores indetectables, previo al aumento de la carga viral. En tanto, los animales que lograron sobrevivir a la primer viremia, si bien presentaron aumentos y descensos bruscos de estas citoquinas en forma transitoria, éstas recuperaron sus valores basales a los tres meses de la infección (Zhang y col., 2007).

La inducción y expansión de los LTh1 promueven la proliferación de los LTc y ayudan a mantener a los LTcm que, junto a las células NK, son fuentes importantes de IFN γ . De esta manera se activan los macrófagos y las células NK, favoreciendo aun más la diferenciación de células linfocitos T CD4⁺ a un perfil Th1, inhibiendo su diferenciación a Th2 (Price y col., 1999; Hammond y col., 1998; Whitmire y Ahmed, 2000; Fainboin y Geffner, 2005^b).

A pocos días de comenzado el proceso infeccioso la primer viremia es eficientemente controlada por los LTc efectores. Los LTc se activan, se expanden, se diferencian a clones efectores y migran a los tejidos infectados (Rwambo y col., 1990; Mc Guire y col., 1994^b; Leroux y col. 2004). Si bien la participación de estas células es un rasgo común en numerosas enfermedades virales, están particularmente asociadas con el “clearance” viral en infecciones producidas por los lentivirus VIH, SIV y el VAIE. En efecto, se ha observado que al eliminar células CD8⁺ en monos infectados con VIS durante la fase crónica, había una rápida y marcada viremia que disminuía al restituirse estos clones

citotóxicos. Este fenómeno fue observado, además, en equinos al inocular cepas patogénicas del VAIE a equinos SCID y restableciendo su sistema inmune mediante transferencia de linfocitos histocompatibles, provenientes de progenitores infectados crónicos con EIAV, estimulados *in vitro* con el virus. El animal que no logró restaurar su sistema inmune murió a causa de una anemia fatal aguda, en tanto que en aquellos que lograron restaurarlo, la viremia se redujo en un 100%. En este último caso, los niveles alcanzados de los LTc efectores fueron semejantes a los de LTc de memoria encontrados en equinos durante la fase crónica (Mealey y col., 2001; Mealey y col., 2003; Chun y col. 2004; Lichterfeld y col., 2004). Por otra parte, son numerosos los autores que han detectado, durante la primer viremia, LTc capaces de reconocer antígenos virales, especialmente en las proteínas Gag, Env, Pol, Rev y S2 (Hammond y col., 1997; Hammond y col., 1998; Zhang y col., 1998; Lonning y col., 1999^b, McGuire y col., 2000, Mealey y col., 2003; Mealey y col., 2005). En particular, se han estudiado dos epitopes inmunodominantes capaces de ser reconocidos por los LTc, el Env-RW12 [RVEDVTNTAEYW] del PND de la gp 90, ya mencionado anteriormente, y el Gag-GW12 [GSQKLTTGNCNW], localizado en la proteína p15, ambos presentados por moléculas MHC-I, asociadas con el haplotipo ELA-A1. Si bien se observó que el epitope Env-RW12 presentó una afinidad 15 veces superior a la que tuvo el Gag-GW12 por esta molécula, este último epitope generó una respuesta citotóxica capaz de contribuir a controlar al virus. Por el contrario, se ha observado que en animales infectados experimentalmente con la cepa Wyoming no solo no hubo correlación entre la carga viral y la frecuencia de LTc efectores específicos del Env-RW12, sino que además las variantes virales producidas en las sucesivas replicaciones no fueron reconocidas por estos LTc (McGuire y col., 2003; Mealey y col., 2005).

Se ha demostrado que, durante la primer viremia, coincidente con el pico febril y con la respuesta Th1 y linfocitos T CD8⁺, los linfocitos B se mantuvieron en cantidades similares a las basales generando principalmente anticuerpos no neutralizantes (Murakami y col., 1999).

El estudio de la cinética de la producción de anticuerpos en infecciones experimentales revela que los equinos recién se tornan seropositivos a partir de los 16 a 42 días post infección, detectándose IgM anti Env a los 21 días, la que

se mantiene elevada hasta el día 35, para luego descender. Por su parte, los anticuerpos IgG anti-Env aumentan gradualmente llegando a un máximo recién entre las 7 a 10 semanas post infección. En tanto, los anticuerpos IgG anti-p26 fueron detectados a partir del día 15. Si bien la cinética de la producción de éstos Acs es coincidente con la de los anticuerpos IgG anti-Env, los niveles alcanzados de estos últimos los superan 10 a 100 veces (Montelaro y col., 1984^{a/b}; Rwambo y col., 1990; Hammond y col., 1997). Durante las primeras 4 a 7 semanas estos anticuerpos, de baja avidéz, reconocieron principalmente epitopes lineales, en tanto que a partir de la 7^a y hasta la semana 14, la avidéz fue en aumento y la reactividad dirigida principalmente hacia estructuras conformacionales nativas de las proteínas virales, siendo los isotipos predominantes IgGa (IgG₁ e IgG₂) e IgGb (IgG₄) (O'Rourke y col., 1989; Hammond y col., 1997; Hammond y col., 2000; Steinbach y col., 2002). Es controversial el tiempo en que aparecen los primeros anticuerpos neutralizantes, ya que han sido detectados entre los 14 a los 90 días de la infección, según sea la dosis, cepa viral y características de los animales empleados en las infecciones experimentales (Kono, 1969; Salinovich y col., 1986; Carpenter y col., 1987; Mealey y col., 2003; Mealey y col., 2005).

La participación del mecanismo de citotoxicidad anticuerpo dependiente (ADCC) en el control de los lentivirus VIH-1 y VIS ha sido demostrado, no así en el control de la replicación del VAIE. Esto podría deberse a que los anticuerpos capaces de unirse a la célula no median ADCC y/o a que haya una baja expresión de moléculas proteicas expresadas en la célula blanco infectada. Cualquiera sea la causa, el mecanismo de ADCC no sería responsable de controlar la replicación en AIE (Tumas y col., 1994; Tschetter y col., 1997; Hammond y col., 1998).

En síntesis, los eventos inmunológicos capaces, en parte, de controlar la primer viremia estarían asociados principalmente a Th1, LTc y/o a células productoras de IFN γ en tanto que se discute el rol de los anticuerpos neutralizantes en este primer periodo, a pesar de que se estime su participación en animales SCID infectados y reconstituido su sistema inmunológico (Hammond y col., 1998; Alcamí y Koszinowski, 2000; Mealey y col., 2001; Levy y Garcia-Sastre, 2001). De cualquier modo, estos mecanismos solo logran

disminuir la viremia hasta valores mínimos pero no logran erradicarla. Esto sería atribuido a que los virus han desarrollado mecanismos que contrarrestan o evaden la respuesta inmune innata y adaptativa (Hammond y col., 1998; Fainboin y Geffner, 2005^c). Los mecanismos de evasión que emplearía el VAIE serían los siguientes (Murphy y col., 1999^{c/d}).

1- Evasión por fusión de membranas citoplasmáticas: El virus causa una fusión entre membranas citoplasmáticas de células adyacentes, permitiendo su diseminación hacia la célula vecina sin ser expuesto al medio extracelular.

2- Mecanismo de “caballo de troya”: integración del genoma viral con nula o mínima expresión de proteínas virales sobre la membrana (Haase, 1986; Harrold y col., 2000)

3- Destrucción de células macrofágicas por efecto citopático.

4- Disminución de la expresión de moléculas MHC I y II, por inhibición de su producción lo que ocasionaría que la respuesta citotóxica también pueda estar inhibida, así como también la presentación antigénica a los linfocitos Th (Bendali-Ahcéne y col., 1997; Mealey y col., 2003). Si bien las moléculas MHC II equinas, a diferencia de lo que ocurre en el hombre y ratón, están presentes tanto en las APC como en la mayoría de los linfocitos T de equinos adultos sanos, en infectados con el VAIE la población MHC II está disminuida (Bendali-Ahcéne y col., 1997; Akens y col., 1997).

5- Variación génica: los episodios virémicos recurrentes están asociados con variantes virales que difieren antigénicamente entre sí, por lo que se postula que estos virus, al igual que en VIH, escapan permanentemente tanto de los anticuerpos como de las células citotóxicas. Mas aún, se ha observado que variaciones dentro de las secuencias que contienen al epítipo RW12 CTL (195-206) sería consecuencia de los mecanismos efectores inmológicos (Mealey y col., 2003).

No obstante estos mecanismos de evasión viral, la respuesta inmune no solo logra controlar la primera viremia manteniendo la carga viral plasmática en muy bajos niveles, sino que también participará en el curso clínico de la enfermedad.

A diferencia de lo que sucede en la etapa aguda, caracterizada por altos títulos de anticuerpos de baja avidéz y con especificidad hacia epítipes

lineales, durante la etapa crónica la resolución de los episodios virémicos recurrentes estaría asociada a la presencia de anticuerpos neutralizantes con elevada avidéz hacia estructuras conformacionales de las proteínas estructurales. Estos anticuerpos alcanzan sus valores máximos recién a partir del segundo o tercer mes de infección luego de la primer viremia, participando principalmente los isotipos IgGa (IgG₁/IgG₂) e IgGb (IgG₄). En tanto que los niveles de los isotipos IgGc e IgG (T) (IgG₃/ IgG₅/ IgG₆) fluctúan en valores inferiores (McGuire y col., 1971; McGuire, 1986; O'Rourke y col., 1989; Hammond y col., 1997; Hammond y col., 2000).

Durante la etapa crónica los LB aumentan y a partir del 2º al 3º mes de infección, sintetizan principalmente anticuerpos neutralizantes de las cepas virales del primer pico virémico, por lo que las nuevas cepas no llegan a ser neutralizadas por estos anticuepos. En general, numerosos estudios efectuados durante la etapa crónica sostienen que se establecería una respuesta inmune celular robusta conjuntamente con una elevada tasa de anticuerpos neutralizantes capaces de controlar la replicación viral (Montelaro y col., 1984^b; O'Rourke y col., 1988; O'Rourke y col., 1989; McGuire, 1997, Hammond y col., 1997; Hammond y col., 2000; Leroux y col., 2004; Sponseller y col., 2007).

Mealey y colaboradores observaron que, en animales con evolución no progresiva, los LTc de memoria reconocen, con elevada avidéz, epitopes constantes pertenecientes a las proteínas Rev, en tanto que los animales con evolución progresiva, con picos virémicos importantes durante el primer año, cuentan con LTc de memoria de elevada avidéz hacia el PND de la gp90. Esto sugiere que para el control de la replicación viral de los lentivirus, durante la etapa crónica, sería crítico que haya una respuesta citotóxica de memoria capaz de reconocer a epitopes constantes (Mealey y col., 2003). Sin embargo, Hammond y colaboradores observaron que hay animales que, pese a haber tenido una fuerte respuesta citotóxica de memoria anti Gag y anti Env durante los tres años de la experiencia analizada, tuvieron una evolución progresiva de la enfermedad. Esta misma respuesta fue observada en animales con infección de evolución no progresiva, por lo que estos autores no observan correlación entre la evolución de la patología y la respuesta de LTc de memoria (Hammond y col., 2000).

Durante el periodo asintomático y a pesar de que las poblaciones de LB, linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ presentan valores normales, los niveles de

linfoproliferación específica son elevados y fluctuantes de cada animal estudiado, en similitud a lo observado en infecciones con VIH (Banks y Henson, 1973; Svihely y col., 1982; Hammond y col., 1998; Russell y col., 1998; Hammond y col., 2000; Leroux y col., 2004). Ello ocurre en virtud de que habría una continua estimulación antigénica, gracias a la liberación persistente de antígenos virales tanto desde los macrófagos infectados, presentes en nódulos linfáticos, como desde las células macrovasculares renales, reservorios naturales del virus durante esta fase asintomática, donde la replicación viral es mínima o nula (Maury, 1994^a ; Maury y col., 1994^b; Maury y col., 1998; Harrold y col., 2000). Se ha demostrado que animales persistentemente infectados presentan anticuerpos y LTm efectores de por vida, que patrullan los tejidos periféricos, que al ser activadas *in vitro*, con epitopes Gag y/o Pol, secretan en forma inmediata citocinas efectoras, tal como IFN γ (Lonning y col., 1999^a, Fraser y col., 2003), mientras que los LT de memoria central se localizarían principalmente en los órganos linfáticos secundarios, sitios principales de reservorios virales, presentando menor capacidad de proliferación que los LT efectores de memoria (Esser y col., 2003; Craigo y col., 2005). Por otra parte, se ha identificado tanto en población equina como humana, la presencia de células CD8⁺ $\alpha\alpha$, precursoras de las poblaciones de LTc de memoria efectora y central, las primeras de vida corta y la segunda de vida larga (Tschetter y col., 1998; Fainboin y Geffner, 2005^c).

Coincidente con la presencia de anticuerpos neutralizantes en animales infectados con el VAIE, durante la fase de portador inaparente, se ha observado una elevada actividad de los LTcm anti Env y anti Gag, aun a los 7 años de infección (Hammond y col., 1998; Hammond y col., 2000; Howe y col., 2005; Chung y col., 2005). Por otra parte, se han definido numerosos epitopes localizados en las proteínas gp90, gp45, p15, p26, Pol y Rev, capaces de ser reconocidos por LTcm (Hammond y col., 1998; Chung y col., 2004; McGuire y col., 2002). Se ha demostrado, mediante ensayos de dilución límite, que por cada millón de células mononucleares de sangre periférica provenientes de equinos infectados durante la etapa de portador asintomático, hay entre 60 a 468 LTc de memoria capaces de reconocer proteínas del virus, de 4 a 286 con especificidad hacia proteínas Env y de 25 a 190 con capacidad para reconocer proteínas Gag. Habría solamente entre 5 a 15 LTcm que reconocerían a un único epitope, Gag 18^a, HPLPNAPLV₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (McGuire y col., 1997; Hammond y col., 1997; Zhang y col., 1998; Zhang y col., 1999).

En resumen, la respuesta inmune humoral y celular que se desencadena a consecuencia de esta infección viral, varía según sea la etapa clínica en curso. Durante la fase aguda los picos febriles y virémico se asocian a una respuesta principalmente citotóxica, capaz de reconocer epitopes variables y constantes de las proteínas del virus. Al no lograr la eliminación del virus durante la fase crónica se ponen en juego mecanismos efectores dados por anticuerpos neutralizantes y LTc, tendientes a eliminar al virus. El VAIE modificará continuamente su composición antigénica de modo de evadir los mecanismos inmunológicos. Ambos, virus y sistema inmune cumplen en parte su cometido en la fase asintomática, por cuanto los mecanismos inmunológicos efectores logran eliminar las cuasiespecies virales ancestrales y mantienen al virus como población viral latente en los reservorios tisulares, sin que éste se replique (Craig y col., 2006). En tanto, la población viral no solo permanecerá sino que evolucionará hacia cuasiespecies virales nuevas en virtud del efecto que ejerce el sistema inmune (Craig y col., 2005; Sponseller y col., 2007). Aún se desconoce cuales son los epitopes T y/o B capaces de generar dicho efecto, de cualquier modo se estima que estarían relacionados con secuencias peptídicas constantes presentes en las proteínas estructurales principales del virión, las glicoproteínas y las de la cápside (Payne y col., 1989; Tagmeyer y col., 2007).

A.5 Control de la patología.

Hasta el presente, dado que no se aplican vacunas que confieran protección, la única estrategia en el control de esta patología está centrada en la detección de animales infectados y su posterior eliminación, con la consecuente pérdida económica.

Si bien los primeros aislamientos virales fueron hechos en 1904 por Carré y Vallé, recién a partir de 1970 fue posible efectuar el diagnóstico de esta patología en grandes poblaciones equinas, mediante una técnica (Test de Coggins) de inmunodifusión radial doble en gel de agar (AGID). Este test, oficialmente reconocido por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) para el diagnóstico de animales de exportación, permite detectar anticuerpos anti-p26 (Coggins y Patten, 1970; Coggins y Norcross, 1970; Coggins y col., 1972; McGuire, 1977; Leroux y col., 2004). Esta metodología ha sido de gran utilidad en numerosos

países al ser aplicada en los programas de erradicación de AIE (Pearson y Gipson, 1988; Pearson y col., 1971; Coggins y col., 1972; Issel y Cook, 1993, McConnico y col., 2000; Leroux y col., 2004).

Inicialmente los antígenos virales empleados en este test eran extraídos de bazos equinos provenientes de animales infectados y, años más tarde, a partir de extractos proteicos obtenidos de cultivos leucocitarios infectados *in vitro* (Nakajima y Ushimi, 1970; Norcross y Coggins, 1971; Pauli y col., 1982; Issel y Cook, 1993). Luego, con el advenimiento de la producción de proteínas recombinantes se produjo una proteína p26 recombinante, reconocida por anticuerpos de animales infectados con cepas virales heterólogas (Sentsui y col., 2001; Rosati y col., 2004; Alvarez y col., 2007; Piza y col., 2007).

A pesar de la utilidad que ha tenido hasta el presente el Test de Coggins, éste tiene las limitaciones propias de todo método de inmunoprecipitación dando falsos resultados negativos durante los primeros 20 a 25 días de infección aguda debido a la baja tasa de anticuerpos precipitantes presentes. A consecuencia de ello, animales altamente infectivos continúan en convivencia con los sanos. Por otra parte, puede proporcionar resultados positivos de dudosa interpretación en aquellos animales recién nacidos por la presencia de anticuerpos calostrales provenientes de yeguas infectadas (Issel y Cook, 1993). Además, al obtenerse los resultados a las 48 horas de haberse realizado el Test, obliga a mantener preventivamente aislados a los animales durante ese tiempo.

Con el advenimiento de las técnicas de ELISA, en la década del 80, se diseñó un inmunoensayo competitivo, denominado CELISA, que detecta antígenos capsídicos y/o anticuerpos anti-p26 con mayor sensibilidad analítica que el Test de Coggins y que además, permite tener resultados a las dos horas de haberse extraído la muestra (Matsushita y col. 1989). Si bien la técnica CELISA presenta muy buena correlación con el Test de Coggins, habrá datos discordantes entre ambos en virtud de la mayor sensibilidad analítica del primero. A pesar de la elevada sensibilidad que presenta esta metodología, tiene la desventaja de detectar, en equinos convivientes con animales infectados con otros lentivirus (VIB, VAEC), anticuerpos con especificidad para regiones compartidas (MHR) entre estos lentivirus, siendo por tanto, una metodología de baja especificidad (Suzuki y col., 1982; Pearson y Gibson, 1988; Issel y Cook, 1993; Burroughs Tencza y col., 2000; Pare y Simard, 2004).

A los efectos de poder resolver el diagnóstico en aquellos animales con resultados serológicos ambiguos, se podría recurrir a la técnica de Western Blot. Esta permite detectar no solo anticuerpos anti-p26 sino anticuerpos anti-gp90 y gp45, de aparición más temprana y con especificidad hacia determinantes grupo-específicos. Sin embargo, su aplicación es dificultosa cuando se tiene que analizar gran número de muestras. Esto ha llevado al desarrollo de numerosos métodos de ELISA que emplean antígenos proteicos, péptidos sintéticos y/o proteínas recombinantes, permitiendo así detectar por ejemplo, anticuerpos anti-p26 y/o -gp90 y/o -gp45 (Chong y col., 1991^a; Burki y col., 1992; Lew y col., 1993; Issel y Cook, 1993; Ball y col., 1994; Pare y Simard, 2004; Jin y col., 2004). Si bien ha quedado demostrada la eficacia de esta metodología, en especial cuando se emplean distintos antígenos en un mismo ensayo, todos los resultados deben ser confirmados por el Test de Coggins, en virtud de la reglamentación vigente en nuestro país (Boletín Oficial, Res. 617/2005).

Con la finalidad de simplificar la metodología a emplear, sin perder calidad diagnóstica, últimamente Burroughs Tenaza y colaboradores han desarrollado un método analítico basado en el principio de fluorescencia polarizada que emplea como antígenos moléculas pequeñas tales como péptidos sintéticos. Esta metodología presenta la ventaja de poder realizarse *in situ*, ya que utiliza un polarímetro portátil. En efecto, la detección de anticuerpos anti-gp45 se realiza entre 5 a 20 minutos con una sensibilidad diagnóstica de un 89,4% y una especificidad del 100% respecto del Test de Coggins. Si bien esta metodología es prometedora como método "screening", aun resulta costosa ya que se debería disponer de tantos electrodos como antígenos se quieran emplear (Burroughs Tencza y col., 2000).

Los métodos serológicos permiten evaluar la presencia viral indirectamente mediante la detección de anticuerpos producidos en respuesta a la infección. Los métodos directos, que ponen en evidencia la presencia viral, son de utilidad en casos donde los resultados serológicos son discordantes o de difícil interpretación. Una de estas metodologías, éticamente objetable, sería infectar experimentalmente animales sanos, con sangre de equinos infectados, o la otra realizar el aislamiento viral, metodología tediosa y no siempre exitosa, en especial en animales persistentemente infectados (Nagarajan y Simard, 2001).

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular, PCR, RT-PCR y/o nested-PCR, numerosos autores han logrado detectar y cuantificar RNA viral en plasma de animales recientemente o persistentemente infectados, así como determinar DNAv integrado como provirus en monocitos/macrófagos (Rice y col., 1989; O'Rourke y col., 1991; Kim y Casey, 1992; Langemeier y col., 1996; Desmettre, 1999; Nagarajan y Simard, 2001; Cook y col., 2002; Spyrou y col., 2003; Spyrou y col., 2005; Quinlinvan y col., 2007). Si bien éstas son técnicas que logran poner en evidencia al virus en distintas fases de la patología aun en ausencia de anticuerpos, presentan ciertas limitaciones. Una de ellas sería la selección de los "primers", que se torna dificultosa debido a la variabilidad de cepas salvajes (Nagarajan y Simard, 2001). Por otra parte, la baja replicación viral no permitiría la detección de RNAv plasmático en animales con infecciones subclínicas (Oaks y col., 1998). A pesar de estas limitaciones, estas técnicas de genética molecular serían de gran utilidad para la genotipificación de las cepas salvajes, en el seguimiento de las infecciones virales experimentales, así como en los casos donde la presencia de los anticuerpos calostrales altere los resultados de los métodos serológicos (Langemeier y col., 1996; McConnico y col., 2000; Nagarajan y Simard, 2001).

Si bien es amplia la oferta tecnológica disponible para un buen diagnóstico es cierto que, para erradicar esta patología, se debería disponer de una vacuna segura que no solo confiera protección, sino que además permita distinguir animales vacunados de infectados. Dada la habilidad que tiene el sistema inmune en controlar la replicación viral esta vacuna debería evitar que el animal infectado desarrolle la enfermedad (Leroux y col., 2004).

El desarrollo de la primera vacuna contra el VAIE, realizado en China durante la década del 70, se basó en el empleo de virus atenuados por pasajes sucesivos de una cepa viral en cultivos primarios de leucocitos de burros. Esto permite mantener su inmunogenicidad y no su infectividad (Shen y col., 1979; Shen y Weng, 1985; Shen y Wang, 2006; Zhang y col., 2007). El empleo de esta primera vacuna permitió que el 85% de los animales vacunados no desarrollaran la enfermedad al ser desafiados con cepas patógenas. Además, luego de ser aplicada en 500 animales, no se produjo reversión de las cepas atenuadas hacia cepas patogénicas. Estos resultados condujeron a que esta vacuna fuera aplicada en China desde 1978 y actualmente también sea aplicada en la población equina de Cuba (Shen y col., 1979; Shen y Wang, 1985; Shen y col., 2006).

Esta no fue aplicada en el resto de los países afectados debido a que presenta el inconveniente de no poder diferenciar entre animales vacunados de infectados, y por el temor de que el virus pueda revertirse a una cepa virulenta (Issel y Cook, 1993).

A comienzo de la década del 90 se ha evaluado la eficacia de diferentes vacunas, las preparadas con virus inactivados, las enriquecidas con glicoproteínas purificadas o bien con proteínas recombinantes. La primera confirió protección al desafío con cepas homólogas, no así con cepas heterólogas, en tanto que las vacunas con las proteínas purificadas o recombinantes (gp 90/45), no solo no confirieron protección al desafío con cepas homólogas ni heterólogas, sino que además fueron capaces de exacerbar la enfermedad debido a que los anticuerpos generados facilitaban la entrada del virus a los monocitos/ macrófagos mediante la interacción con los receptores Fc y/o receptores del Complemento (Issel y col., 1992; Raabe y col., 1998^a; Raabe y col., 1999; Takada y Kawaoka, 2003).

Otras estrategias de vacunación fueron las que emplearon antígenos fácilmente fagocitados para inducir una fuerte respuesta celular citotóxica. Esta estrategia fue empleada por Hammond y colaboradores, quienes prepararon una vacuna particulada utilizando material vírico purificado acomplejado con microesferas de óxido de hierro. Si bien los animales vacunados y desafiados presentaron una menor carga viral y sus síntomas fueron menores que los animales solamente desafiados con cepas patógenas, no se encontró que esta vacuna fuera capaz de generar una fuerte respuesta citotóxica, tal como se esperaba (Hammond y col., 1999^{a/b}).

Hasta el presente, son numerosos los trabajos que han demostrado la capacidad que tienen los péptidos sintéticos para inducir una respuesta inmune protectora frente a infecciones virales, bacterianas y parasitarias que afectan tanto a la población humana como animal (Boudet y col, 1991; Tabatabai y Pugh, 1994; Langeveld y col., 1994; Brown, 1994^{a/b}; Obeid y col., 1995; Nehete y col., 1995; Robinson y col., 1995; Ben-Yididia y Arnon, 1997, Carver y col., 1997; Ohishi y col., 1997; Van Regenmortel y col., 1998; Muller y col., 1998; Pinto y col., 1999; Lanier y col., 2000; Garcia y col., 2000; Wang y col., 2002; Huerta y col., 2002; Herrera y col., 2004; Jiang y col., 2006). Particularmente en AIE se han evaluado dos vacunas que emplean lipopéptidos. Una de ellas fue preparada con tres lipopéptidos, dos péptidos sintéticos correspondientes a la proteína p26 (HPLPNAPLV)₍₂₀₉₋₂₁₇₎ y (GTTKQKMML)₍₂₄₆₋

254) y uno correspondiente a la proteína gp90: Env SU (RVEDVTNTAEYW)₍₁₉₅₋₂₀₆₎. Estos lipopéptidos sintéticos fueron capaces de estimular *in vitro*, linfocitos equinos ELA-A. Si bien esta vacuna no confirió protección cuando los animales fueron desafiados con la cepa patogénica VAIE PV, estos animales tuvieron síntomas menos severos que los animales desafiados y no vacunados (Ridgely y McGuire, 2002; Ridgely y col., 2003). La segunda vacuna fue construida con dos lipopéptidos, correspondientes a la proteína p26, denominados Gag 221-245 (QGPIPMSTARFIRGLGVPRERQMEPA) y Gag 250-269 (RQTYRQWIIIEAMSEGIKVM I), y con el correspondiente a un péptido presente en la enzima transcriptasa reversa, denominado Pol 326-347 (LPQGFVLSPYTYQKTLQILQP), definidos como epitopes LTh y/o LTc. Si bien los animales vacunados fueron capaces de desarrollar respuestas linfoproliferativas *in vitro*, todos los animales vacunados y desafiados infectaron y, al no controlar la carga viral, enfermaron (Fraser y col., 2003; Fraser y col., 2005).

Recientemente, con el advenimiento de las técnicas de ingeniería genética, se ha desarrollado una vacuna basada en la construcción de un provirus (EIAVUKDelta S2) que tiene la particularidad de presentar una mutación en el gen ORF S2 eliminando la expresión de esta proteína y con ello su capacidad infectiva. Esta vacuna no solo ha conferido protección a los animales vacunados y desafiados con cepas patógenas homólogas, sino que también permite distinguir animales vacunados de infectados. Esto es posible empleando un ELISA que detecte anticuerpos anti-S2, como marcador solamente de infección, ya que es la única proteína contra la cual no se generaran anticuerpos en los animales vacunados. Si bien aún no se ha demostrado la protección contra cepas heterológicas, se determinó que el 50% de los animales vacunados e inmunosuprimidos, no desarrollaron evidencias clínicas de esta patología a los 14 días después de haber sido desafiados (Li y col., 2003, Leroux y col., 2004; Jin y col., 2004; Craigo y col., 2007^b).

Por otra parte, Cook y colaboradores, desarrollaron otra vacuna a DNA (SYNSU) constituida por genes sintéticos virales que codifican para la glicoproteína gp90 y con elevada capacidad de expresión en células de mamíferos. Si bien esta vacuna generó una importante inmunidad celular y humoral en animales vacunados, fue incapaz de conferir protección contra la cepa virulenta (Cook y col., 2005).

En virtud de lo expuesto si bien se cuenta con diferentes estrategias que podrían conducir al desarrollo de una vacuna efectiva, aún no se ha resuelto, por ejemplo, si el nivel de protección conduciría a evitar infección y/o enfermedad, o bien cómo se podría prevenir la transmisión viral. Avanzar en profundizar el conocimiento resolviendo algunos de estos interrogantes mediante el análisis de la capacidad inmunogénica de epitopes virales conservados y adecuar aun más aquellos protocolos de inmunizaciones promisorios, no solo se estaría avanzando en el control de esta patología, sino que además se aportarían datos relevantes para el desarrollo de vacunas a ser aplicadas en aquellas patologías causadas por otros lentivirus (Craig y col., 2007^a).

B. Objetivos

B.1 Objetivo General.

Analizar el carácter antigénico e inmunogénico de péptidos sintéticos que representan epitopes altamente conservados de las glicoproteínas de membrana, gp 90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ y gp 45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y de la nucleocápside p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, del virus de la Anemia Infecciosa Equina, a los efectos de diseñar, en un futuro, una vacuna que confiera una efectiva protección al huésped.

B.2 Objetivos Parciales.

- Evaluar el carácter antigénico de cada los péptidos sintéticos, analizando la capacidad de ser reconocidos tanto por anticuerpos como por linfocitos provenientes de equinos naturalmente infectados con el VAIE.

- Evaluar la capacidad inmunogénica de cada uno de los péptidos sintéticos, en ratones BALB/c.

C. Materiales y Métodos

C.1 Soluciones.

C.1.1 Soluciones salinas.

- **PBS 20X:**
 - Cloruro de sodio (Merck) 172 g
 - Fosfato monoácido de sodio (Merck) 44 g
 - Fosfato diácido de sodio (Carlo Erba) 3,2 g
 - Agua bidestilada 850 ml
 - Ajustar a pH a 7,2 - 7,4
 - Agua destilada c.s.p. 1000 ml

- **PBS-T:**
 - PBS 20x 50 ml
 - Tween 20 (Sigma) 250 μ l
 - Agua bidestilada c.s.p. 1000 ml

- **TAE 50x:**
 - Trizma base (Sigma) 24,22 g
 - EDTA (Sigma) 3,72 g
 - Ácido Acético glacial (Mallinckrodt) 4 ml
 - Agua bidestilada 60 ml
 - Ajustar a pH a 8 con ácido acético glacial
 - Agua bidestilada c.s.p. 100 ml

- **TBS 10x:**
 - Trizma base (Sigma) 12,2 g
 - Cloruro de sodio (Merck) 16 g
 - Cloruro de Potasio (Merk) 0,4 g
 - Agua bidestilada 160 ml
 - Ajustar a pH 7,4 con ácido clorhídrico 1N
 - Agua bidestilada c.s.p. 500 ml

- **TBS-T:**
 - TBS 10x 50 ml
 - Tween 20 (Sigma) 500 μ l
 - Agua bidestilada 400 ml
 - Ajustar a pH a 7,0
 - Agua destilada c.s.p. 500 ml

- **“Buffer” Cítrato/Acetato 0.1 M pH 5,5:**
 - Acetato de sodio (Anedra) 3,4 g
 - Agua bidestilada 200 ml
 - Àcido cítrico 1 M 1 ml
 - Ajustar a pH a 5,5 con ácido cítrico 1 M
 - Agua destilada c.s.p. 250 ml

○	“Buffer” fosfatasa alcalina:	
▪	Trizma base (Sigma)	6 g
▪	Agua bidestilada	400 ml
▪	Acido clorhidrico 1N	500 µl
▪	Cloruro de sodio (Merck)	2,9 g
▪	Cloruro de magnesio 150 mM	16,66 ml
▪	Agua bidestilada	400 ml
	Ajustar a pH a 9,5	
▪	Agua bidestilada c.s.p.	500 ml

C.1.2 Reactivos para reacciones enzimáticas.

○	TMB 50x:	
▪	3-3',5-5' tetrametilbencidina (Sigma)	5 mg
▪	Dimetilsulfóxido (Sigma)	1 ml
○	BCIP 60 mg/ml:	
▪	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina (Sigma)	60 mg
▪	Dimetilformamida (Sigma)	1 ml
○	MTT 50mg/ml:	
▪	3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazolium Br (Sigma)	50 mg
▪	Dimetilformamida (Sigma)	700 µl
▪	Agua bidestilada c.s.p.	1 ml
○	NBT 314x:	
▪	Nitroblue tetrazolium (Sigma)	20 mg
▪	Dimetilsulfóxido (Sigma)	280 µl
▪	Agua bidestilada	120 µl

C.1.3 Solución fenólica saturada en Tris-HCl 0,1M (pH 8,5):

▪	Fenol (Merck)	1000 g
▪	8-Hidroxiquinoleína (Mallinckrod)	10 g
▪	Tris- HCl 0,5 M (pH 8,5)	

Procedimiento: A un volumen de fenol líquido (68°C) se le añadió un volumen de Tris- HCl 0,5 M pH 8,5. Luego de agitar 15 minutos, la fase acuosa superior fue separada a efectos de agregar igual volumen de una solución de Tris- HCl 0,1 M (pH 8,5). La mezcla fue agitada nuevamente durante 15 minutos y la fase acuosa retirada para medir el pH. Se agregó igual volumen de una solución de Tris-HCl (pH 8,5). Este procedimiento fue realizado hasta que la fase acuosa tuvo un pH superior a 8,0. Se conservó en frasco color caramelo a 4°C.

C.1.4 Medios de cultivos y aditivos.

○	Medio de cultivo RPMI 1640:	
▪	RPMI-1640 (Gibco)	10,40 g
▪	Bicarbonato de sodio (Merck)	2,0 g
▪	Agua destilada libre de DNAsas, RNAsas (Gibco)	900 ml
	Ajustar a pH a 7,2- 7,4 con HCl 2N.	
▪	Agua destilada libre de DNAsas, RNAsas (Gibco) c.s.p.	1000 ml
	Esterilizar por filtración a través de membrana de 0,2 µm (Millipore).	

- **Piruvato 50x:**
 - Piruvato de sodio (Gibco) 275 mg
 - Agua destilada libre de DNAsas, RNAsas (Gibco) 50 ml

Esterilizar por filtración a través de membrana de 0,2 μ m (Millipore)
- **Glutamina (24 g/l):**
 - L- Glutamina (Gibco) 1200 mg
 - Agua destilada libre de DNAsas, RNAsas (Gibco) 50 ml

Esterilizar por filtración a través de membrana de 0,2 μ m (Millipore)
- **Penicilina G sódica (300 UI/ml):**
 - Penicilina G sódica (Lab. Ritchet) 3.000.000 UI
 - Agua destilada libre de DNAsas, RNAsas (Gibco) 50 ml
- **Estreptomicina (10 mg/ml):**
 - Sulfato de estreptomicina (Lab. Ritchet) 1 g
 - Agua destilada libre de DNAsas, RNAsas (Gibco) 100 ml

Todos los reactivos y drogas utilizados en el presente trabajo de Tesis fueron de calidad p.a. o calidad biología molecular.

C.2 Péptidos sintéticos.

C.2.1 Descripción de los péptidos sintéticos.

Se emplearon tres péptidos sintéticos identificados como gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, correspondientes a regiones conservadas de las respectivas proteínas virales nativas.

El primero, gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, es un péptido sintético lineal, formado por 29 residuos aminoacídicos, análogo al extremo C- terminal de la glicoproteína gp90 del VAIE, cuya secuencia corresponde a la región aminoacídica ETWKLVKTSQVTPLPISSEANTGLIRHKR₍₄₁₆₋₄₄₄₎, de la cepa viral 1369 (Genpept accession P11306).

El segundo, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎, es un péptido sintético cíclico, de 25 residuos aminoacídicos, análogo a la región de la glicoproteína gp45 del VAIE, ubicada entre los aa 522 y 546, ERQQVEETFNLIGCIERTHVFCHTG, de la cepa viral 1369 (Genpept accession P11306).

El tercero, p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, es un péptido sintético cíclico, constituido por 29 residuos aminoacídicos, análogo a la región de la proteína p26 del VAIE, presente en la región 318-346 aa, ANEECRNAMRHLRPEDTLEEKMYACRDIG. (Genpept accesión AAD 49417).

Los tres péptidos empleados fueron sintetizados manualmente por el método del 9- fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) en fase sólida y purificados por HPLC en fase reversa, en el Laboratorio de Péptidos Bioactivos del

Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (Atherton y Sheppard, 1989; Fields y Noble, 1990). Una vez obtenidos los péptidos, con un grado de pureza mayor al 90%, fueron liofilizados.

La ciclización intramolecular, mediante enlaces disulfuro de los péptidos gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, se realizó por oxidación al aire, empleando una solución de péptido (0,1 mg/ml) disuelto en buffer de bicarbonato de amonio 0.03M, pH 7,9. El tiempo óptimo para la ciclización de cada péptido se determinó por HPLC y mediante la detección de grupos -SH libres con el reactivo de Ellman (Ellman y col., 1959).

Los péptidos fueron caracterizados por espectrometría de masas a fin de determinar la homogeneidad del producto y evaluar la presencia/ausencia de grupos protectores en el producto de síntesis, por comparación entre los pesos moleculares teóricos calculados y los obtenidos por espectrometría de masas. Estos análisis fueron realizados en el Instituto LANAIS-EMAR, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FASB-MS) y en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona, España.

C.2.2 Bibliotecas peptídicas de las proteínas gp90 y p26, sobre membranas de celulosa (método Spot).

Se trabajó con 4 membranas de celulosa, tres de ellas fueron preparadas en el laboratorio del Dr. Ronald Frank, del Departamento de Química Biológica del Centro Helmholtz de Investigaciones Infecciosas, Alemania, en el marco del Proyecto de colaboración con el Departamento de Química Orgánica, de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (Frank, 1992; 1993; 2002; Frank y Overwin, 1996). Dos de estas membranas corresponden a la biblioteca peptídica de la proteína gp90 (Genpept accession P11306) y las otras dos corresponden a la proteína p26 (Genpept accession AAD 49417). Cada spot contiene aproximadamente 1 nmol de péptido.

Los péptidos fueron simultáneamente sintetizados mediante el método Spot, sobre membranas de celulosa derivatizadas con el espaciador β -Ala- β -

Ala para la preparación de péptidos inmovilizados. El ensamblaje de los péptidos se realizó utilizando la química del 9-fluorenilmetoxicarbonilo siguiendo los protocolos descritos en la bibliografía (Frank, 1992; Frank y Overwin, 1996). Se emplearon soluciones 0,2 M de los aminoácidos protegidos disueltos en N-metilpirrolidona y la activación se realizó “*in situ*” mediante disopropilcarbodiimida (DICD) para formar los ésteres del 1-hidroxibenzotriazol. Para el seguimiento de las reacciones de acoplamiento se utilizó el ensayo de azul de bromofenol mediante la observación del cambio de color del azul al amarillo (Krchnák y col., 1988). Finalmente las secuencias N-acetiladas se desprotegeron con ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano con 3% del triisobutilsilano (TIS) y 2% de agua como agentes de captura de intermediarios reactivos, durante una hora (Frank, 1993;2002)

C.2.2.a) Bibliotecas peptídicas de la proteína de superficie (gp90).

1- Se sintetizaron en forma automática (método spot), sobre 144 spots, los péptidos sintéticos de 15 residuos aminoacídicos, 12 solapados con las secuencias peptídicas presentes en los spots adyacentes. El spot 1 tiene la secuencia peptídica de los primeros 15 residuos aminoacídicos pertenecientes al extremo N- terminal, en tanto que la secuencia presente en el spot 144 corresponde a los últimos 15 residuos aminoacídicos del extremo C- terminal de la proteína. La membrana abarca la secuencia completa de la proteína.

2- Se sintetizó automáticamente, sobre 125 spots, la región 417-444 de la proteína gp90, para medir el/los epitopes mínimos dentro del extremo C-terminal (417-444). Los primeros 18 spots presentan péptidos de 6 residuos aminoacídicos, solapados en 5 con los adyacentes; los 18 siguientes son de 7 residuos y solapados en 6; luego 18 de 8 residuos solapados en 7; los 18 spots siguientes de 9 residuos con solapamiento de 8; 18 spots siguientes de 10 residuos con solapamiento de 9 aa; 18 de 11 residuos con solapamiento de 10 y finalmente 17 de 12 residuos con solapamiento de 11 aa.

C.2.2.b) Bibliotecas peptídicas de la proteína de la cápside (p26).

1- Se sintetizó automáticamente, sobre 75 spots, péptidos sintéticos de 15 residuos aminoacídicos, solapados en 12 aa de cada spot siguiente. El spot 1 tiene los primeros 15 residuos del extremo N- terminal. La membrana abarca la secuencia completa de la proteína.

2- Se sintetizó manualmente, sobre 78 spots, peptidos sintéticos de 6 residuos aminoacídicos, solapados en 5 aa con los spots adyacentes. Esta membrana fue sintetizada en el Laboratorio de Péptidos Bioactivos del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. La secuencia abarca la región 277-359 correspondiente al extremo C-terminal de la proteína.

C.3 Animales.

C.3.1 Equinos.

Se emplearon equinos criollos adultos (n=256), de ambos sexos, 192 correspondientes a los animales examinados en el Plan de Control Voluntario de Anemia Infecciosa Equina, de la Provincia de Santa Fe. Los 64 animales restantes pertenecen a 5 establecimientos ganaderos ubicados en los departamentos de San Cristóbal, San Javier y de La Capital de la Provincia, seleccionados según prevalencia y antecedentes sanitarios de AIE, estudiados durante el periodo 2004-2006.

Los antecedentes sanitarios de los 5 establecimientos evaluados fueron:

- *Establecimiento "A"*: Establecimiento ganadero ubicado en el Departamento San Cristóbal. Equinos adultos Pura Sangre, con Test de Coggins negativos durante los últimos 10 años y 30 días posteriores a la extracción de las muestras (n=13).
- *Establecimiento "B"*: Establecimiento ganadero ubicado en Curupaity, en el Departamento San Cristóbal. Equinos adultos criollos, con Test de Coggins positivo en 3 animales convivientes, durante mas de 5 años, con el resto de los equinos serológicamente negativos (n=11).
- *Establecimiento "C"*: Establecimiento ganadero ubicado en Cayastacito, en el Departamento San Javier. Equinos adultos criollos dedicados a tareas rurales, con Test de Coggins positivo en 7 animales convivientes con el resto de los equinos serológicamente negativos (n= 11).
- *Establecimiento "D"*: Establecimiento ganadero ubicado en Cayastacito, en el Departamento San Javier. Equinos adultos criollos dedicados a tareas rurales, con Test de Coggins positivo en 4 animales convivientes, durante mas de 5 años, con el resto de los equinos serológicamente negativos (n=12).

- **Establecimiento “E”:** Establecimiento ganadero ubicado en el Departamento La Capital. Equinos adultos criollos dedicados a tareas rurales, con Test de Coggins positivo en 11 animales convivientes, durante mas de 5 años, con el resto de los equinos serológicamente negativos (n=17).

En todos estos animales se extrajo, por punción de la vena yugular, sangre con y sin anticoagulante. El suero obtenido fue conservado a -20°C hasta su utilización. A partir de sangre desfibrinada, se separaron las células mononucleares para emplearlas en los ensayos de linfoproliferación. Cuando éstos no fueron realizados inmediatamente, las células fueron conservadas a -180°C , en tanque de nitrógeno líquido.

C.3.2 Ratones BALB/c.

Se emplearon ratones hembras BALB/c (n=45), endocriadas, de 2 a 3 meses de edad alimentadas “*ad limitum*” y mantenidas en condiciones apropiadas de luz y temperatura.

C.4 Planes de inmunización en ratones BALB/c.

C.4.1 Preparación del inmunógeno.

Se preparó una solución concentrada de cada péptido (1mg/ml), gp 90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ o p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, en medio RPMI 1640, según Elliot y Van Regenmortel (Elliot y col., 1999; Van Regenmortel y col, 1999). Para ello, se disolvieron 6,5 mg en 6,5 ml de medio y se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente, durante 1 hora. Esta solución se esterilizó mediante filtración, bajo campana de flujo laminar, empleando una membrana Millipore de 0,2 μm . La solución estéril se distribuyó en lotes de 850 μl , 100 μg péptido/ 100 μl , y fue conservada a -20°C .

Previo a cada inoculación, se prepararon tres emulsiones para inyectar 200 μl por animal, vía subcutánea, en sus patas traseras.

- Inóculo grupo control (0 μg péptido/ animal): Se emulsionaron 700 μl de medio RPMI 1640 con 700 μl de Adyuvante Completo de Freund (ACF).
- Inóculo grupo 2 (20 μg péptido/ animal): Se disolvieron 140 μl de la solución del péptido (100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) en 560 μl de RPMI 1640, emulsionándose con 700 μl de ACF.

- Inóculo grupo 3 (100 µg péptido/ animal): Se emulsionaron 700 µl de la solución del péptido (100 µg/100 µl) con 700 µl de ACF.

C.4.2 Protocolo de inmunización.

Los animales se organizaron de la siguiente manera:

- *Grupo 1 control* (n=5): Inoculados con 0 µg de péptido.
- *Grupo 2* (n=5): Inoculado con 20 µg de péptido.
- *Grupo 3* (n=5): Inoculado con 100 µg de péptido.

Cada animal fue inoculado, cada 15 días y durante 3 meses, con 200 µl de la emulsión preparada según se describiera anteriormente. Los ratones fueron sangrados al inicio del plan de inmunización y a los 7 días posteriores a cada una de ellas. El suero fue conservado a –80°C.

Los ratones inoculados con gp45 y p26 fueron anestesiados y sacrificados, por dislocación cervical, a los 7 días posteriores a la última inoculación, a efectos de realizar una esplenectomía para obtener las células mononucleares, parte de las cuales fueron empleadas para los ensayos de linfoproliferación y el resto conservadas a – 180°C, en nitrógeno líquido.

C.5 Test de Coggins.

C.5.1 Antígeno de Coggins.

C.5.1 a) Obtención y purificación.

El antígeno de Coggins fue obtenido aplicando la metodología descrita por Coggins y modificada por Pauli y colaboradores, a partir del bazo de un animal previamente infectado experimentalmente con el VAIE (cepa Wyoming, Alfort, Francia) (Coggins y col., 1972, Pauli y col., 1982).

Para ello, se trituraron y maceraron 100 g de pulpa esplénica con 100 ml de PBS pH 7,2, congelándose a -70 ° C y descongelándose, 5 veces. Luego de haber centrifugado a 10.000 g durante 30 minutos a 4° C, se separó el primer sobrenadante y al sedimento se le añadieron 50 ml de PBS, sometándose nuevamente a 3 procesos de congelamiento y descongelamiento. Luego de centrifugar, se separó el sobrenadante, el que fue agregado al sobrenadante anterior. Las proteínas fueron precipitadas con una solución saturada de SO₄(NH₄)₂. Luego de dejar reposar durante 2 horas a 4°C, se centrifugó a 4° C, durante 20 minutos a 10.000 g, descartando el

sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en un tercio del volumen inicial. Se dializó contra PBS durante 48 hs, en agitación a 4°C, con cambio de líquido de diálisis (PBS) cada 24 horas. Posteriormente se dializó contra buffer acetato de sodio - ácido acético 0.01 M pH 5. Se centrifugó a 15000 g durante 30 minutos a 4° C, se recogió el sobrenadante y se concentró con carbowax hasta un volumen aproximado de 5 ml. Se le agregó Tritón 0,1% y 0,01% de azida sódica.

La antigenicidad fue evaluada mediante el Test de Coggins y se cuantificaron las proteínas totales mediante el método de Bradford (Margni, 1996^a; Coggins y col., 1972; Bradford, 1976).

Método Bradford: Para tal fin se añadieron a 10 µl de muestra 300 µl del reactivo de Bradford [10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 2,5 ml etanol 95%, 10 ml ácido fosfórico 85%, agua bidestilada en csp 100 ml]. Luego de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, el color desarrollado fue leído a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 530. La curva de calibrado fue construida con concentraciones comprendidas entre 0,1 y 0,35 mg/ ml de una solución de albúmina bovina sérica (BSA) (Sigma) (Bradford, 1976).

C.5.1 b) Fraccionamiento, transferencia y evaluación de las proteínas obtenidas.

SDS- PAGE: El fraccionamiento proteico fue realizado mediante SDS-PAGE. Para ello, las proteínas obtenidas en el ítem anterior fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida. A tal efecto se armaron dos geles, cada uno entre dos placas de vidrio (8,3 cm x 10,2 cm), sobre un soporte vertical, de modo que quede entre las dos placas un espacio de 1 mm perfectamente sellado por sus bordes laterales e inferior. Luego de colocarse los peines, se cargaron, hasta dos milímetros por debajo de los mismos, con el gel de separación Acrilamida/Bisacrilamida (12%) [1,6 ml agua destilada; 2 ml Acrilamida/Bisacrilamida 30%; 1,25 ml Tris-HCl 1,5 M pH 6,8; 50 µl SDS 10%; 50 µl Persulfato de amonio 10%; 2,5 µl TEMED]. Posteriormente se colocó el gel de apilamiento Acrilamida/Bisacrilamida (5%) [1,7 ml agua destilada; 415 µ Acrilamida/Bisacrilamida 30%; 315 µ Tris-HCl 1,5 M pH 6,8; 12,5 µl SDS 10%; 25 µl Persulfato de amonio 10%; 2,5 µl TEMED]. Una vez gelificado se retiraron los peines y se armó la cuba para realizar la corrida electroforética.

Para ello se introdujeron las placas en el reservorio correspondiente, con su borde inferior en el extremo anódico. Luego se resuspendieron 15 μ l (4 μ g/ μ l) de cada muestra en 5 μ l del buffer de siembra [1 ml Tris-HCl 1M pH 6,8; 0,8 ml glicerina, 160 mg SDS, 0,4 ml β -mercaptoetanol, 0,2 ml azul de bromofenol 0,05%, 4 ml agua bidestilada]. En forma paralela se resuspendieron 5 μ l del marcador de peso molecular (rango 97- 14 kDa) en 10 μ l de buffer de siembra, por pocillo. Tanto las muestras como el marcador de peso molecular se calentaron a 100°C durante 3 minutos y se sembraron 20 μ l en los pocillos correspondientes. Luego se cargó el reservorio con el buffer de corrida Tris-Glicina pH 7,4 [3 g Trizma base, 14,4 g glicina, 1 g SDS, 1000 ml agua destilada] y se completó con buffer de separación la cámara entre los dos geles. Las muestras y el marcador de peso molecular fueron corridas a 200 Volt 65 mA hasta que el frente de corrida superó las $\frac{3}{4}$ partes del gel. Uno de los geles se coloreó con una solución de Coomassie Blue G250 al 0.5%, decolorándose con agua corriente y finalmente con solución decolorante [7,5 % Acido Acético y 5% metanol]. El gel restante fue empleado para transferir las distintas fracciones proteicas a una membrana de nitrocelulosa mediante el paso de corriente eléctrica a pH alto (Margni, 1996°).

Transferencia: Para ello, una vez humectado en buffer de transferencia [Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3] la hoja de nitrocelulosa como las 4 hojas de papel de filtro y las almohadillas a utilizar, cada gel fue colocado entre los papeles de filtro y posteriormente entre dos almohadillas. Esto fue introducido, entre soportes de acrílico, en la cuba electroforética teniendo en cuenta que la membrana quede ubicada en la región anódica. La transferencia, realizada a 180 mA durante una hora, fue verificada mediante coloración con Rojo Ponceau S al 0.2%, preparada en ácido tricloroacético al 3% y ácido sulfosalicílico al 3%. Las membranas fueron conservadas a - 20°C hasta su utilización.

Western Blot: La evaluación de las proteínas transferidas fue realizada aplicando Western Blot. Para ello, las distintas fracciones proteicas del antígeno de Coggins, separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa, fueron bloqueadas con TBS- leche descremada (5%) durante toda la noche a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con TBS-T y se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el suero murino anti-p26, diluido

1/50 en TBS-leche. Luego de tres lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con suero de cabra anti-IgG murina (Jackson) marcada con fosfatasa alcalina, diluido 1/10000 en TBS-T. Luego de tres lavados con TBS-T, se adicionó el reactivo sustrato/cromógeno NBT/BCIP [13,2 μ l NBT 50 mg/ml, 8 μ l BCIP 60 mg/ml en 2 ml de buffer fosfatasa alcalina] y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por lavado con agua destilada.

Determinación de los pesos moleculares relativos: Para tal fin se corrió el marcador de peso molecular y las muestras, según se detallara anteriormente. Luego, las movilidades relativas (Rf) de los polipéptidos presentes en el marcador y de las fracciones proteicas presentes en la muestra, fueron obtenidas aplicando el cociente entre la distancia de migración de la proteína y la del colorante (frente de corrida). Los pesos moleculares relativos de las muestras fueron calculados interpolando los valores de Rf en la ecuación de la recta, obtenida al graficar el logaritmo de los pesos moleculares conocidos versus sus Rf. Las gráficas y sus ecuaciones fueron realizadas en planilla de cálculo Microsoft Excell.

C.5.2 Obtención de gammaglobulina total equina.

Para ello a 10 ml de un suero proveniente de un animal infectado espontáneamente con el VAIE en etapa crónica, se le adicionó en frío, gota a gota, y con agitación, igual volumen de una solución saturada de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Luego de permanecer durante toda la noche a 4° C, el precipitado fue obtenido por centrifugación durante 30 minutos a 10.000 rpm. Luego de redisolverlo en un pequeño volumen de agua bidestilada, se realizó una segunda precipitación con una solución saturada de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 60%. Finalmente el precipitado se resuspendió en 3 ml de agua bidestilada y fue dializado contra solución fisiológica a 4° C, hasta eliminación total del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (Margni, 1996^d). La presencia de anticuerpos específicos anti-virales se detectó mediante el Test de Coggins (Coggins y col., 1972).

C.5.3 Test de Coggins.

A los efectos de detectar anticuerpos específicos para las proteínas de la cápside del virus (p26), se realizó la técnica de doble difusión radial, descrita por Coggins y colaboradores (Coggins y col., 1972). Para ello se prepararon portaobjetos limpios y secos, sobre los cuales se distribuyeron 4,5 ml de una

solución al 1% de agar Noble en buffer de Coggins, pH 8,6 [9 g ácido bórico; 2 g hidróxido de sodio y agua bidestilada en c.s.p. 1000 ml]. Una vez solidificado se practicaron 7 orificios (diámetro: 6 mm), uno central y 6 periféricos, separados a una distancia de 2 mm. El orificio central se sembró con 50 μ l de antígeno (Ag), en tanto que, en sentido horario y pocillo por medio, se sembraron 3 con 50 μ l de una solución de gammaglobulina, extraída de un equino infectado espontáneamente con VAIE (control de referencia positivo) los 3 restantes fueron sembrados con los sueros incógnitas. La incubación se realizó en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 48 hs. Una banda de precipitación indicó la interacción antígeno- anticuerpo.

C.6 Enzimoimmunoensayos (ELISA).

C.6.1 Indirecto no competitivo cualitativo.

La presencia de anticuerpos equinos específicos para el VAIE fue detectada mediante ELISA indirecto no competitivo, según la técnica descrita por Engvall y Perlmann y modificada por Soutullo y colaboradores (Engvall y Perlmann, 1972; Soutullo y col., 2001).

Las microplacas de 96 pocillos, fondo plano (Costar) fueron adsorbidas con cada uno de los péptidos sintéticos, a una concentración de 0.5 μ g/ 200 μ l en “buffer coating” pH 9.6 [0,776 g carbonato de sodio, 1,45 g bicarbonato de sodio, agua bidestilada en c.s.p. 500 ml]. Se incubaron a 37°C durante 3 horas y toda la noche a 4°C. Luego de realizar 5 lavados con agua bidestilada, las placas fueron colocadas a 37°C y posteriormente conservadas a 4 C°.

Para evitar uniones inespecíficas se empleó una solución de bloqueo, preparada con leche descremada, al 5% en una solución de gelatina (Sigma) al 1% en PBS pH 7,4. Por pocillo se colocaron 200 μ l y se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 90 minutos y posteriormente durante toda la noche a 4 °C. Luego de realizar 5 lavados con PBS-T, 100 μ l de cada uno de los sueros (diluidos 1/200 para equinos y diluidos 1/100 para ratones, en PBS-T) fueron añadidos e incubados a 37°C durante una hora en cámara húmeda. Después de realizar los 5 lavados con PBS-T, se procedió a revelar la presencia de anticuerpos IgG específicos empleando un antisuero anti-IgG equino o murino (diluído 1/10000 en PBS-T) conjugado a peroxidasa (Sigma), según

corresponda. Se incubó durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda, efectuándose 5 lavados posteriores con PBS-T.

Para la reacción de coloración final se adicionaron 50 µl de TMB [100 µl TMB 50x, 5 ml “buffer” citrato 0.05 M (pH 5,5), 1µ H₂O₂ 30%]. Las microplacas fueron incubadas a temperatura ambiente al resguardo de la luz, durante 6 minutos. Luego de agregar 50 µl de una solución 1 N de H₂SO₄, se midieron las densidades ópticas a 450 nm en un lector de ELISA marca Multiskan Automatic ELISA Plate Reader (Labsystem). Cada ensayo fue realizado por duplicado efectuándose controles íter- ensayos.

Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de positividad (PP), tomando como 100% un suero de referencia Standard (CPR) de elevada densidad óptica, según la siguiente ecuación (Wright y col., 1993):

$$PP (\%) = 100 \times \left[\frac{DO (\text{muestra}) - DO (\text{SCN})}{DO (\text{CPR}) - DO (\text{SCN})} \right]$$

Donde,

PP: Porcentaje de positividad

CPR (Control Positivo de Referencia):

Para equinos: gammaglobulina equina, obtenida por precipitación salina de un suero proveniente de un equino infectado espontáneamente con el VAIE, en fase crónica, según se detalla en la sección C.5.2 de materiales y métodos.

Para ratones: suero de ratones inoculados con los péptidos gp 90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ ó gp 45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ (título 1/32000), ó p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ (título 1/4000).

SCN (Suero Control Negativo):

Para equinos: Suero proveniente de 30 animales libres del VAIE, verificados por controles periódicos efectuados cada 3 meses durante los últimos 10 años.

Para ratones: Suero de ratones no inoculados con los diferentes péptidos a ensayar.

C.6.2 Indirecto no competitivo semicuantitativo.

Se procedió a semi-cuantificar el nivel de anticuerpos murinos anti péptido, mediante ELISA indirecto no competitivo, según la técnica descripta en el punto C.6.1, y adaptada al sistema murino, para lo cual todos los sueros

fueron diluidos 1/100 en PBS-T. Aquellos sueros con densidades ópticas superiores a la línea de corte, fueron diluidos 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 y 1/32000 en PBS-T. La línea de corte fue establecida como el PP medio del grupo 1, mas 3 veces el valor de la desviación estándar. El título fue considerado como la mayor dilución que presente valores de PP superiores al valor de corte.

Para detectar anticuerpos murinos se empleó suero de conejo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Jackson) (dilución 1/10000 en PBS-T). Los pasos siguientes fueron realizados según lo descrito en el punto C.6.1.

C.6.3 Indirecto no competitivo cuantitativo de captura.

Los niveles séricos murinos de IL-4 e $IFN\gamma$ fueron obtenidos mediante ELISA de captura, siguiendo las recomendaciones del fabricante (R&D Systems), Mouse IL-4 Immunoassay Quantikine #M4000 y Mouse $IFN\gamma$ Immunoassay Quantikine #MIF00, respectivamente.

A tal efecto, las microplacas de poliestireno fueron adsorbidas con anticuerpo monoclonal específico para la interleuquina a dosar. En cada fosa se colocaron 50 μ l del diluyente del ensayo y 50 μ l del control, o sueros incógnitas, o las distintas diluciones de un estándar de concentración establecida para efectuar la curva de calibración (IL-4, $IFN\gamma$). Luego de incubar durante dos horas a temperatura ambiente y lavar 5 veces con una solución tamponada 1x, se incubó dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal específico para la interleuquina, conjugado a peroxidasa (diluido 1/23 en diluyente del conjugado). Luego de haber realizado los 5 lavados, se adicionaron 100 μ l de una solución del sustrato preparada, 15 minutos antes, con volúmenes iguales de los reactivos A y B, suministrados por el fabricante. La reacción se detuvo con el agregado de una solución ácida dejando 30 minutos en cámara húmeda. El color desarrollado, expresado en DO, fue leído a 450 nm en un lector de ELISA marca Multiskan Automatic ELISA Plate Reader (Labsystem) La concentración de la interleuquina presente, expresada en pg/ml, se calculó a partir de una curva de calibrado construida con los datos de densidades ópticas y las concentraciones conocidas de cada dilución, en escala logarítmica. Para ello se realizaron diluciones seriadas al medio con solución diluyente, partiendo de una concentración inicial de 600 pg/ml.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado, a excepción de la curva de calibrado que fue hecha por triplicado. Se consideró como blanco de ensayo a la solución diluyente.

La curva de calibrado de la IL-4 murina fue realizada preparando una solución estándar (500 pg/ml) disolviendo 2,5 ng de IL-4 murina recombinante (R&D System Quantikine M4000B) en 5 ml de diluyente calibrado RD5Y. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas al medio de modo de disponer de las soluciones cuyas concentraciones, expresadas en pg/ml, fueron: 7,8 - 15,6- 31,25- 62,5- 125- 250- 500.

La curva de calibrado para IFN γ se realizó a partir de una solución estándar (3000 pg/ml) preparada con 6 ng IFN γ murino recombinante (R&D System Quantikine M4000B) disueltos en 450 μ l del diluyente de calibrado RD6-12. Para obtener una solución estándar de 600 pg/ml, se realizó una primera dilución con 100 μ l (3000 pg/ml) + 200 μ l diluyente RD6-12. Con ella se prepararon diluciones seriadas al medio de modo de disponer de las siguientes concentraciones, expresadas en pg/ml: 9,4- 18,8- 37,5- 75- 150- 300- 600.

Los datos obtenidos en cada uno de los enzimoimmunoensayos fueron realizados con la planilla de cálculo Microsoft Excell, en tanto que la representación gráfica de los mismos se realizó con el programa Graph Pad, versión 2.00 (Heldens y col., 2002; Matthews y col., 1999).

C.6.4 Indirecto en membranas de celulosa, método spot.

Una vez sintetizadas las secuencias peptídicas sobre membranas de celulosa, tal como se detallara en el ítem C.2.2, las mismas fueron lavadas con 12 ml de TBS pH 7,4 y bloqueadas con 12 ml de "buffer blocking" [40 ml TBS-T pH 8, "Buffer blocking" 50x (Genosys), 2,5 g sacarosa] durante toda la noche, a temperatura ambiente. Luego de lavar con TBS-T pH 7, se incubó con el suero equino control negativo (diluído 1/100 en "buffer blocking"). Luego de incubar durante dos horas a temperatura ambiente y lavar 3 veces con 12 ml de TBS-T pH 7 con agitación permanente, la membrana se incubó con suero policlonal obtenido en conejo y específico para la IgG equina, conjugado a fosfatasa alcalina, diluído en "buffer blocking" según las condiciones que recomienda el fabricante (Sigma) (1/10000). Luego de realizar 4 lavados, dos con TBS-T pH 7 y dos con CBS pH 7 [0,8 g cloruro de sodio, 0,2 g cloruro de potasio, 0,21 g

ácido cítrico, csp 100 agua bidestilada], la presencia de anticuerpos específicos para cada péptido se evidenció al adicionar 10 ml del reactivo color BCIP/MTT [10 ml CBS, 40 μ BCIP 6, 60 mg/ml, 60 μ l MTT 50 mg/ml, 50 μ l cloruro de magnesio 1M], en oscuridad, dejándose hasta 30 minutos. La reacción se detuvo con 10 ml de PBS.

A efectos de ser posteriormente evaluada con "pool" de sueros de equinos infectados con el VAIE, la membrana fue lavada durante 10 minutos: dos veces con agua destilada, dos con 20 ml de dimetil formamida (DMF) y 3 veces con 20 ml de agua destilada. Posteriormente fue tratada, durante 10 minutos, primero con 20 ml de la solución "stripping" A [96,1 g urea, 2 g SDS, 200 μ l β -mercaptoetanol], luego con 20 ml de la solución "stripping" B [20 ml ácido acético glacial, 100 ml etanol absoluto, 80 ml agua bidestilada] y finalmente con 20 ml de etanol p. a. Este procedimiento fue realizado tres veces consecutivas. La membrana fue secada entre hojas de papel secante, con aire frío y conservada a -20°C hasta ser analizada nuevamente frente al pool de sueros equinos Test de Coggins positivo, diluido 1/100 en "buffer blocking", tal como se procedió con el suero equino control negativo (Frank, 2002).

Las imágenes de las membranas fueron digitalizadas y la cuantificación de la intensidad, Valor de Gris (VG), de cada spot fue obtenida empleando el software, versión libre, Image J 1.36. Los resultados obtenidos se expresaron como Índice de Reactividad (IR) según la ecuación siguiente:

$IR = VG \text{ (suero positivo)} / VG \text{ (suero negativo)}$.

C.7 Reacción en cadena de la polimeraza.

C.7.1. Extracción de DNA.

La extracción de DNA fue realizada a partir leucocitos provenientes de 10- 12 ml de sangre equina. Para ello, la sangre anticoagulada fue centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos para la extracción de la capa antecada, a partir de la cual se realizó la extracción y purificación de DNA genómico y viral siguiendo la metodología descrita por Sambrook (Sambrook y col., 1989^a). Primeramente se efectuó la lisis celular agregando, por cada ml de suspensión celular (capa antecada), 2 ml de tampon de lisis, NTE [NaCl10 MM, Tris-HCl 20 MM- EDTA 1MM, SDS 1,75%] (Ghadersohi y col., 1997). Se agitó en vortex y

luego de incubar a 37° C 1 hora, se agregaron 10 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma). Se incubó a 37° hasta el día siguiente, inactivándose luego, por calentamiento en baño María durante 10 minutos. Posteriormente y bajo campana, se realizaron tres extracciones del DNA con fenol saturado en Tris-HCl 0.5M pH 8,5, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1). Para ello, a un volumen de esta última mezcla se añadió un volumen de la solución de fenol, cloroformo e isoamílico. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Luego de transferir la fase superior acuosa, se realizó una segunda extracción en iguales condiciones. Finalmente se hizo una tercera extracción con cloroformo - isoamílico en relación 24:1. La precipitación del DNA fue realizada adicionando NaCl 5M e isopropanol, en volúmenes de 9 avas partes y una parte respectivamente, del volumen de la fase acuosa. Se invirtió lentamente, observándose la nube de DNA precipitante. Se dejó toda la noche a -20°C, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C y luego de descartar el sobrenadante, se añadió 1 ml de etanol 70°. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm, durante 15 minutos a 4° C, y luego de descartar el sobrenadante, se mantuvo en estufa de 37° C hasta sequedad. El DNA obtenido se resuspendió en 40 µl de agua libre de RNAsas (Gibco) y se mantuvo una hora en baño de 60° C para obtener una resuspensión total.

Una alícuota de dicha solución fue diluída, 1/200, en agua (Factor de dilución (Fd) 1/200) estéril, libre de RNAsas, leyéndose las densidades ópticas a longitudes de onda 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Beckman) modelo DU 530.

La concentración de DNA estimada [DNA] (µg/ml), así como el factor de pureza (FP), fueron calculados mediante las siguientes fórmulas:

- $[DNA] = 50 \times Fd \times DO_{260\text{ nm}}$
- $FP = DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}}$

C.7.2. Detección de DNA viral que codifica la secuencia del péptido sintético

gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎.

La detección fue realizada amplificando una región conservada de 95 pares de bases, ubicada en posición 6885-6970 del genoma viral (Erlich, 1989, Innis y col., 1990), utilizando como “primers” (Invitrogen, Life Technologies) las siguientes secuencias, seleccionadas mediante el programa Enastar.

Pgp 45 Hind: 5´- CAA GCT TCT AGG GAT GAC CAG TAT GAC-3´´

Pgp 45 SAL: 5´´- TGT CGA CGA AAG ACA ACA GGT AGA GGA-3´

Las secuencias fueron conservadas a -20°C a una concentración de 40 pmoles/µl en agua bidestilada estéril, libre de RNAsas (Gibco).

Cada reacción de amplificación se realizó en tubos Eppendorf, donde 2 µl de DNA fueron resuspendidos en 48 µl de una solución "Master mix" (MM), preparada en buffer 5x pH 8,5 [MgCl₂ 7,5 mM] (Promega), a la que se le adicionó MgCl₂, concentración final 2 mM, 0,4 pmoles de cada "primer", 0.2 mM de cada dNTP y 1,2 U de la enzima Taq DNA polimerasa (Promega GoTaq DNA Polymerase). En la segunda ronda de amplificación se procedió de igual forma solo que se tomaron 2 µl del producto de la primera PCR en lugar del DNA de la muestra. Cada reacción fue cubierta con 50 µl de aceite mineral. Para evitar contaminaciones con productos de la PCR presentes en los microaerosoles, la extracción de los ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimeraza y el análisis de los productos amplificados fueron realizados en diferentes ambientes, cada uno con el material exclusivo de cada etapa operatoria.

Ambas PCR se realizaron en las siguientes condiciones: un primer ciclo se realizó con una desnaturalización a 94° C durante 5 minutos, hibridación a 48° C durante 60 segundos y una extensión a 72° C por 90 segundos. Cada uno de los 37 ciclos siguientes se realizaron a 94° C, 60 segundos, a 48° C, 60 segundos y a 72° C, 90 segundos. El último ciclo fue igual a los anteriores, pero con una extensión final de 7 minutos.

En cada serie de trabajo se incluyeron controles positivos y negativos. Como control positivo se empleó DNA de leucocitos de sangre periférica provenientes de un animal infectado experimentalmente con el VAIE, durante un pico febril, y gentilmente cedidos por el Médico Veterinario Roberto Pauli. Los controles negativos empleados fueron DNA extraídos de leucocitos de tres ponies libres de AIE, serología Test de Coggins y ELISA negativa, hasta 60 días posteriores de haberse extraído la muestra. Para controlar la posible contaminación de reactivos con amplicones se utilizó agua destilada estéril, libre de RNAsas, como sustituto del DNA templado.

C.7.3 Electroforesis en geles de agarosa.

A efectos de visualizar los productos amplificados se realizó electroforesis en geles de agarosa inmersos en buffer de corrida TAE. A tal efecto se preparó un gel de agarosa al 3%, disolviéndose en calor, 1,2 g de agarosa, "low melting point" (LMP) (Fisher-Biotech), en 40 ml de TAE, con el agregado de 2 μ l de bromuro de etidio (Sigma) (10mg/ml). Por pocillo se sembraron 20 μ l del producto amplificado ó de cada uno de los controles positivos o negativos, indicados en el punto anterior. Además se sembraron 6 μ l de dos marcadores de peso molecular (Invitrogen, Life Technologies), uno consistente en 18 fragmentos desde 25 a 450 pb y el segundo en 10 fragmentos de 100 a 1000 pb. Se aplicó una corriente de 100 Volts durante una hora aproximadamente hasta que las bandas visibles hallan alcanzado las 3/4 partes de la distancia total de migración. Una vez expuestas a luz UV bajo transiluminador, las imágenes de las bandas amplificadas, fueron registradas con una cámara fotográfica digital. Los pares de bases de las distintas secuencias amplificadas fueron calculados graficando las movilidades electroforéticas relativas en función del marcador de peso molecular, como se detallara en el ítem C.5.1b (Sambrook y col., 1989^b)

C.8 Ensayos de linfoproliferación.

C.8.1 Obtención de células mononucleares de ratones BALB/c.

La obtención de las células esplénicas leucocitarias mononucleares se realizó a partir de los bazos obtenidos de ratones BALB/c. A tal efecto, los ratones inmunizados con los péptidos gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎, p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ y los correspondientes a cada grupo control, se anestesiaron y se sacrificaron por dislocación cervical. Se realizó la esplenectomía y el bazo obtenido de cada animal se desmenuzó en un homoneizador de tejidos ("potter") con 7- 8 ml de PBS pH 7,5. La suspensión celular, luego de filtrarla a través de un tamiz de acero inoxidable, fue colocado sobre 2 ml de una solución de Ficoll Hypaque (densidad 1.077 g/l) (Pharmacia) Luego de centrifugar a 1800 rpm, durante 30 minutos, se extrajo la capa de células mononucleares, las que fueron lavadas con RPMI 1640, pH 7,4 y resuspendidas en 1 ml de medio RPMI 1640 incompleto [2,5 ml RPMI 1640, 50 μ l piruvato de sodio 50x, 3 μ l glutamina 100 mM, 50 UI/ml penicilina sódica, 50 g/ml estreptomina]. La viabilidad se

determinó por exclusión del colorante Azul Tripán 1% efectuándose el recuento de células viables en cámara de Neubauer. Finalmente, se ajustó la concentración celular a 2×10^6 células/ ml de RPMI 1640 completo [medio RPMI 1640 incompleto suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco)]. Solo se cultivaron las suspensiones celulares con viabilidad mayor al 80% (Coligan y col., 1998^a; Margni, 1996^b).

C.8.2 Obtención de células mononucleares de equinos.

Tres volúmenes de sangre equina defibrinada y diluída en partes iguales con PBS, fueron colocadas sobre un volumen de Ficoll Hypaque, densidad 1.077 g/l (Pharmacia). Se centrifugó a 1800 rpm durante 30 minutos y se separó la capa de células mononucleares, las que fueron lavadas con RPMI 1640, pH 7,4. Una vez establecida la concentración y viabilidad celular, como fuera descrita en el ítem anterior, 2×10^6 células se resuspendieron en 1 ml de RPMI 1640 completo (Margni, 1996^b).

C.8.3 Conservación celular a -180°C .

Una suspensión de 1×10^7 células mononucleares (equinas o murinas), fue centrifugada a 10000 rpm 30 segundos. Luego de extraído el sobrenadante las células se resuspendieron en 900 μl de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y se transfirieron a un criotubo para ser mantenidas a 4°C durante una hora. A los criotubos, colocados en un recipiente con hielo granizado, se les adicionó 100 μl de dimetilsulfóxido. Luego de ser colocados a -70°C durante 24 horas, fueron transferidos a un tanque de nitrógeno líquido. Para el proceso de descongelamiento los criotubos se colocaron inmediatamente en un baño a 37°C . En condiciones de esterilidad, las células fueron vertidas a un tubo de centrifuga con 8 ml de medio RPMI 1640 pH 7,4, a 37°C . Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 200 μl de medio RPMI 1640 completo. Para evaluar la viabilidad y recuento celular se procedió según metodología descrita previamente.

C.8.4 Cultivos celulares.

Los cultivos celulares fueron realizados en microplacas estériles (TNT), de 96 pocillos, fondo plano. Para ello se distribuyeron por animal en estudio en tres pocillos, 100 μl de medio de cultivo RPMI 1640 completo, como blanco de

reacción, en otros tres 100 μl de una suspensión de 2×10^5 células mononucleares en igual medio, para evaluar estimulación basal, 3 pocillos con 100 μl de una suspensión de 2×10^5 células en presencia de 0,5 μl de fitohemoaglutinina (FHA) (Gibco) para evaluar estimulación inespecífica y finalmente otros 3 pocillos con 100 μl de una suspensión de 2×10^5 células en presencia de cada uno de los péptidos sintéticos (0,5 μg) para evaluar estimulación específica. Finalmente las microplacas fueron incubadas durante 6 días a 37° C, en cámara húmeda con atmósfera controlada de 5% de CO_2 (Coligan y col., 1998^b).

C.8.5 Evaluación de la linfoproliferación.

La evaluación de la proliferación celular fue determinada por un inmunoensayo colorimétrico, basado en la medición de la incorporación de Bromo dUridina (BrdU) a la molécula de DNA de las células en replicación siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante (Cell proliferation ELISA SYSTEM Pharmacia Biotrak) (Maghni y col., 1999; Messele y col., 2001). Para ello, a los 5 días de cultivo y 24 horas antes de su finalización, se añadieron, por pocillo 10 μl de una solución 10 μM de BrdU. Las células se centrifugaron a 1440 rpm durante 5 minutos y se fijaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Luego las placas fueron bloqueadas para ser incubadas dos horas a 37° C, con un anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa, diluido 1/100. El anticuerpo no unido fue removido por 3 lavados con 300 μl por pocillo de solución de lavado. El anticuerpo anti-BrdU fue detectado mediante una reacción de color con una mezcla, en partes iguales, del reactivo color A y B. Tanto la solución fijadora, la de bloqueo, de lavado así como los reactivos A y B fueron suministrados por el fabricante. Luego de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, la reacción fue detenida por la adición de H_2SO_4 1 M. Las lecturas de densidades ópticas fueron realizadas en un lector de placas de ELISA automático (Multiskan EX). El índice de proliferación (IP) fue calculado mediante:

$$\text{IP} = \frac{(\text{DOE} - \text{DOB}) - (\text{DOEB} - \text{DOB})}{(\text{DOEB} - \text{DOB})}$$

Donde,

DOE: densidades ópticas media de las células estimuladas (inespecífica o específicamente).

DOB: densidades ópticas media del blanco de reacción.

DOEB: densidades ópticas media de las células (estimulación basal).

Los datos obtenidos fueron calculados en planilla de cálculo Microsoft Excel y analizados con el programa SPSS 9.0 versión para Windows.

C.9 Inmunohistoquímica.

Con la finalidad de evaluar si los anticuerpos murinos anti-péptidos eran capaces de reconocer a su epítopo nativo presente en las proteínas virales, se realizaron pruebas de inmunohistoquímica.

Para ello, células esplénicas fueron obtenidas de dos bazo, uno proveniente de un equino infectado (período agudo) y el otro proveniente de un equino sano, siguiendo la metodología descrita previamente en la sección C.8.2.

Los extendidos celulares fueron realizados con 15 μ l de una suspensión celular ($4-5 \times 10^6$ células/ml) sobre portaobjetos tratados previamente con silane al 2% en acetona, los que fueron conservados a -20°C hasta su utilización. La presencia de monocitos fue confirmada mediante coloración con May Grunwald- Giemsa.

Los extendidos celulares fueron lavados con PBS (2 veces) y sumergidos en una solución de 36 ml de metanol y 4 ml de H_2O_2 100 volúmenes, durante 25 minutos. Luego de bloquear, con una solución de suero normal de cabra (10%), azida sódica (0,1%), y trazas de azul de metileno en PBS, durante 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda, se agregaron 50 μ l de los diferentes sueros murinos, diluidos 1/50 en solución diluyente [1 g BSA, 0,05 g azida sódica, PBS en c.s.p. 100 ml]. Los mismos fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente. Posterior a dos lavados con PBS, las células esplénicas fijadas fueron incubadas 30 minutos, con anticuerpo anti-ratón biotinilado (Chemicon) diluido 1/50 en solución diluyente. Luego de dos lavados con PBS se agrega diaminobencidina (DAB), hasta observar un fino puntillado, momento en donde se detiene la reacción enzimática con agua destilada. Previo al montaje en Bálsamo de Canadá, se realizó una tinción con hematoxilina durante 10 segundos y una deshidratación en alcoholes etílicos de 70° , 96° , 100° , durante 3 minutos y 5 minutos en xilol bajo campana extractora.

Los preparados se observaron en microscopio óptico Carl Zeiss en 400x y se tomaron fotografías digitales.

C.10 Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS Versión 9.0 para Windows. Las pruebas no paramétricas de Kruscal Wallis y Mann Whitney U fueron utilizadas para comparar datos de anticuerpos, interleuquinas e índices de proliferación, entre los grupos control y los estimulados con péptidos. En todos los casos $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todos los resultados se expresaron como la media \pm desviación estandar de la media (SEM).

D. Resultados

D.1 Evaluación de la inmunidad específica, humoral y celular, en animales naturalmente infectados con el VAIE.

D.1.1 Detección de animales infectados con el VAIE.

A los efectos de realizar un diagnóstico que permita distinguir con precisión animales infectados de no infectados, se emplearon tres metodologías, dos indirectas que permiten detectar anticuerpos anti-virales, mediante el Test de Coggins y ELISA indirecto, y la restante, capaz de demostrar la presencia del virus en monocitos de sangre periférica, aplicando PCR.

D.1.1.1 Detección de anticuerpos anti-virales.

Con el objeto de detectar la presencia de anticuerpos anti-virales en los animales infectados, se realizó el Test de Coggins, aceptada como prueba oficial para el diagnóstico, y ELISA. La primera detecta anticuerpos con especificidad hacia antígenos virales, principalmente proteínas de la cápside (p26), en tanto que el test de ELISA, utilizando como antígenos gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, nos permite evidenciar los anticuerpos específicos para cada uno de ellos (Coggins y col., 1972; Engvall y col., 1972; Soutullo y col., 2001).

D.1.1.1.a Inmunodifusión radial doble (Test de Coggins).

Para detectar anticuerpos anti-proteínas de la cápside del virus, principalmente p26, se realizó la técnica de doble difusión radial, descrita por Coggins, según se detalla en la sección C.5.3. Para ello, se empleó el antígeno de Coggins y una gammaglobulina equina anti-proteínas virales, como control positivo. Ambos reactivos fueron producidos según se detalla en las secciones C.5.1 y C.5.2, respectivamente. Previo a su utilización se verificó la presencia de la proteína p26 en el antígeno obtenido.

a) Fracciones proteicas presentes en el antígeno de Coggins.

Teniendo en cuenta que durante el procesamiento que se realiza para la purificación de antígenos virales de bazo solamente permanece la proteína p26, se procedió a su purificación y posterior análisis frente a un suero de ratón anti-p26, diluido 1/50, tal como se detalla en la sección C.5.1. Para ello, se midió la concentración proteica del antígeno de Coggins, se calcularon los

pesos moleculares de sus fracciones, separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, y la antigenicidad de la p26 se evaluó por Western Blot.

- Concentración proteica del antígeno de Coggins:

La concentración proteica fue determinada por el método Bradford, según se describe en el punto C.5.1a, construyendo una curva de calibrado de concentraciones de BSA comprendidas entre 0,1 mg a 0,35 mg/ml (Figura 5).

La concentración proteica del antígeno semipurificado, a partir de bazo, fue de 0,252 mg/ml.

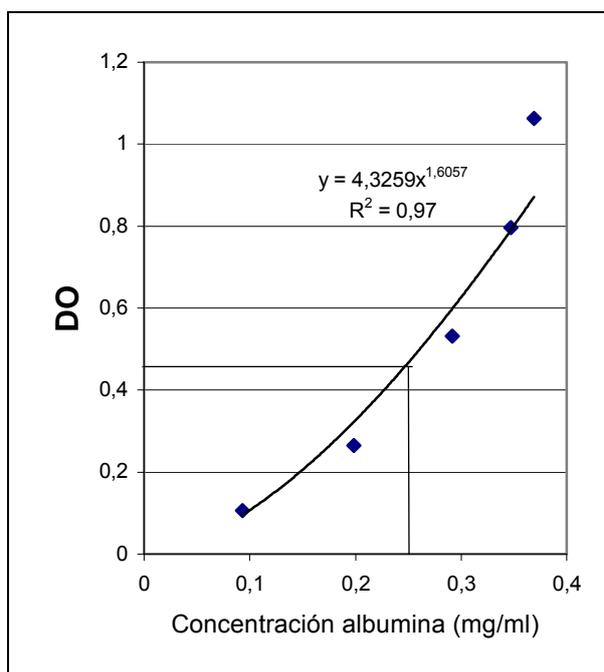
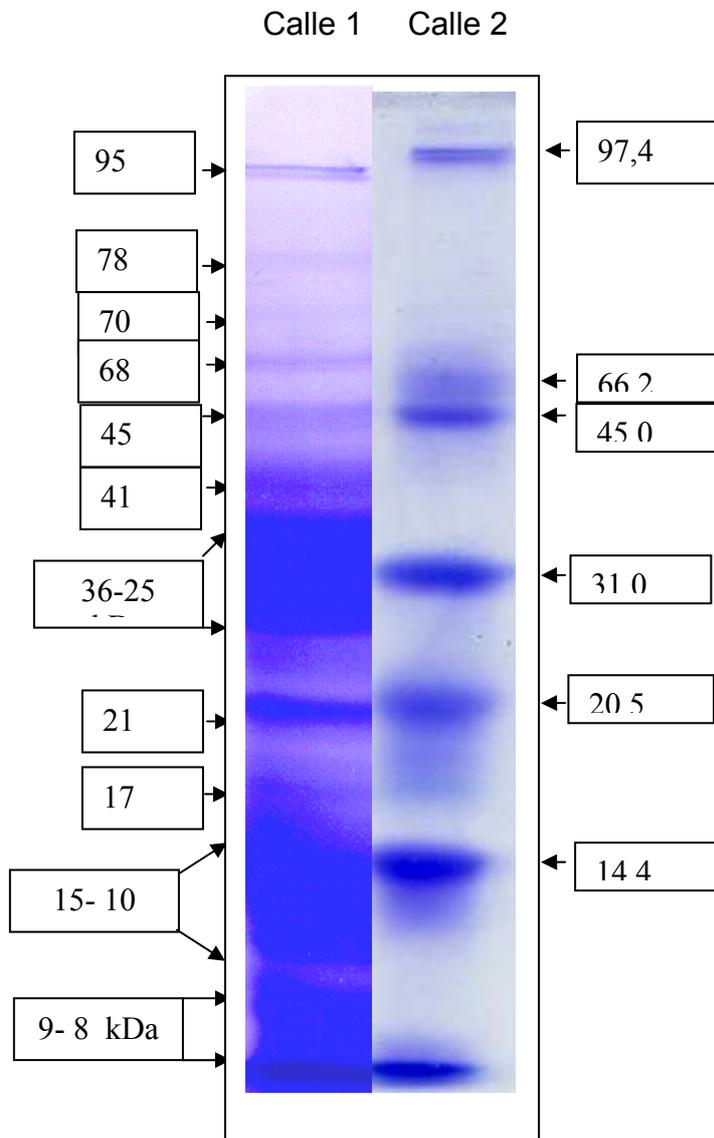


Figura 5. *Curva estándar de BSA*. En el eje de las ordenadas se representan las lecturas de las DO y en el eje de las abscisas las concentraciones de BSA, expresadas en mg/ml, correspondiente al promedio de tres determinaciones en cada dilución.

- Fracciones proteicas presentes en el antígeno de Coggins:

Para detectar la presencia de la proteína de la cápside viral, de 26 kDa, se procedió a separar las distintas fracciones proteicas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, teniendo como referencia un marcador de peso molecular (rango 97- 14 kDa), según se describe en la sección C.5.1.b. Estas fracciones fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa y evaluadas por Western Blot, frente a un suero de ratón anti-p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, diluido 1/50, tal como se detalla en la sección C.5.1.b.

En la fotografía 1 se muestran las distintas fracciones proteicas procedentes del antígeno de Coggins, corrido en condiciones desnaturalizantes, según se describe en la sección C.5.1.b.



Fotografía 1. *Fraccionamiento de las proteínas presentes en el antígeno de Coggins mediante SDS-PAGE en geles de acrilamida-bisacrilamida al 12%. Calle 1 antígeno de Coggins, calle 2 marcador de peso molecular.*

Los pesos moleculares relativos fueron calculados según la ecuación de la recta graficada en la figura 6, donde el eje de las ordenadas representa el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas del marcador de peso molecular, en tanto que en el eje de las abscisas se grafican los Rf.

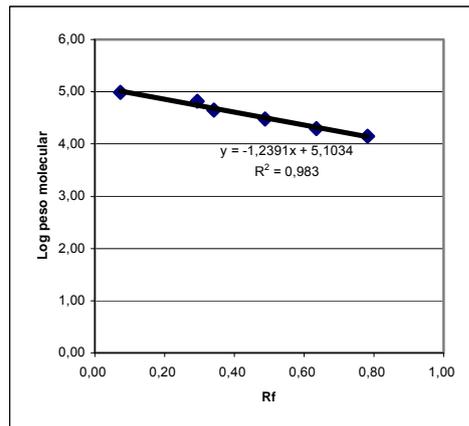
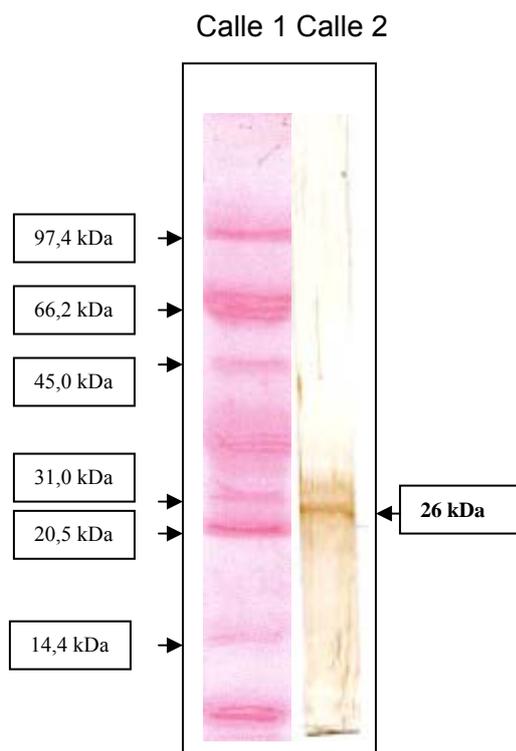


Figura 6. *Cálculo de los pesos moleculares relativos.* Curva de calibrado obtenida con las fracciones proteicas del marcador de peso molecular separadas en geles de poliacrilamida- bisacrilamida al 12%. En el eje de las ordenadas se representan los logaritmos de los pesos moleculares y en el eje de las abscisas los valores de Rf, calculados como el cociente entre la distancia recorrida de cada fracción vs la distancia del frente de corrida.

La antigenicidad de la proteína p26 fue analizada frente a un suero (diluido 1/50) de ratón inoculado con el péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ mediante Western Blot. Las imágenes obtenidas se muestran en la fotografía 2. En la figura 7 se representa la gráfica empleada para calcular su peso molecular.



Fotografía 2. "Western Blot" de la fracción p26, reconocida por un anticuerpo murino anti- p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, diluido 1/50 (calle 2). La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular empleado (Bio-Rad).

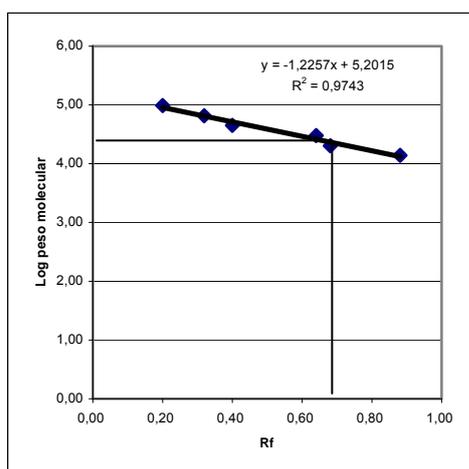


Figura 7. Cálculo del peso molecular relativo de la fracción p26. Curva de calibrado obtenida con las fracciones proteicas del marcador de peso molecular, separadas en geles de poliacrilamida- bisacrilamida al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. En el eje de las ordenadas se representan los logaritmos de los pesos moleculares conocidos y en el eje

de las abscisas los valores de R_f , calculados como el cociente entre la distancia recorrida de cada fracción vs la distancia del frente de corrida.

Los resultados obtenidos muestran la presencia de la proteína p26 (26 kDa) en el antígeno de Coggins analizado.

No fue posible emplear un suero policlonal equino anti-AIE, ya que el conjugado reconocería a las gammaglobulinas equinas presentes como impurezas en el antígeno.

b) Test de Coggins. Resultados.

Mediante este test se analizaron 256 sueros equinos, 192 pertenecientes a la seroteca del Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Agropecuarias del Ministerio de la Producción y 64 pertenecientes a 5 establecimientos agropecuarios de la provincia de Santa Fe, cada uno con características diferentes.

Los resultados mostraron que de los 192 sueros, 81 fueron positivos, evidenciando la presencia de anticuerpos anti-proteína viral p26. De los 64 sueros restantes, todos los correspondientes al establecimiento A (n=13) fueron negativos, en tanto que 3 de los 11 (establecimiento B); 7 de los 11 (establecimiento C); 4 de los 12 (establecimiento D) y 11 de los 17 (establecimiento E) fueron positivos al Test de Coggins.

Tabla 1. Resultados del Test de Coggins, por establecimiento.

Establecimiento	Nº animales positivos	Identificación de las muestras positivas	Identificación de las muestras negativas
A (n=13)	0		620- 621-622-623-624- 625-626-627-628-629- 630-631-632
B (n=11)	3	578- 579- 580	574-575-576-577-581- 582-583-584
C (n= 11)	7	606- 607-608-609- 610-613-614	611-612-615-616
D (n=12)	4	593- 600- 601- 602	594-595-596-597-598- 599-603-604
E (n=17)	11	541- 542- 550- 551- 552- 561- 564- 566- 567- 568- 637	545-546-547-563-569- 572

D.1.1.1.b ELISA indirecto no competitivo cualitativo

Dada la baja sensibilidad del Test de Coggins, los mismos sueros fueron evaluados por dos ELISA indirectos, uno que emplea como antígeno al péptido gp 90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ y otro al péptido gp 45₍₅₂₂₋₅₄₆₎, según se detalla en la sección C.6.1. Los resultados fueron expresados como Porcentaje de Positividad (PP), considerándose positivo cuando al menos uno de ellos diera valores de PP superior al valor de corte establecido para cada péptido (Soutullo y col., 2001). Los resultados mostraron que de 64 sueros de equinos evaluados, ninguno de los 13 correspondientes al establecimiento A presentaban anticuerpos anti-gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ ni anti-gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, en tanto que tres animales de los 11 pertenecientes a la tropilla del establecimiento B, 7 de 11 del establecimiento C, 4 de 12 del establecimiento D y 14 de 17 animales del establecimiento E presentaban anticuerpos específicos para al menos uno de los péptidos.

Tabla 2. Resultados del ELISA, por establecimiento.

Establecimiento	Nº animales positivos	Identificación de las muestras positivas	Identificación de las muestras negativas
A (n=13)	0		620- 621-622-623-624- 625-626-627-628-629- 630-631-632
B (n=11)	3	578- 579- 580	574-575-576-577-581- 582-583-584
C (n= 11)	7	606- 607-608-609-610- 613-614	611-612-615-616
D (n=12)	4	593- 600- 601- 602	594-595-596-597-598- 599-603-604
E (n=17)	14	541-542- 550- 551-552- 561- 563-564-566-567- 568- 569- 572- 637	545-546-547

D.1.1.2 Detección de DNA viral en leucocitos equinos por PCR-gp45.

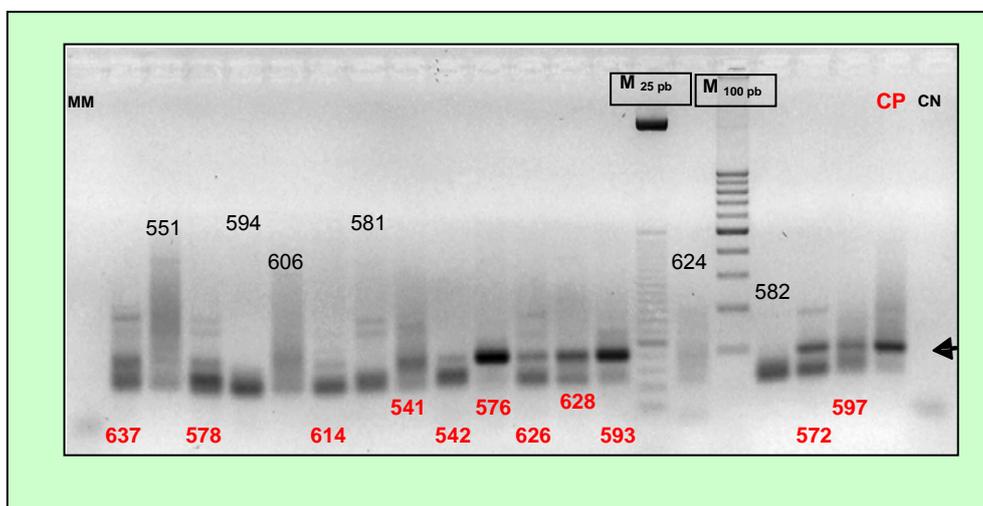
La detección viral indirecta mediante métodos serológicos permite diagnosticar la infección si la cantidad de anticuerpos sintetizados están en cantidades suficientes. Cuando ello no es posible, es conveniente emplear técnicas directas, como sería la PCR que permite amplificar a partir de DNA leucocitario, por ejemplo, el locus génico que codifica al péptido gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎.

Para ello, primeramente, se obtuvieron, como se detallara en la sección C.7.1, entre 1500 a 8000 µg/ml de DNA a partir de 10 a 15 ml de sangre periférica de cada uno de los 61 animales de los 64 localizados en los establecimientos anteriormente detallados. El factor de pureza osciló entre 1,4 y 2, dependiendo de la muestra analizada.

A partir del DNA obtenido se amplificó la región de 95 pb, ubicada en posición 6885-6970 del genoma viral, que codifica la secuencia aminoacídica del péptido gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ del VAIE. El par de oligonucleótidos iniciadores

“primers” fue seleccionado empleando el programa Enastar y la reacción de PCR fue realizada según se detalla en la sección C.7.2, incluyendo dos controles negativos y un control positivo de secuencia y tamaño perfectamente conocido.

Los productos de amplificación (fotografía 3) fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% en presencia de Bromuro de Etidio, según se detalla en la sección C.7.3, y los pares de bases (pb) calculados según la ecuación de la recta graficada en la figura 8, donde el eje de las ordenadas representa los pb conocidos presentes en el marcador (25 a 450 pb), en tanto que en el eje de las abscisas se grafican los valores de Rf.



Fotografía 3. *Amplificación de DNA viral por doble PCR*. Electroforesis en geles al 3% con Bromuro de Etidio de los productos de amplificación correspondiente a gp 45 (6885-6970), donde **MM** y **CN** corresponden a los controles negativos, empleando solo mezcla de reacción (“Master Mix”) y DNA extraído de un equino libre de AIE (CN). El rango de los marcadores de pares de bases conocidas, **M_{100 pb}** y **M_{25 pb}**, corresponden a 100 - 1000 pb y a 25- 450 pb respectivamente. **CP** es el control positivo de amplificación a partir de DNA proveniente de un equino infectado experimentalmente con el VAIE (pico febril). Los números presentes en la figura corresponden a la identificación de los animales analizados, en rojo a las muestras positivas y en negro a las muestras negativas.

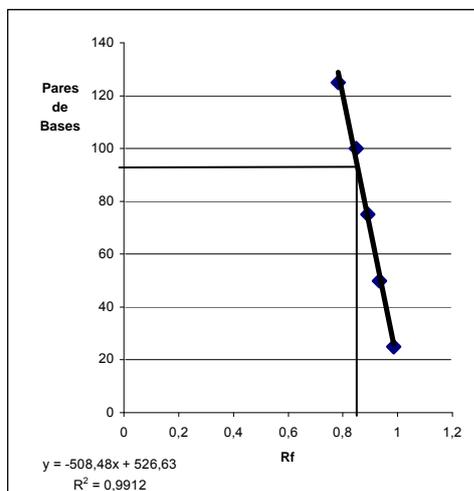


Figura 8. *Cálculo de los pares de bases de los productos de amplificación.* Curva de calibrado obtenida con los oligonucleótidos de pares de bases conocidas (pb), separados en geles de agarosa al 3% en presencia de Bromuro de Etidio, visualizadas por transiluminación y captación de la imagen con cámara fotográfica digital. En el eje de las ordenadas se representan los pb conocidos y en el eje de las abscisas los valores de Rf, calculados como el cociente entre la distancia recorrida de cada fracción vs la distancia del frente de corrida.

Los resultados obtenidos a partir de las 61 muestras de DNA analizadas se representan en la tabla 3 donde se observa que en el establecimiento A, 7 de las 13 muestras, 9 de las 11 del establecimiento B, 8 de 11 del establecimiento C, 4 de 12 del establecimiento D y 12 de 14 del establecimiento E, amplificaron productos de DNA entre 90 y 100 pb, correspondiente a la secuencia del péptido gp 45₍₅₂₂₋₅₄₆₎. En la tabla 3 y en la fotografía 3 se identificaron en rojo y en negro aquellas muestras seleccionadas como positivas y negativas, respectivamente.

Tabla 3. Resultados de la reacción doble PCR, por establecimiento.

Establecimiento	Nº animales positivos	Identificación de las muestras positivas	Identificación de las muestras Negativas
A (n=13)	7	621- 626 -627- 628 -629-630-632	620-622-623- 624 -625-631
B (n=11)	9	574- 575- 576 -577- 578 -579- 580-583-584	581 - 582-
C (n= 11)	8	607-608-609-610-613- 614 -615-616	606 -611-612
D (n=12)	4	593 - 597 - 599- 604	594-595-596-598-600- 601 -602-603
E (n=14)	12	541-542 - 550- 561-563-564-566-567-568-569- 572- 637	551 -552

El análisis de la secuenciación de los productos de DNA amplificados, correspondientes a 95 pb, de la muestra 576 y la del control positivo (CP), realizadas en el servicio de secuenciación del INTA- Castelar (Buenos Aires), mostró un 96% de identidad de nucleótidos con la secuencia reportada en la base de datos NCBI (nº acceso AF247394).

D.1.2 Evaluación de la inmunidad humoral frente a los péptidos sintéticos de las proteínas gp90, gp45 y p26.

Para tal fin sueros provenientes de animales persistentemente infectados con el VAIE fueron analizados frente a las bibliotecas peptídicas así como frente a los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.

D.1.2.1 Mediante la utilización de las bibliotecas peptídicas sintetizadas por el método spot.

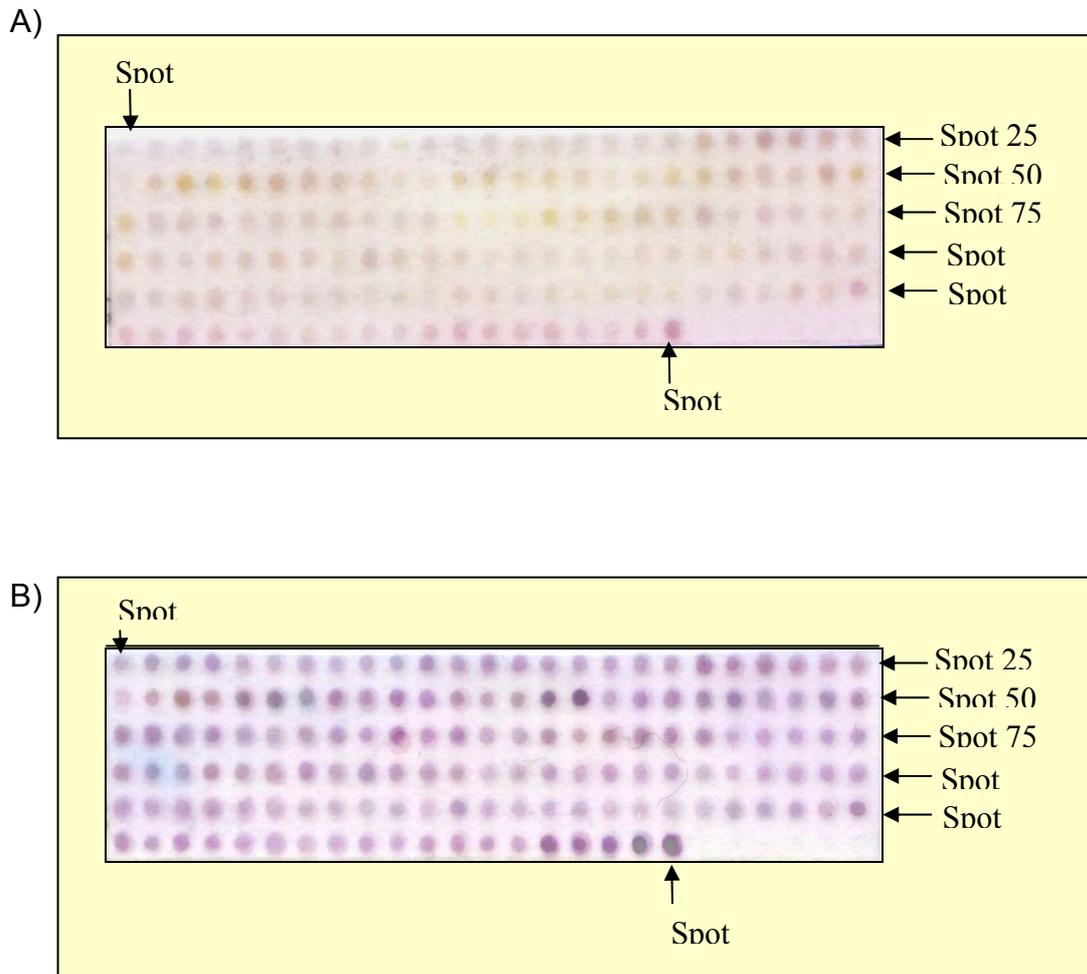
Para ello, sueros provenientes de animales infectados y no infectados fueron incubados con bibliotecas de péptidos conteniendo las secuencias de la glicoproteína gp90 y de la proteína p26, sintetizadas sobre membranas de celulosa aplicando el método Spot, según se describe en las secciones C.2.2 y C.6.4. Las membranas fueron evaluadas empleando, primero, un “pool” de sueros equinos serológicamente negativos (Test de Coggins y ELISA-gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ y gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎) y luego de ser tratadas como se describe en C.6.4 , empleando un “pool” de sueros positivos.

a) Empleando las bibliotecas peptídicas correspondientes a la proteína gp90.

a.1) Analizando la biblioteca peptídica con decapentapéptidos.

La reactividad de los sueros equinos fue analizada frente a 144 spots correspondientes a la secuencia de la proteína gp90 completa.

En la fotografía 4 se observan las imágenes de la membrana correspondiente a la proteína gp90 completa, en la figura 9 se representan los valores de IR superiores a 1,7 (valor de corte) y en la figura 10 se muestran las secuencias de cada spot, resaltando las regiones más reactivas (negrita) (IR \geq 2,2) y dentro de cada región, las de máxima reactividad (subrayadas) donde podrían estar ubicados con mayor probabilidad los epitopes antigénicos.



Fotografía 4. *Biblioteca peptídica correspondiente a la secuencia completa de la proteína gp90 del VAIE.* La membrana de celulosa contiene un total de 144 spots; cada spot consiste en una secuencia de 15 residuos aminoacídicos y difieren entre sí en tres aa. La membrana fue evaluada por ELISA: A) Frente a un “pool” de sueros negativos B) Frente a un “pool” de sueros positivos.

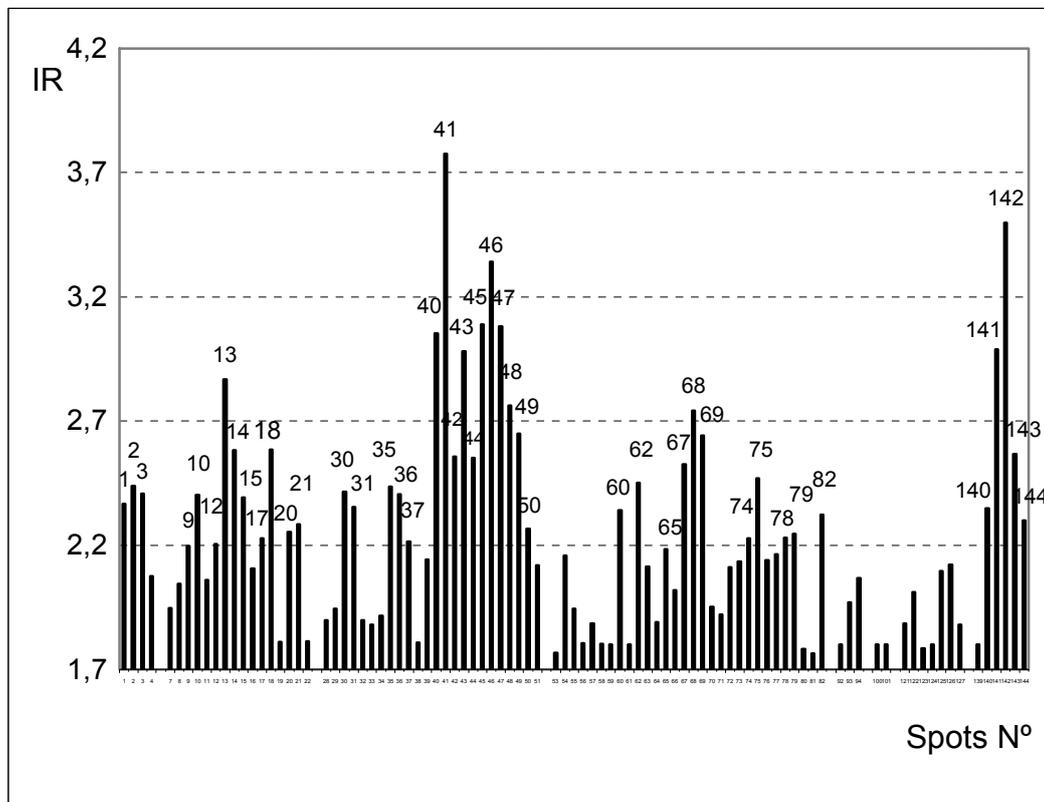


Figura 9. Índices de reactividad (IR) correspondientes a la biblioteca peptídica de la proteína gp90. En el eje de las ordenadas se representan los valores de IR superiores a 1,7 y en el eje de las abscisas los números a cada spots.

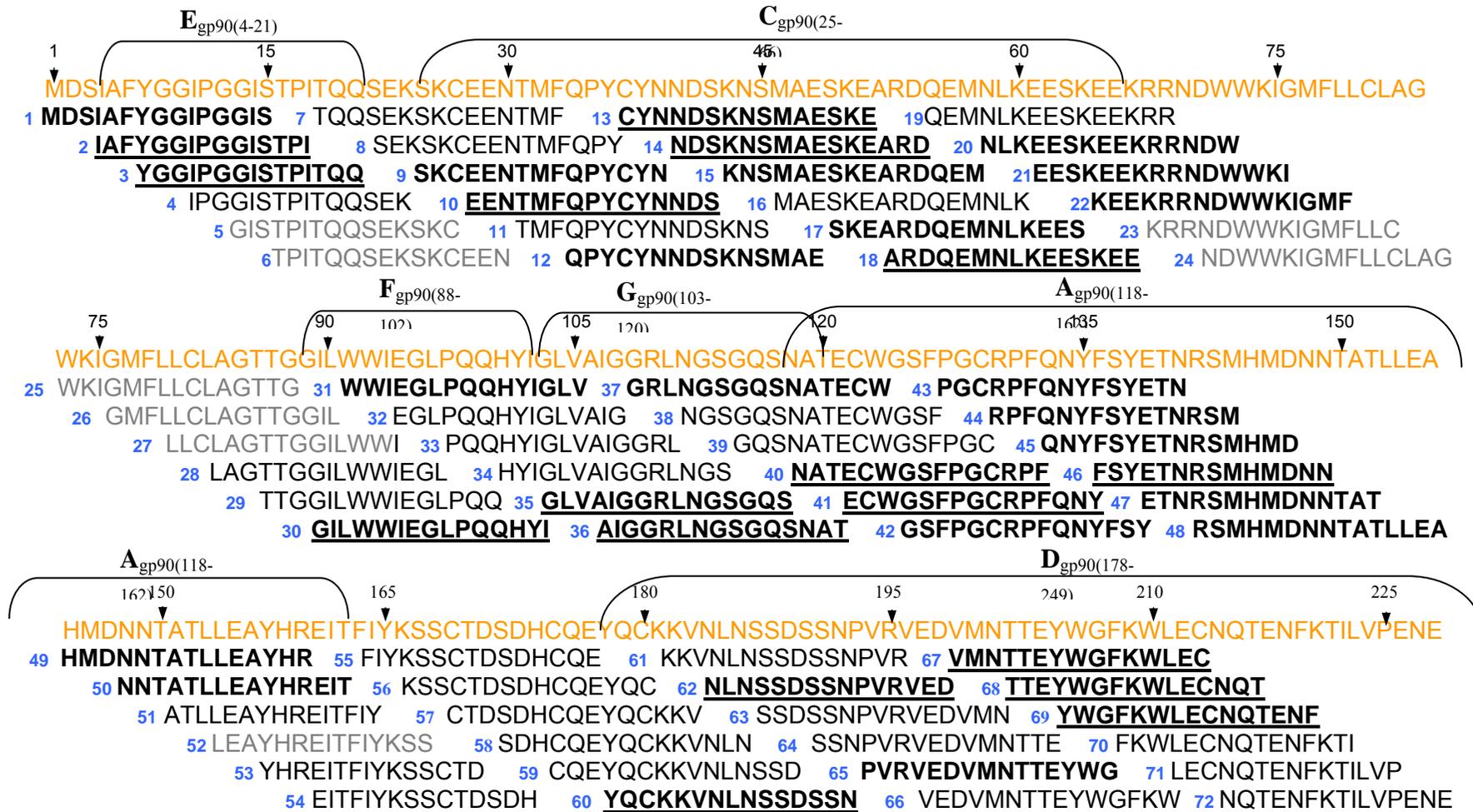


Figura 10. *Biblioteca peptídica de la proteína gp90 del VAIE*. En rojo se representa la proteína completa (1-444), indicando con flechas la posición de los aa, con corchetes las regiones definidas, en azul los números de los spots, en negritas las secuencias más reactivas ($IR \geq 2,2$) de la proteína completa, subrayadas las de máxima reactividad en cada región y en grises las regiones no reactivas.



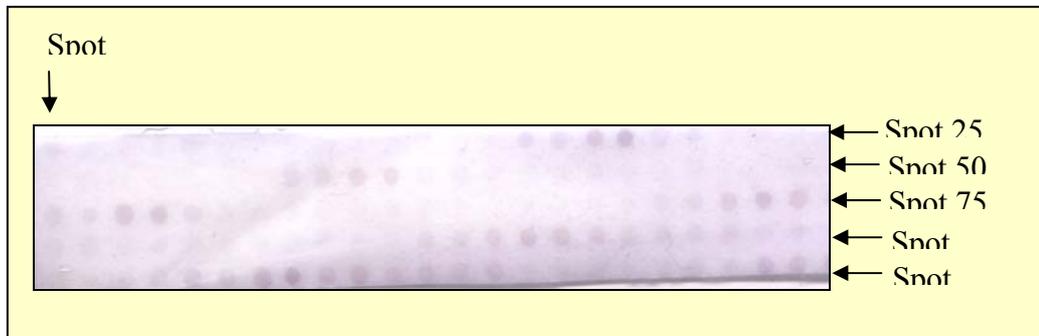
Figura 10 (continuación). *Biblioteca peptídica de la proteína gp90 del VAIE*. En rojo se representa la proteína completa (1-444), indicando con flechas la posición de los aa, con corchetes las regiones definidas, en azul los números de los spots, en negritas las secuencias más reactivas ($IR \geq 2,2$) de la proteína completa, subrayadas las de máxima reactividad en cada región y en grises las regiones no reactivas.

a.2) Analizando la región del extremo C-terminal₍₄₁₇₋₄₄₄₎ de la proteína gp 90 mediante una biblioteca de péptidos sintéticos de diferentes tamaños (método Spot syzing).

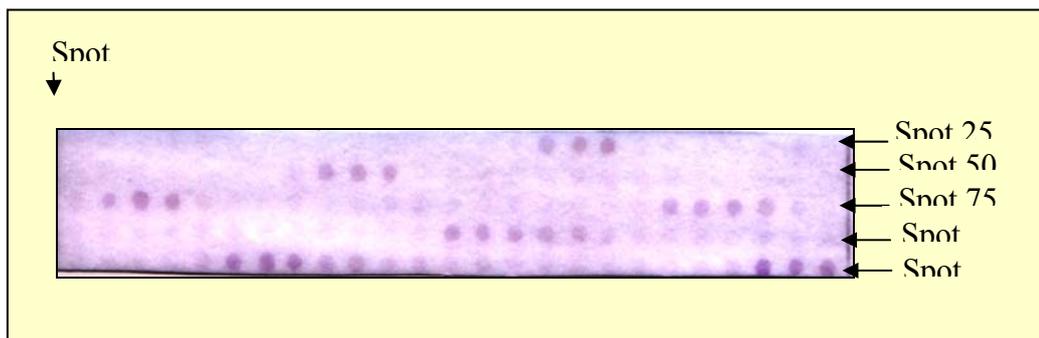
La reactividad de los sueros equinos fue analizada también frente a 125 spots, correspondientes a la secuencia del extremo C-terminal₍₄₁₇₋₄₄₄₎ preparada según se detalla en la sección C.2.2.a, para medir el/los epitopes mínimos.

En la fotografía 5 se observan las imágenes de las membranas correspondientes al extremo C-terminal₍₄₁₇₋₄₄₄₎ de esta proteína, en la figura 11 se representan los valores de IR superiores a 1,7 (valor de corte) y en la figura 12 se resaltan las secuencias reactivas y en letras de color los dos epitopes mínimos localizados, LIRHK₍₄₃₉₋₄₄₃₎ y WKLVKTSGIT₍₄₁₈₋₄₂₈₎.

A)



B)



Fotografía 5. *Biblioteca peptídica correspondiente al extremo C-terminal* ₍₄₁₇₋₄₄₄₎ *de la proteína gp 90 del VAIE.* La membrana de celulosa contiene 125 spots; los primeros 18 son de 6 aa, solapados en 5 con los adyacentes, los 18 siguientes son de 7 aa y solapados en 6, luego 18 de 8

solapados en 7, los 18 spots siguientes de 9 aa con solapamiento de 8, 18 spots siguientes de 10 aa con solapamiento de 9 residuos, 18 de 11 aa con solapamiento de 10 y finalmente 17 de 12 residuos con solapamiento de 11 aa. La membrana fue evaluada por ELISA: A) Frente a un “pool” de sueros negativos B) Frente a un “pool” de sueros positivos.

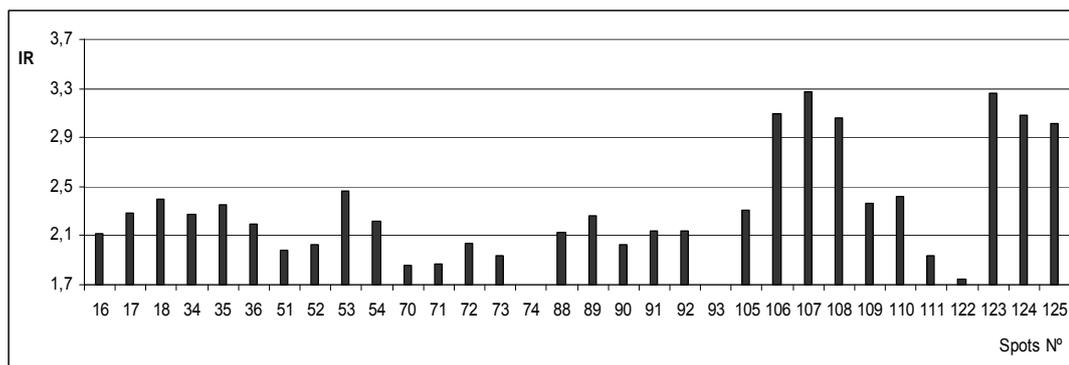


Figura 11. *Índices de reactividad (IR) correspondientes a la biblioteca peptídica de la región C-terminal₍₄₁₇₋₄₄₄₎ de la proteína gp90.* En el eje de las ordenadas se representan los valores de IR superiores a 1,7 y en el eje de las abscisas los números de los spots.

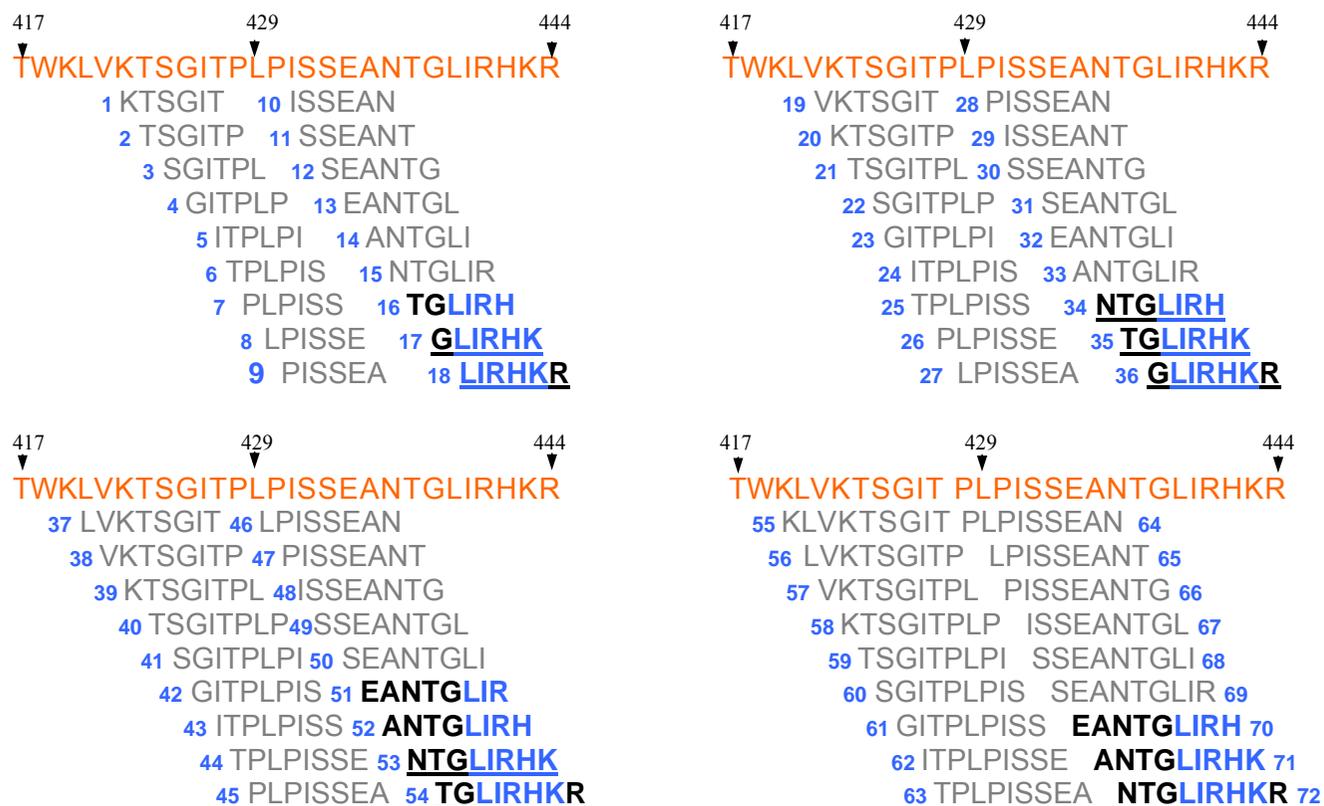


Figura 12. *Biblioteca peptídica del extremo C-terminal (417-444) de la proteína gp90 del VAIE*. Identificación de epítopes mínimos. En rojo se representa el extremo C-terminal de la proteína completa₍₄₁₇₋₄₄₄₎, indicando en letras azules los epítopes mínimos, con flechas la posición de los aa, en azul los números de los spots, en negritas las regiones más reactivas ($IR \geq 2,2$), subrayadas las de máxima reactividad en cada región y en grises las regiones no reactivas.



Figura 12. (continuación) *Biblioteca peptídica del extremo C-terminal (417-444) de la proteína gp90 del VAIE*. Identificación de epitopes mínimos. En rojo se representa el extremo C-terminal de la proteína completa₍₄₁₇₋₄₄₄₎, indicando en letras azules los epitopes mínimos, con flechas la posición de los aa, en azul los números de los spots, en negritas las regiones más reactivas (IR ≥ 2,2), subrayadas las de máxima reactividad en cada región y en grises las regiones no reactivas.

Los resultados obtenidos con la biblioteca de decapeptidos de la proteína gp90 evidencian la presencia de cuatro regiones particularmente reactivas, identificadas como: A_{gp90(118-162)} (spots 40-50), región B_{gp90(418-444)} (spots 140-144), C_{gp90(25-66)} (spots 9-18) y D_{gp90(178-249)} (spots 60-79).

Dentro de la región A_{gp90(118-162)}, la mayor reactividad se observó en los spots 40₍₁₁₈₋₁₃₂₎, 41₍₁₂₁₋₁₃₅₎ y 46₍₁₃₆₋₁₄₉₎, con IR de 3,0; 3,8 y 3,4, respectivamente. Estos datos sugieren la presencia de dos epitopes en esta región, uno correspondiente a la secuencia NATECWGSFPGCRPFQNY₍₁₁₈₋₁₃₅₎ y otro a la secuencia FSYETNRSMHMDNN₍₁₃₆₋₁₄₉₎.

En lo referente a la región B_{gp90(418-444)}, la serie de spots más reactivos (141, 142 y 143), centrados en el spot 142₍₄₂₄₋₄₃₈₎ con un IR de 3,6, evidenciarían la presencia de un epitope VKTSGITPLPISSEANTGLIR₍₄₂₁₋₄₄₁₎. En esta región, se ha determinado también, mediante la biblioteca del extremo C-terminal para la medición del tamaño mínimo de epitopes, la presencia de dos epitopes: WKLVKTSGIT₍₄₁₈₋₄₂₇₎ y LIRHK₍₄₃₉₋₄₄₃₎.

Dentro de la región C_{gp90(25-66)}, la mayor reactividad se observó en el spot 13₍₃₇₋₅₁₎, en tanto que los spots 10₍₂₈₋₄₂₎, 14₍₄₀₋₅₄₎ y 18₍₅₂₋₆₆₎ presentan IR comprendidos entre 2,4 a 2,6. Estos resultados pondrían en evidencia al menos tres epitopes, EENTMFQPYCYNND₍₂₈₋₄₂₎, CYNNDKNSMAESKEARD₍₃₇₋₅₄₎ y ARDQEMNLKEESKEE₍₅₂₋₆₆₎.

En la región D_{gp90(178-249)} se encontraron varias regiones reactivas, entre las cuales se destaca la definida por los spots 67₍₁₉₉₋₂₁₃₎, 68₍₂₀₂₋₂₁₆₎ y 69₍₂₀₅₋₂₁₉₎, y centrada en el spot 68₍₂₀₂₋₂₁₆₎ (IR=2,7), lo que permitiría definir la presencia de un epitope VMNTTEYWGFKWLECNQTENF₍₁₉₉₋₂₁₉₎ en esta región. Adicionalmente, los spots 60₍₁₇₈₋₁₉₂₎, 62₍₁₈₄₋₁₉₈₎ y 75₍₂₂₃₋₂₃₇₎ presentaron altos IR lo que evidenciaría la presencia de dos epitopes, YQCKKVNLNSSDSSNPVRVED₍₁₇₈₋₁₉₈₎ y LVPENEMVNINDTDT₍₂₂₃₋₂₃₇₎.

Regiones de menor reactividad se localizaron sobre el extremo N-terminal, identificadas como: región E_{gp90(4-21)} (spots 2 y 3), F_{gp90(88-102)} (spot 30) y G_{gp90(103-120)} (spots 35 y 36).

difieren entre sí en tres aa. La membrana fue evaluada por ELISA: A) Frente a un "pool" de sueros negativos B) Frente a un "pool" de sueros positivos.

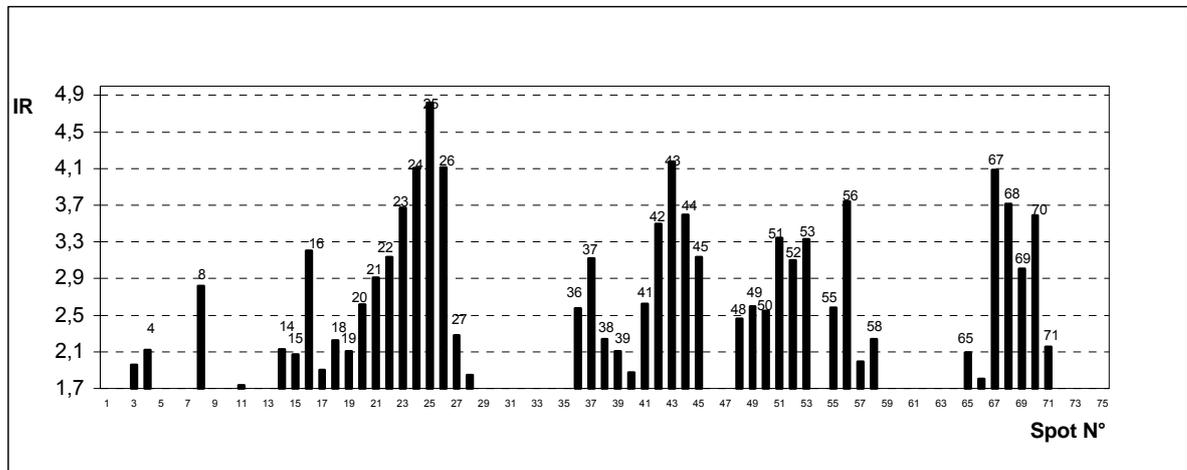


Figura 13. Índices de reactividad (IR) correspondientes a la biblioteca peptídica de la proteína p26. En el eje de las ordenadas se representan los IR superiores a 1,7 y en el eje de las abscisas los números de los spots.

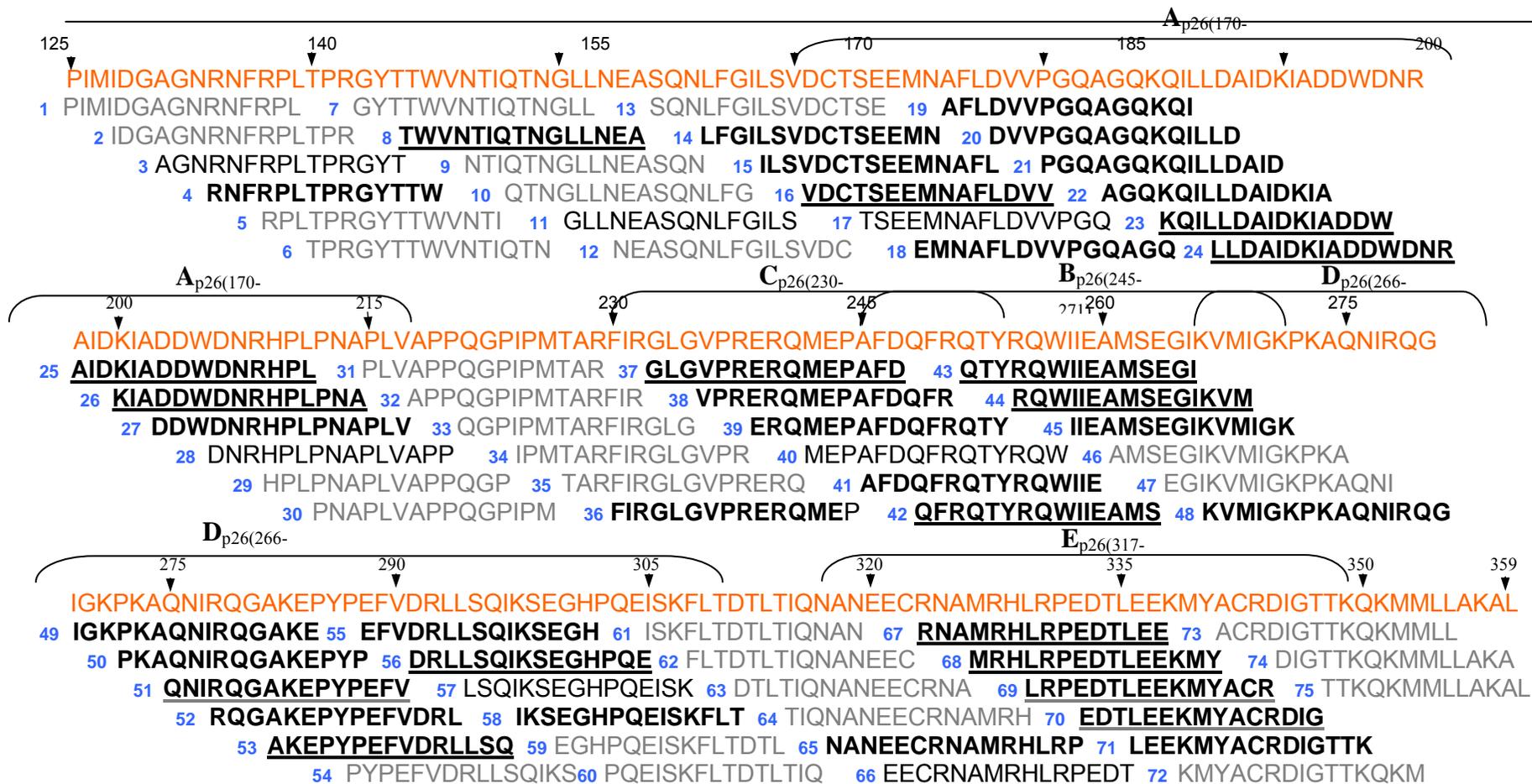
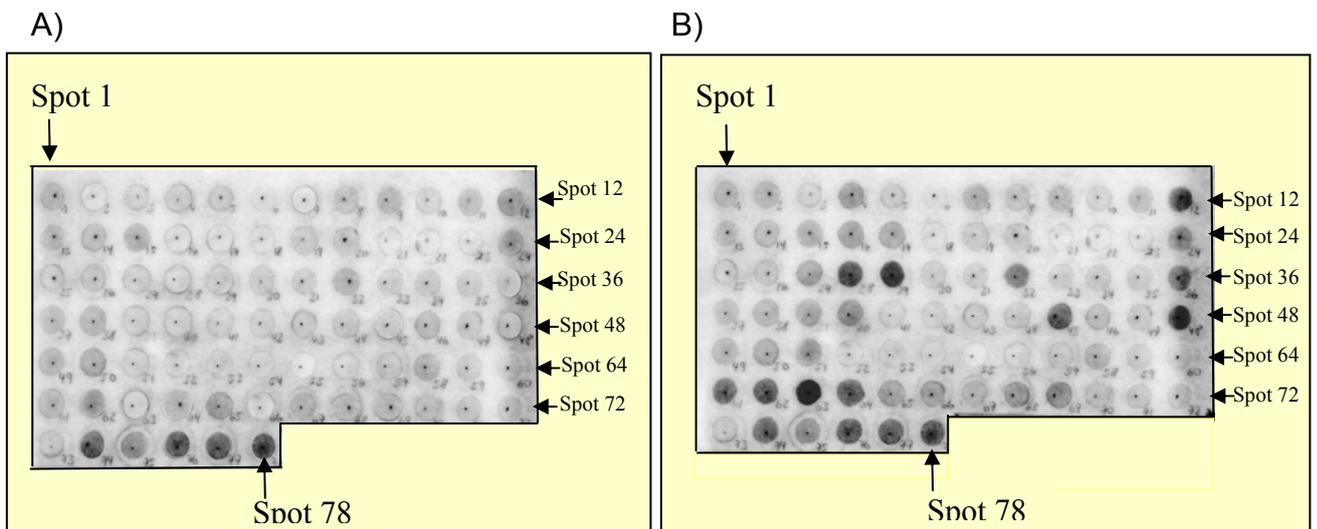


Figura 14. *Biblioteca peptídica de la proteína p26 del VAIE*. En rojo se representa la proteína completa (125-359), indicando con flechas la posición de los aa, con corchetes las regiones definidas, en azul los números de los spots, en negritas las secuencias más reactivas ($IR \geq 2,0$) de la proteína completa, subrayadas las de máxima reactividad en cada región y en grises las regiones no reactiva.

En la fotografía 7 se observan las imágenes de la membrana correspondiente al dominio C-terminal de la proteína, en la figura 15 se representan los valores de IR superiores a 1,7 (valor de corte) y en la figura 16 se muestran las secuencias de cada spot, resaltando las regiones más reactivas en negritas ($IR \geq 2,1$), y subrayadas las de máxima reactividad en cada grupo de spots con secuencias adyacentes.



Fotografía 7. *Biblioteca peptídica correspondiente al extremo C-terminal (277-359) de la proteína p26 del VAIE*. La membrana de celulosa contiene 78 spots, cada uno consiste en una secuencia de 6 residuos aminoacídicos que difieren entre si en un único aa. La membrana fue evaluada por ELISA: A) Frente a un “pool” de sueros negativos B) Frente a un “pool” de sueros positivos.

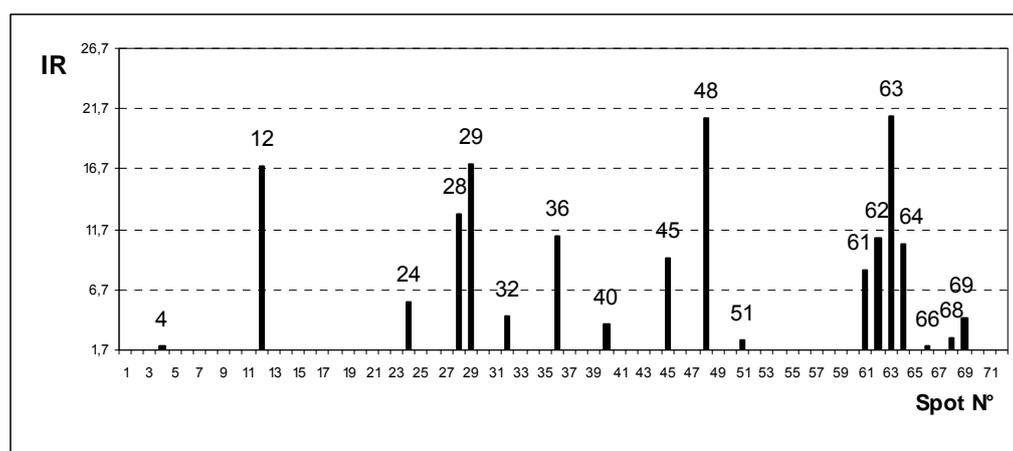


Figura 15. *Índices de reactividad (IR) correspondientes a la biblioteca peptídica de la región C-terminal₍₂₇₇₋₃₅₉₎ de la proteína p26*. En el eje de las ordenadas se representan los valores de IR superiores a 1,7 y en el eje de las abscisas los números de los spots.

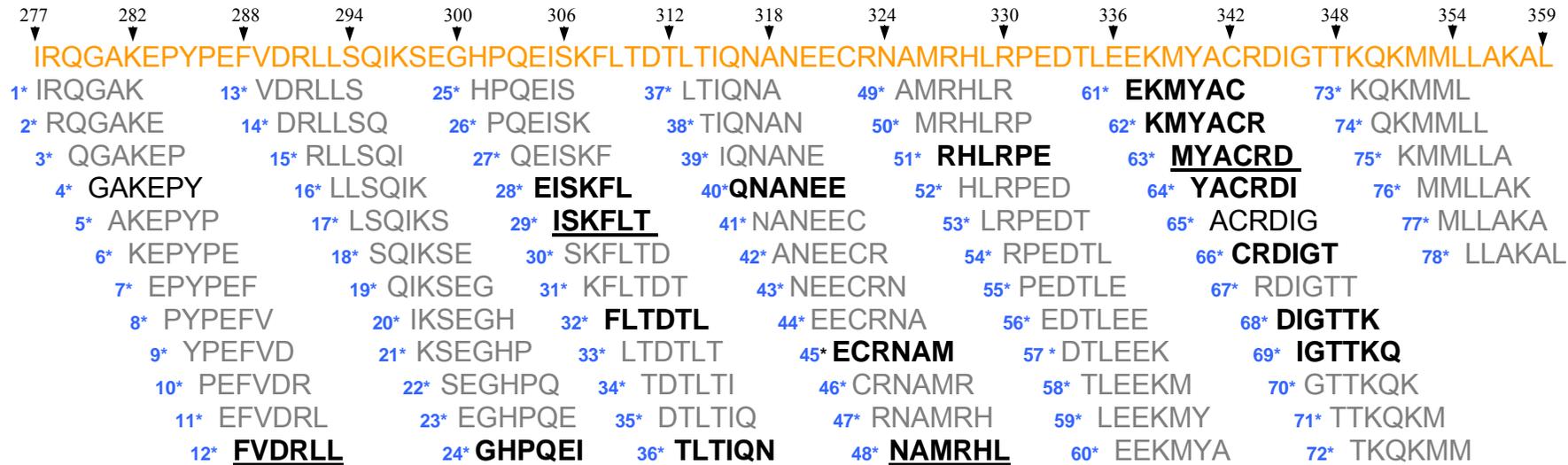


Figura 16. *Biblioteca peptídica del dominio C-terminal*₍₂₇₇₋₃₅₉₎ *de la proteína p26 del VAIE*. En rojo se representa la secuencias del extremo C-terminal de la proteína completa₍₂₇₇₋₃₅₉₎, indicando con flechas la posición de los aa, en azul los números de los spots, en negritas las regiones más reactivas ($IR \geq 2,1$) de la proteína completa, subrayadas las de máxima reactividad en cada región y en grises las regiones no reactivas.

Los resultados obtenidos con la biblioteca decapentapeptídica han permitido, según análisis de los IR, localizar 3 regiones de mayor reactividad, en el extremo aminoterminal de la proteína p 26,: A_{p26} (170-217) (spots 16-27), B_{p26} (245-271) (spots 41-45) y C_{p26} (230-253) (spots 36-39) (figura N° 13). Adicionalmente, sobre este mismo extremo N- terminal, se localizó otra región, aunque de menor reactividad, representada por el spot 8 (I WVNTIQTNGLLNEA)₍₁₄₆₋₁₆₀₎.

Respecto de la región A_{p26} (170-217), si bien la mayor reactividad esta centrada en los spots 23, 24, 25 y 26, siendo máxima en el spot 25₍₁₉₇₋₂₁₁₎, el spot 16 también presenta un IR destacado. En virtud de ello se considera que esta región estaría constituida principalmente por dos epitopes, VDCTSEEMNAFLDVV₍₁₇₀₋₁₈₄₎ y KQILLDAIDKIADDWDNRHPLPNA₍₁₉₁₋₂₁₄₎.

En la región B_{p26} (245-271), la mayor reactividad corresponde a los spots 42, 43 y 44, centrada en el spot 43₍₂₅₁₋₂₆₅₎, por lo que se estima la presencia del epitope QFRQTYRQWII EAMSEGIKVM₍₂₄₈₋₂₆₈₎ en esta región.

En lo referente a la región C_{p26} (230-253) la mayor reactividad esta centrada en el spot 37₍₂₃₃₋₂₄₇₎, por lo que la secuencia GLGVPRERQMEPAFD₍₂₃₃₋₂₄₇₎ podría también representar un epitope.

En el extremo C-terminal de la proteína p26 se localizaron dos regiones: D_{p26} (266-310) (spots 48 -58) y E_{p26} (317-349) (spots 65-71). En la primera de ellas la serie de spots mas reactivos [51_(275- 289), 53₍₂₈₁₋₂₉₅₎ y 56_(290- 304)] podrían evidenciar una región rica en epitopes ubicados preferentemente en las posiciones 275-304. En efecto, mediante la membrana hexapeptidica se localizarían tres epitopes, GAKEPY_(280- 285), FVDRL₍₂₈₈₋₂₉₃₎ y GHPQEI₍₃₀₀₋₃₀₅₎. Aunque con menor reactividad, los spots 48₍₂₆₆₋₂₈₀₎, 49₍₂₆₉₋₂₈₃₎ y 50₍₂₇₂₋₂₈₆₎ correspondientes a la región flexible que conecta ambos dominios, N- y C-terminal, resultaron también reactivos. Finalmente otro epitope EISKFLT₍₃₀₄₋₃₁₀₎, localizado en la membrana hexapeptidica, podría ser responsable de la reactividad observada en el spot 58₍₂₉₆₋₃₁₀₎.

En la región E_{p26} (317-349) las secuencias correspondientes a los spots 67₍₃₂₃₋₃₃₇₎, 68₍₃₂₆₋₃₄₀₎, 69₍₃₂₉₋₃₄₃₎ y 70₍₃₃₂₋₃₄₆₎ demostrarían tener la mayor reactividad, siendo máxima en el spot 67₍₃₂₃₋₃₃₇₎. Ello sería consecuencia probablemente de los siguientes epitopes: QNANEE₍₃₁₆₋₃₂₁₎, ECRNAM₍₃₂₁₋₃₂₆₎, NAMRHL₍₃₂₄₋₃₂₉₎ y EKMYACRDIGTTKQ₍₃₃₇₋₃₅₀₎ puestos en evidencia en la membrana hexapeptidica.

D.1.2.2 Mediante la utilización de los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.

Mediante un ELISA no competitivo indirecto, según se describe en la sección C.6.1, se determinó si los anticuerpos específicos presentes en los sueros de los animales infectados naturalmente con el VAIE eran capaces de reconocer a los mencionados péptidos.

Para ello se seleccionaron sueros de equinos infectados crónicos, Test de Coggins positivos, los que fueron enfrentados a cada uno de los péptidos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎. La reactividad de cada uno de estos sueros fue expresada como Porcentaje de Positividad (PP) (Figura 17).

El 96% y 95% de los sueros evaluados presentaron anticuerpos capaces de reconocer a los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ y gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎, respectivamente, en tanto que el 83% presentaron anticuerpos con reactividad para el péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.

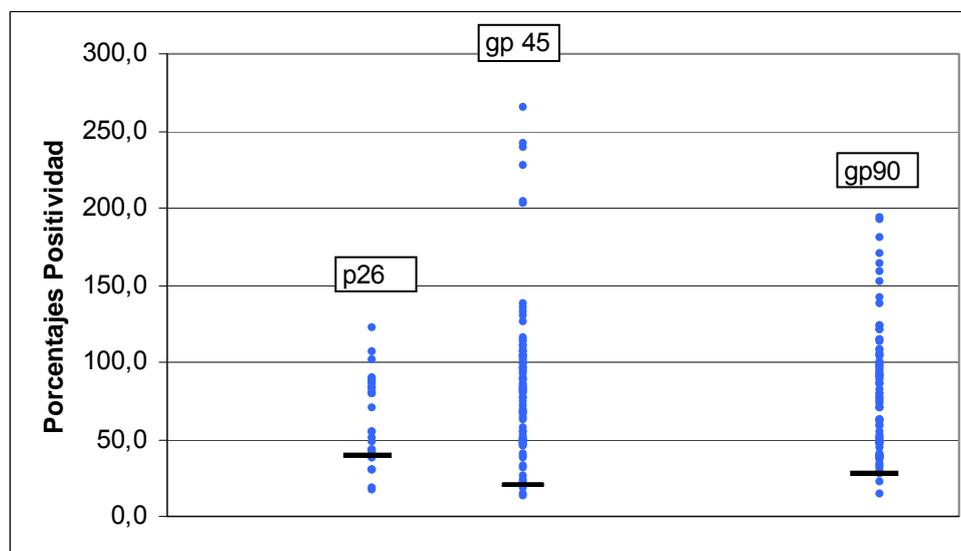


Figura 17. Reactividad de anticuerpos anti-VAIE frente a los péptidos p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ ($n=30$), gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ ($n=81$) y gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ ($n=81$). Los resultados son expresados como Porcentaje de Positividad (PP). Las líneas horizontales representan los valores de corte (p26:37 PP; gp45: 22 PP; gp90: 28 PP).

D.1.3 Evaluación de la inmunidad celular. Reconocimiento de linfocitos T, provenientes de equinos persistentemente infectados, por los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.

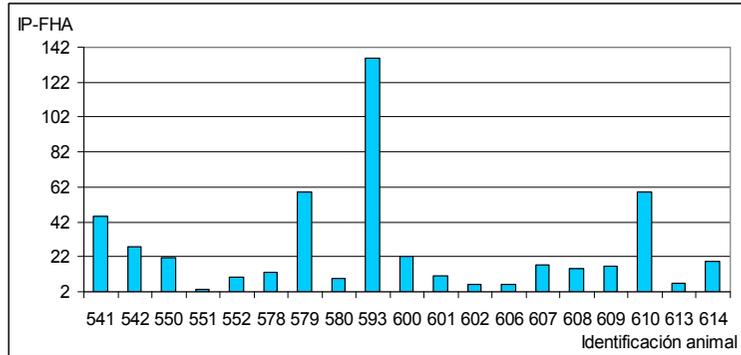
Con la finalidad de evaluar si los linfocitos, presentes en sangre periférica de equinos infectados, eran capaces de reconocer *in vitro*, a los péptidos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ e inducir linfoproliferación, se seleccionaron 19 animales serológicamente positivos y 16 animales serológicamente negativos, como control.

A partir de sangre periférica se obtuvieron las células mononucleares aplicando gradiente de Ficoll- Hypaque, las que fueron cultivadas (2×10^5 células/100 μ l), durante 5 días a 37 °C en ambiente de 5% CO₂ y en presencia de FHA o 0,5 μ g de cada uno de los péptidos, tal como se describiera en la sección C.8.4. La capacidad linfoproliferativa fue evaluada mediante el método de la BdU y los resultados, expresados como índices de proliferación (IP), se presentan en la figura 18. Se puede observar que solo uno de los 35 animales estudiados (551) presentó IP frente a FHA, inferior a 4.

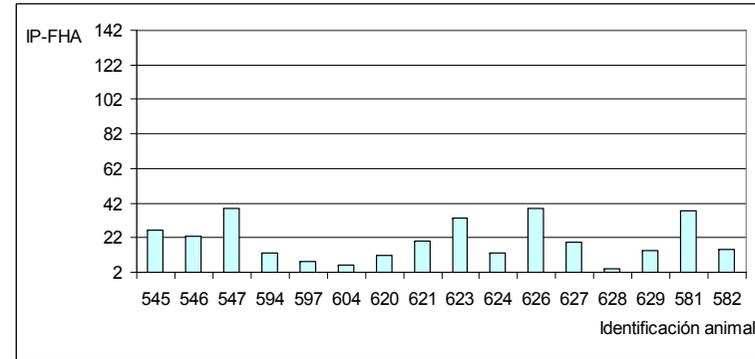
Cuando se analizaron los IP de los 19 animales serológicamente positivos, se observó que la gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ fue reconocida por linfocitos provenientes de 15 animales (79%), la gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ por 9 (47%) y la p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ solo por 6 (31%). Estos últimos fueron capaces de reconocer a los 3 péptidos.

Al analizar los IP de los equinos serológicamente negativos se observó que 2 de los 16 (12,5%) animales analizados reconocieron al menos uno de los tres péptidos. En efecto, el péptido gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ fue reconocido por los linfocitos equinos provenientes del animal identificado con el n° 626 y los péptidos gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ fueron reconocidos por linfocitos provenientes del equino n° 628.

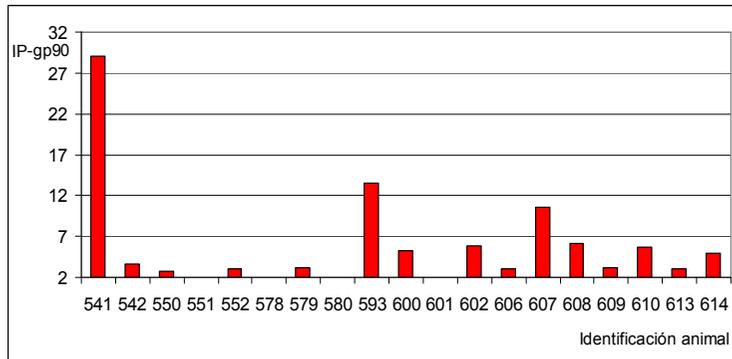
1A)



1B)



2A)



2B)

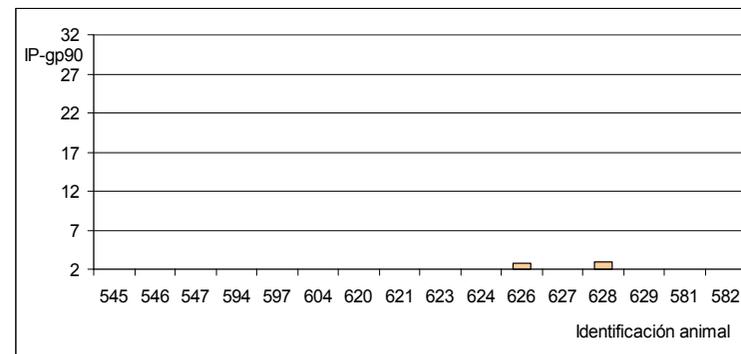
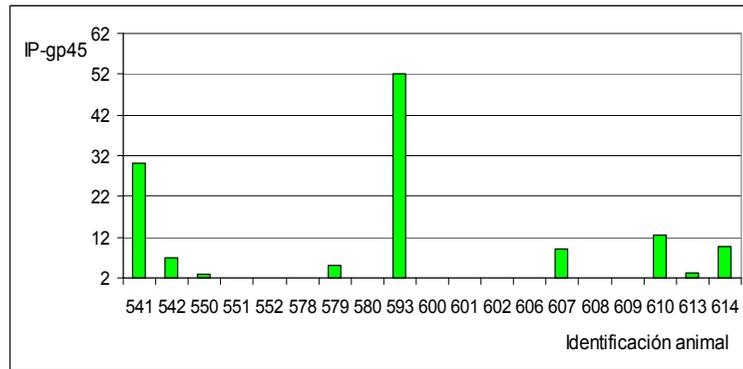
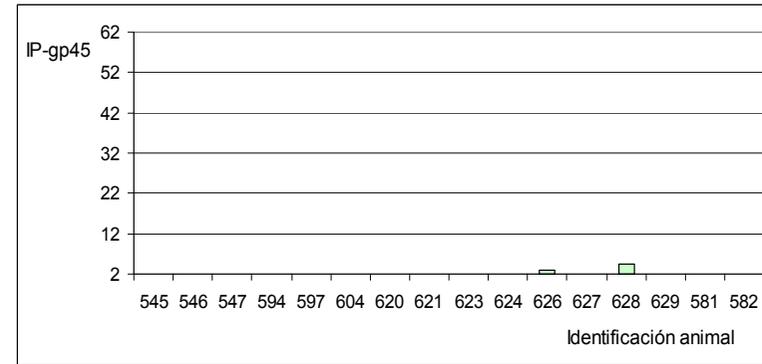


Figura 18. Índices de proliferación (IP), evaluados mediante ensayos de proliferación de células mononucleares equinas de sangre periférica, extraídas de 19 caballos con serología positiva (A) y de 16 con serología negativa (B). Las células fueron incubadas con FHA (1A-1B); gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ (2A-2B), gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ (3A- 3B) o p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ (4A- 4B) 5 días a 37°C, en ambiente de CO₂ al 5%

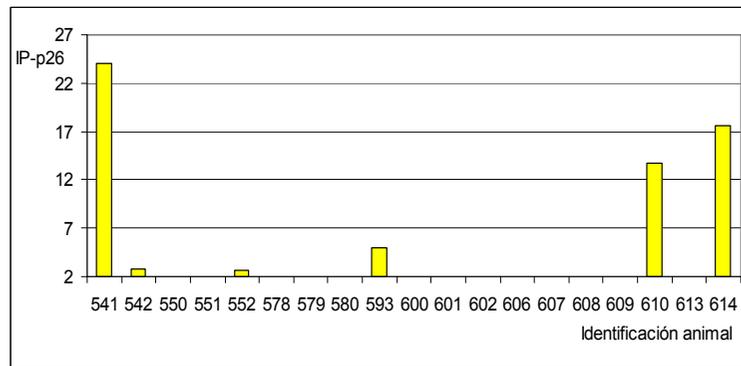
3A)



3B)



4A)



4B)

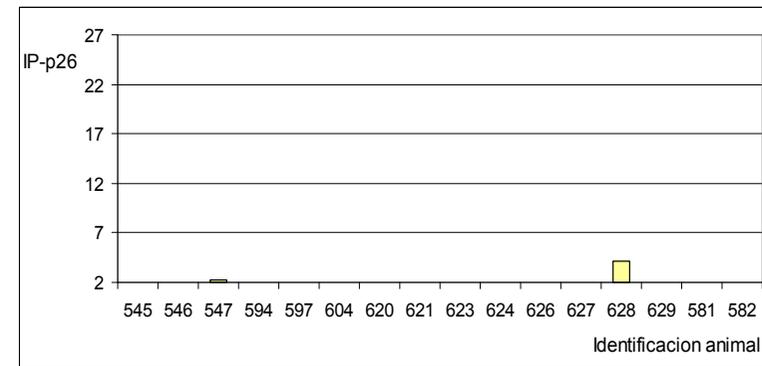


Figura 18 (continuación). *Índices de proliferación (IP), evaluados mediante ensayos de proliferación de células mononucleares equinas de sangre periférica, extraídas de 19 caballos con serología positiva (A) y de 16 con serología negativa (B). Las células fueron incubadas con FHA (1A-1B); gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ (2A-2B), gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ (3A- 3B) o p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ (4A-4B) 5 días a 37°C, en ambiente de CO₂ al 5%.*

D.2 Evaluación de la respuesta inmune en ratones BALB/c inmunizados con péptidos sintéticos.

A los efectos de evaluar la inmunogenicidad de cada péptido sintético, se inocularon ratones hembras BALB/c, cada 15 días y durante 3 meses, con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 (grupo 3) $\mu\text{g}/\text{animal}$ de cada uno de los péptidos, emulsionados con ACF. A cada uno de los animales en estudio se les extrajo sangre de cavidad retroorbital previo a la inoculación y a los 20, 34, 48, 64, 72 y 90 días posteriores a la primera inoculación. Por otra parte, a los inoculados con gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ se les extrajo el bazo al final del período de inmunización para separar las células mononucleares.

D.2.1 Ratones inmunizados con gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎.

Para determinar el carácter inmunogénico de este péptido se estudió su capacidad para inducir una respuesta inmune humoral, mediante la síntesis de anticuerpos específicos, y celular mediante el análisis de las citoquinas IL-4 e IFN γ .

D.2.1.1 Evaluación de la inmunidad humoral.

D.2.1.1a Determinación de los niveles séricos de anticuerpos anti-gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎.

El nivel de anticuerpos anti gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ fue determinado mediante ELISA no competitivo indirecto, tal como se describe en la sección C.6.1, en ratones inoculados con 0, 20 ó 100 μg de péptido, a los 0, 20, 34, 48, 64, 75 y 90 días de inoculación. Los resultados obtenidos, analizados estadísticamente, se representan en la figura 19.

Se observa que los ratones inoculados con 20 μg (n=5) no sintetizaron anticuerpos anti-gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, en tanto que los inoculados con 100 μg (n=5) presentaron niveles significativamente superiores respecto a los inoculados con 0 (n=5) ó 20 μg de péptido.

A partir del día 64, 7 días posterior a la 5^a inoculación, se observaron diferencias significativas con valores de PP superiores al valor de corte (PP =20,1) entre los grupos 1 y 3 (grupo1 vs grupo 3, días 64, 75 y 90, $p<0,05$)

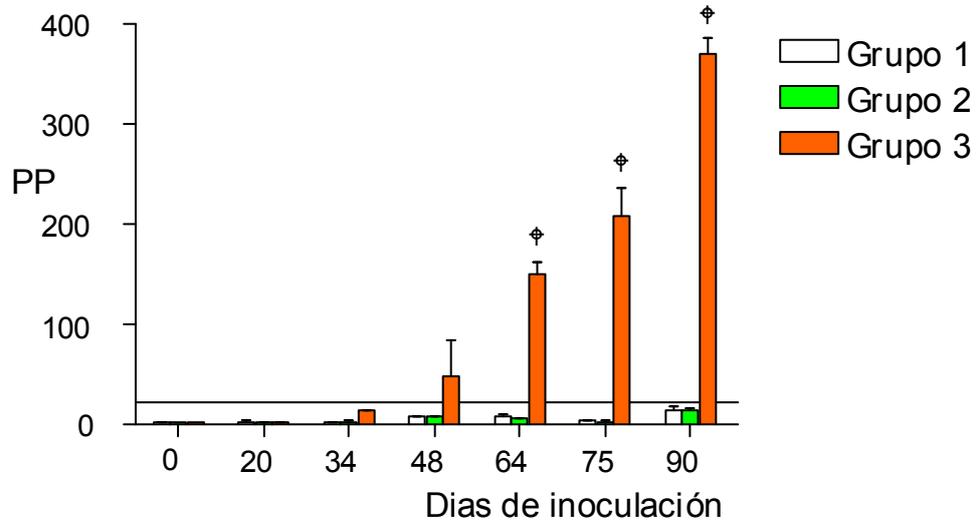


Figura 19. Niveles séricos de anticuerpos anti-gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, evaluados por ELISA, en ratones BALB/c ($n=15$) inoculados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 μg (grupo 3) de gp 90₍₄₁₆₋₄₄₄₎. Los resultados se expresan como Porcentaje de Positividad (PP) de los sueros diluidos 1/100, siendo el valor de corte de PP 20,1. Las barras representan los valores medios \pm SEM y los asteriscos () indican diferencias significativas respecto del grupo 1 ($p < 0.05$).

En el suero de aquellos ratones que presentaron resultados de PP superiores al valor de corte (PP=20,1) (grupo 3), se semi-cuantificó el nivel de anticuerpos específicos, mediante ELISA, empleando diluciones seriadas de los sueros, según se detalla en el ítem C.6.2. Los resultados obtenidos mostraron un aumento progresivo de los títulos de anticuerpos a partir del día 64 de inoculación, alcanzando a los 90 días, valores superiores a 1/32000.

D.2.1.1b Reconocimiento de los anticuerpos anti-péptido por el epítipo nativo de la proteína viral gp 90.

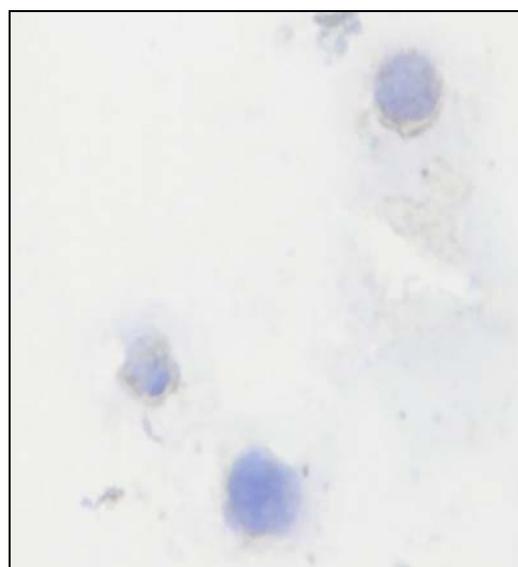
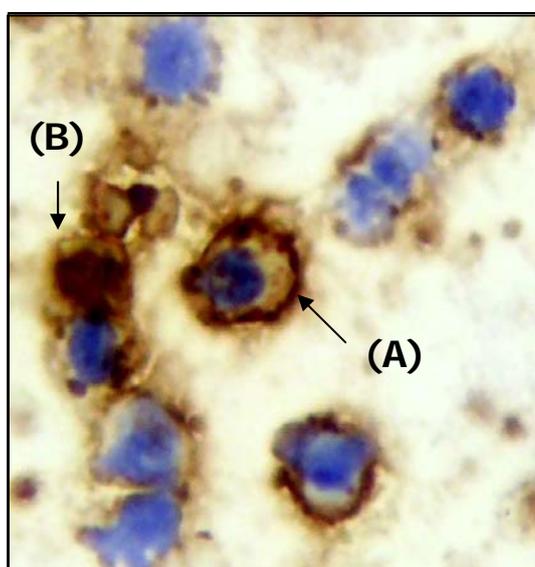
A los efectos de evaluar si el anticuerpo murino, anti-péptido gp 90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, era capaz de reconocer a su epítipo nativo presente en la proteína viral, los sueros de ratones del grupo 3, obtenidos a partir del día 90 y diluidos 1/50, se incubaron con monocitos obtenidos de un bazo proveniente de un caballo infectado con el VAIE, (equino identificado con el número 637) en el

período agudo de la enfermedad. La reacción Ag- Ac se puso en evidencia mediante inmunohistoquímica, empleando anti-Ig de ratón conjugada con biotina, según se describe en la sección C.9.

En la fotografía 8a se observa que los anticuerpos murinos han reconocido, principalmente, a los antígenos virales presentes en la membrana citoplasmática de las células mononucleares (monocitos) (A), reconociendo además, antígenos virales intracitoplasmáticos (B). La imagen de la fotografía 8b corresponde a células mononucleares esplénicas del mismo equino infectado, incubadas con suero de ratones del grupo 1 (grupo control). Similares imágenes fueron obtenidas al enfrentar células mononucleares esplénicas provenientes de un equino sin infectar (identificado con el número 581), incubadas con suero de ratones del grupo 3 (imagen no presente en este trabajo).

8a)

8b)



Fotografía 8. Células mononucleares esplénicas provenientes de animales infectados con el VAIE incubadas con a) suero murino del grupo 3 inoculado con gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ (día 90), o con b) suero murino del grupo 1 (día 90) y luego con un conjugado anti-murino biotinilado. La interacción Ag-Ac se evidencia por un precipitado marrón, reacción enzimática de la peroxidasa con su sustrato DAB.

D.2.1.2 Evaluación de la inmunidad celular.

Con la finalidad de detectar si el péptido gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ inoculado era capaz de estimular clones celulares productores de citoquinas tipo 1 o tipo 2, se cuantificaron las citoquinas IFN γ e IL-4, respectivamente.

D.2.1.2a Determinación de los niveles séricos de IFN γ .

Los niveles séricos de IFN γ murino fueron evaluados por duplicado aplicando ELISA de captura (R&D, System), tal como se describiera en la sección C.6.3. Se realizaron, en forma paralela, las correspondientes curvas estándares utilizando IFN γ recombinante murino en concentraciones comprendidas entre 0- 600 pg/ml. Los datos obtenidos se presentan mediante puntos en un eje de coordenadas cartesianas: logaritmo de las lecturas de DO vs logaritmo de la concentración de IFN γ (pg/ml). La ecuación de la recta fue determinada mediante análisis de regresión lineal y realizada bajo el programa Microsoft, planilla de cálculo Excel (figura 20).

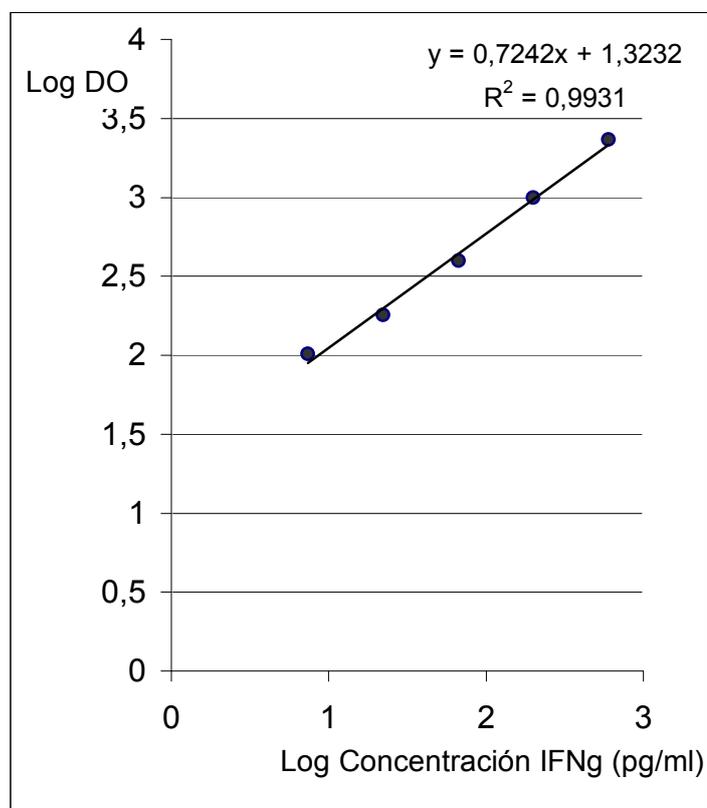


Figura 20. Curva estándar de IFN γ . En el eje de las abscisas se representa el logaritmo de la concentración de IFN γ , expresada en pg/ml y en el eje de ordenadas el logaritmo de las lecturas de las DO correspondiente al promedio de tres determinaciones realizadas en cada dilución.

Los resultados obtenidos, luego de ser analizados estadísticamente, demuestran un aumento de $IFN\gamma$ en el grupo 2 y grupo 3 respecto del grupo 1 a los 48 y 64 días de la primer inoculación (grupo 2 vs grupo 1, $p < 0,05$; grupo 3 vs grupo 1 $p < 0,05$). La diferencia entre ambos grupos radica en que los animales del grupo 3 comenzaron a sintetizar esta interleuquina a los 20 días de iniciado el plan de inoculación (grupo 3 vs grupo 1 $p = 0,004$). Los resultados obtenidos se representan en la figura 21.

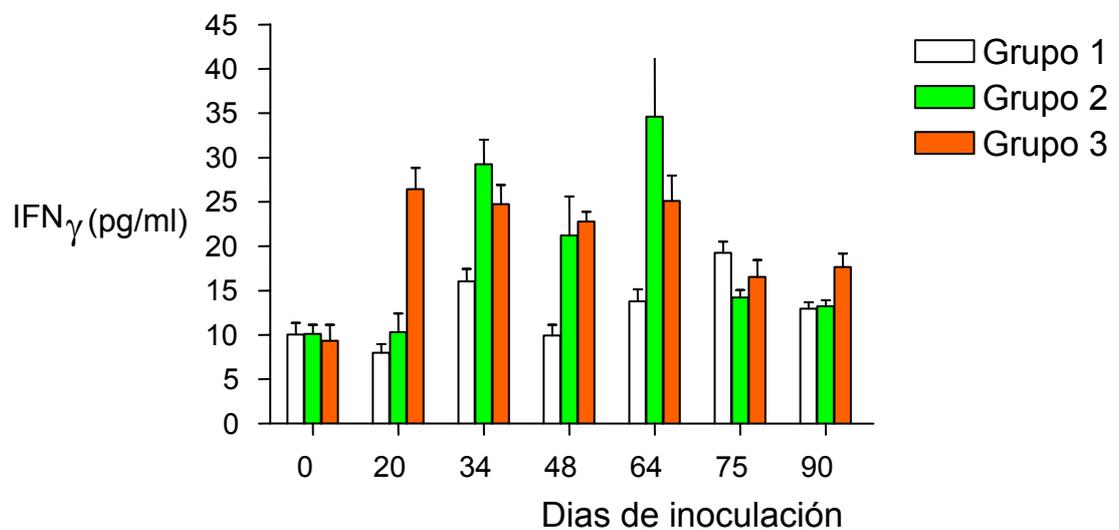


Figura 21. Niveles séricos de $IFN\gamma$, evaluados por ELISA de captura, en ratones BALB/c ($n=15$) inoculados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 μg (grupo 3) de $gp\ 90_{(416-444)}$. En el eje de las ordenadas se expresan, en pg/ml, los valores obtenidos de dicha interleuquina y el eje de las abscisas los días de inoculación. Las barras representan los valores medios \pm SEM, los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto del grupo 1 ($p < 0.05$).

D.2.1.2 b Determinación de los niveles séricos de IL-4.

Los niveles séricos de IL-4 fueron evaluados por duplicado, aplicando ELISA de captura (R&D System), tal como se describiera en el punto anterior. En este caso las muestras séricas de los grupos 1, 2 y 3 fueron diluidas 3 veces en líquido diluyente (R&D System) y el conjugado utilizado fue un anticuerpo polyclonal anti-IL-4 murino conjugado a peroxidasa. La curva

estándar fue realizada utilizando IL-4 recombinante murina en concentraciones comprendidas entre 0 y 500 pg/ml, tal como se representa en la figura 22.

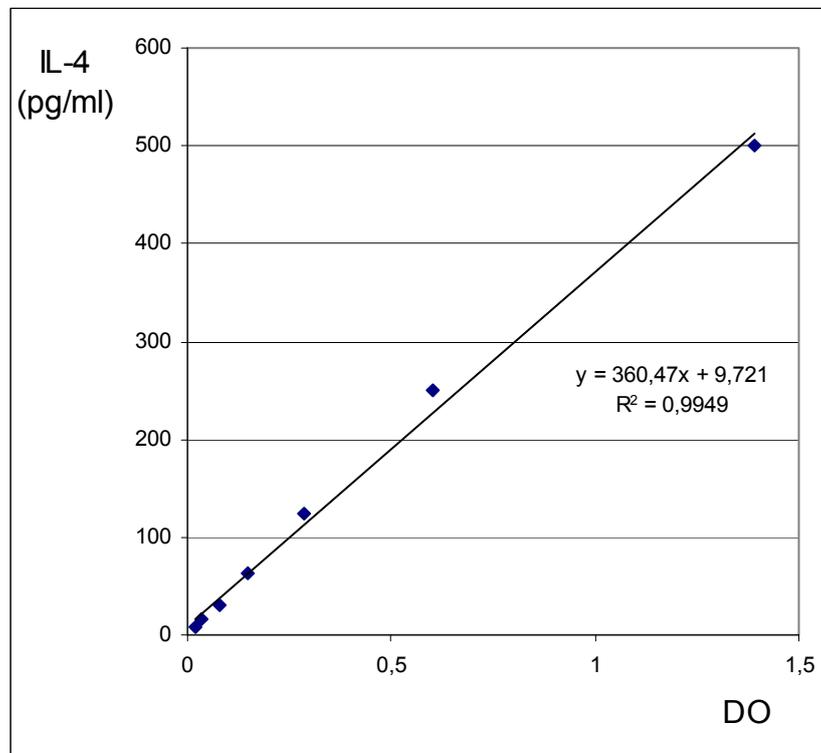


Figura 22. *Curva estándar de IL-4.* En el eje de las abscisas se representan las lecturas de las densidades ópticas (DO) correspondiente al promedio de tres determinaciones realizadas de cada dilución y en el eje de las ordenadas la concentración de IL-4, expresada en pg/ml.

Los resultados obtenidos mostraron niveles inferiores de IL-4, el día 48 de inoculación, en el grupo 2 respecto del grupo 1 (control) ($p=0.029$). En la figura 23 se representan los valores obtenidos de esta interleuquina.

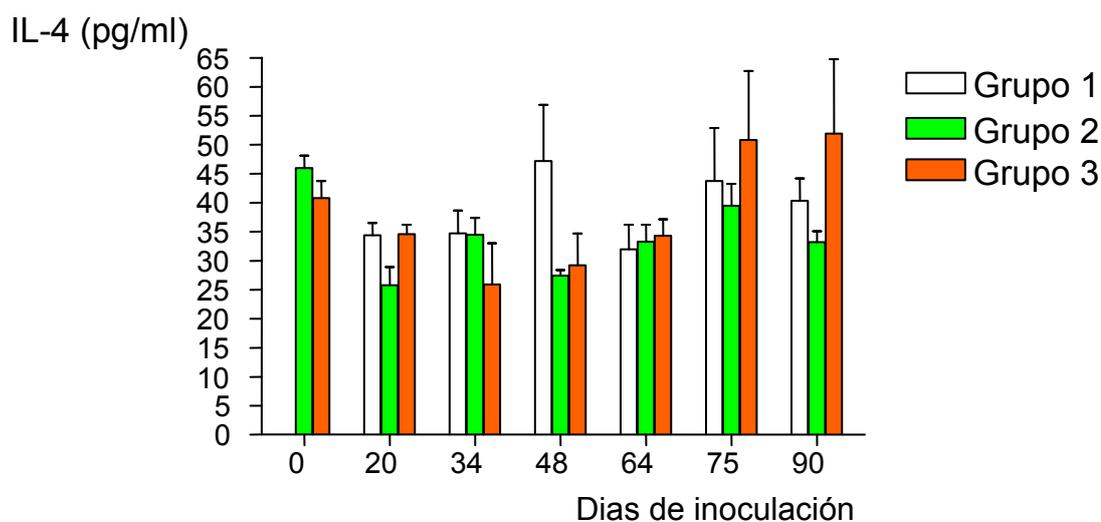


Figura 23. Niveles séricos de IL-4, evaluados por ELISA de captura, en ratones BALB/c ($n=15$) inoculados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 μg (grupo 3) de gp 90. En el eje de las ordenadas se expresan, en pg/ml, los valores obtenidos de dicha interleuquina y el eje de las abscisas los días de inoculación. Las barras representan los valores medios \pm SEM y el asteriscos () indica diferencias significativas respecto del grupo 1 ($p < 0.05$).

D.2.2 Ratones inmunizados con gp 45₍₅₂₂₋₅₄₆₎.

D.2.2.1 Evaluación de la inmunidad humoral.

D.2.2.1a Determinación de los niveles séricos de anticuerpos anti-gp 45₍₅₂₂₋₅₄₆₎.

Los niveles séricos de anticuerpos anti-péptido gp 45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ fueron evaluados por duplicado aplicando ELISA, tal como se describiera en la sección C.6.1 , e incubando los sueros incógnitas ó de referencia con el péptido gp 45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ adsorbido a la placa. Los niveles de anticuerpos encontrados a los 0, 20, 34, 48, 64, 75 y 90 días de inoculación, expresados como porcentaje de positividad (PP), se representan en la figura 24.

Los resultados encontrados indican que el grupo 2 comienza a sintetizar anticuerpos a partir del día 48 manteniendo niveles significativamente superiores al grupo control hasta el día 64, sin tener registros posteriores debido a la pérdida de los animales. El análisis de resultados provenientes del

grupo 3 muestra niveles superiores de anticuerpos al grupo 1 (control) a partir del día 48, manteniéndose elevados hasta finalizar la experiencia ($p < 0.05$).

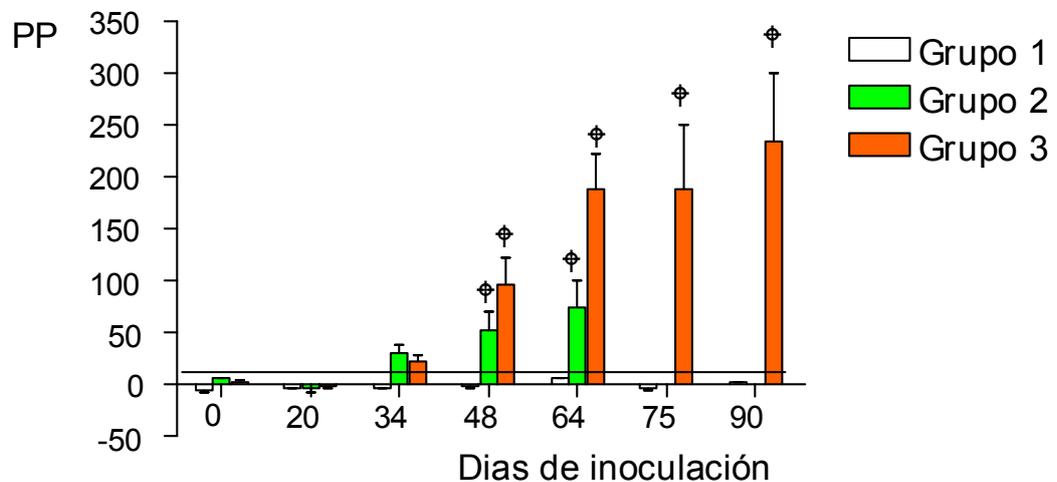


Figura 24. Niveles séricos de anticuerpos anti- $gp45_{(522-546)}$, evaluados por ELISA, en ratones BALB/c ($n=15$) inoculados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 μg (grupo 3) de $gp 45_{(522-546)}$. Los resultados se expresan como Porcentaje de Positividad (PP) de los sueros diluidos 1/100, siendo el valor de corte de PP=8. Las barras representan los valores medios \pm SEM y los asteriscos () indican diferencias significativas respecto del grupo 1 ($p<0.05$).

Por otra parte se determinó, mediante ELISA según se detalla en la sección 6.2, el nivel de anticuerpos en aquellos sueros que presentaban PP superiores al valor de corte (PP=8). El título máximo (1/1000) se observó a los 48 y 64 días de inoculación en el grupo 2 (20 μg /animal), en tanto que los inoculados con 100 μg (grupo 3) tuvieron títulos comprendidos entre 1/2000 y 1/8000 a los 48 días, llegando hasta 1/32000 en los días 75 y 90 de inoculación.

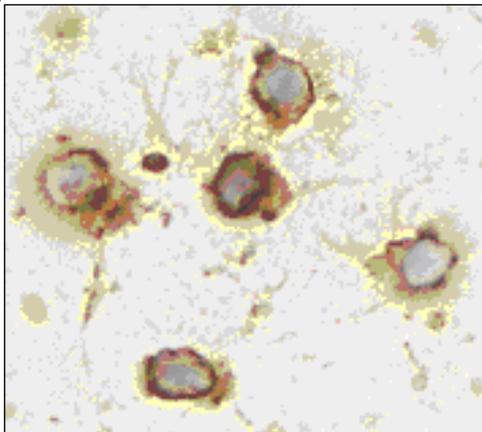
D.2.2.1 b Reconocimiento de los anticuerpos anti-péptido por el epítopo nativo de la proteína viral $gp45_{(522-546)}$.

El reconocimiento del anticuerpo anti-péptido $gp45_{(522-546)}$ por su correspondiente epítopo ubicado en la proteína nativa viral, se realizó aplicando inmunohistoquímica como se describiera previamente para $gp90_{(416-}$

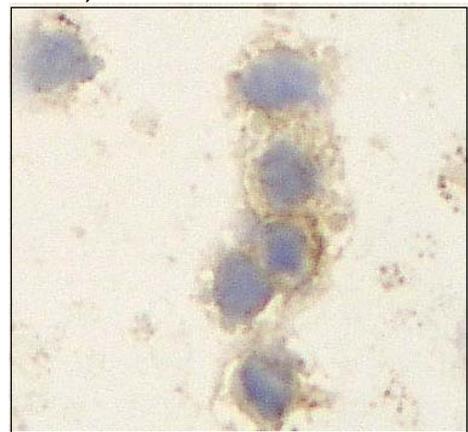
444). Se emplearon sueros de ratones con títulos 1/32000 obtenidos a partir del día 75 y 90 de inoculación. Estos, una vez diluidos 1/50, fueron incubados con monocitos provenientes de un animal infectado con el VAIE y con sintomatología clínica de fase aguda (equino identificado con el número 637). La reacción Ag- Ac se puso en evidencia con un suero con actividad anti-Ig de ratón conjugado con biotina, según se describe en la sección C.9.

En la fotografía 9a se observa el reconocimiento del anticuerpo murino anti péptido gp 45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ hacia las proteínas virales nativas presentes en la membrana de las células mononucleares infectadas, evidenciado por el precipitado marrón de la enzima DAB. Se tiene como referencia la fotografía 9b, correspondiente a células mononucleares infectadas incubadas con suero de ratones del grupo 1 y tratadas de igual manera.

9a)



9b)



Fotografía 9. Células mononucleares esplénicas provenientes de animales infectados con el VAIE incubadas con a) suero murino del grupo 3 inoculado con gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ (día 90), o con b) suero murino del grupo 1 (día 90) y luego con un conjugado anti-murino biotinilado. La interacción Ag-Ac se evidencia por un precipitado marrón, reacción enzimática de la peroxidasa con su sustrato DAB.

D.2.2.2 Evaluación de la inmunidad celular. Determinación de linfoproliferación específica e inespecífica.

Con la finalidad de evaluar si el péptido gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ inducía linfoproliferación, los animales provenientes de los tres grupos de ratones, inoculados con 0, 20 y 100 µg de péptido y entre los 7 a 10 días posteriores a la última inoculación (97-100 días), fueron sacrificados a los efectos de obtener las células mononucleares esplénicas. Dichas células (2×10^5 células/100 µl) fueron cultivadas *in vitro*, durante 5 días a 37°C en ambiente de 5% CO₂, con FHA ó 0,5 µg de gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎, tal como se describiera en las secciones C.8.1 y C.8.4.

La capacidad linfoproliferativa fue evaluada mediante el método de la BrdU y los resultados, expresados como índice de proliferación (IP), se representan en la figura 25.

Los resultados muestran diferencias significativas entre el grupo 1 y los inoculados con el péptido gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ (grupo 1 vs grupo 2, $p=0,045$; grupo 1 vs grupo 3, $p=0,032$). Los tres grupos presentaron similares valores de IP al estimular con FHA (grupo 1 vs grupo 2, grupo 1 vs grupo 3, $p=0,413$).

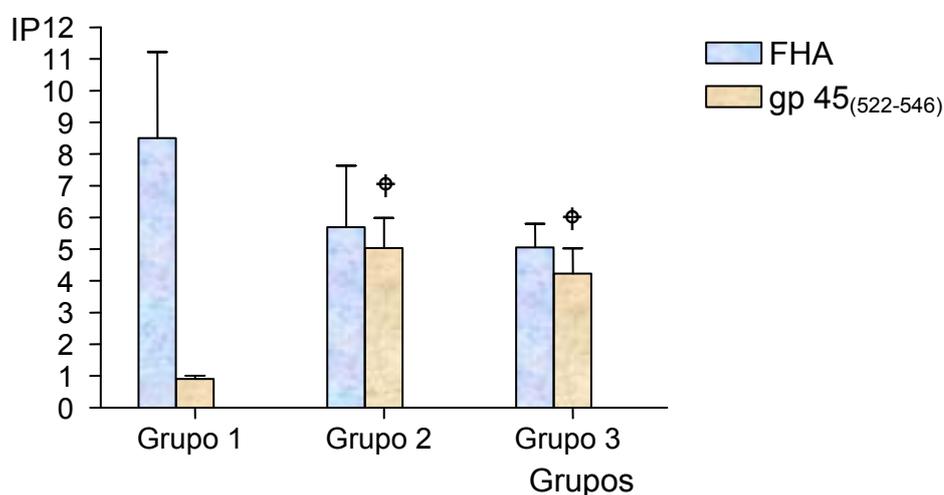


Figura 25. Índices de proliferación, evaluados mediante incorporación de BrdU en células mononucleares esplénicas de ratón, inmunizados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) o 100 (grupo 3) µg de gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎. Las células fueron incubadas con gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ o FHA 5 días a 37°C, en ambiente de CO₂ al 5%. Las barras representan los valores medios \pm SEM y los asteriscos (⊕) indican diferencias significativas respecto del grupo 1 ($p < 0.05$).

D.2.3 Ratones inmunizados con p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.D.2.3.1 *Evaluación de la inmunidad humoral.*D.2.3.1a Determinación de los niveles séricos de anticuerpos anti-p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.

Los niveles séricos de anticuerpos anti-péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ fueron evaluados por duplicado aplicando ELISA indirecto no competitivo, como se describiera anteriormente. En este caso el péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ fue adsorbido a las placas de poliestireno y sobre ellas se incubaron los sueros murinos, diluidos 1/100. Los niveles de anticuerpos encontrados a los 0, 20, 34, 48, 64, 75 y 90 días de inoculación, expresados como porcentaje de positividad (PP) se representan en la figura 26.

Los resultados muestran un aumento significativo en los niveles de anticuerpos, respecto al grupo 1 (control), a partir del día 34 en los ratones inoculados con 20 µg (grupo 2) y con 100 µg (grupo 3). Estos valores se mantuvieron hasta finalizar la experiencia.

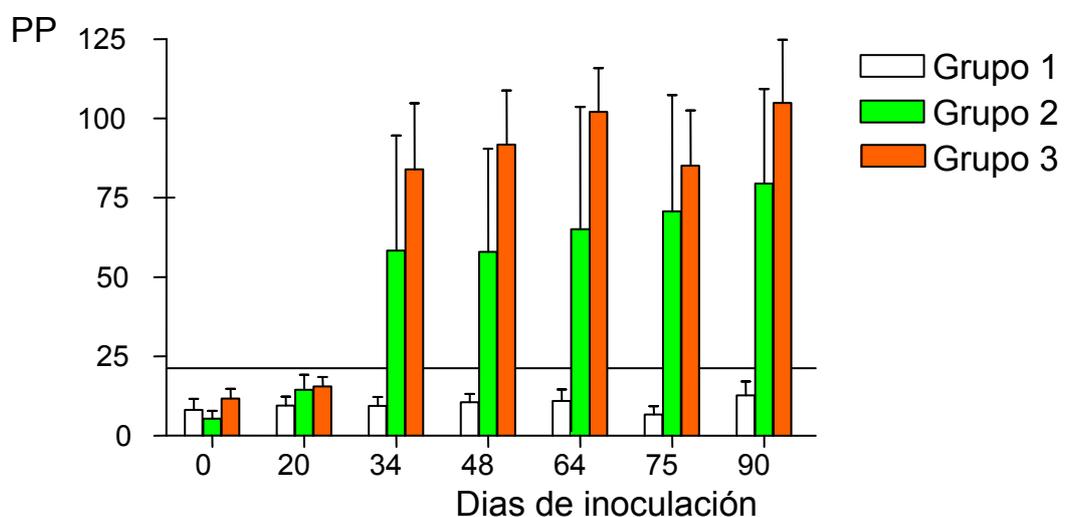


Figura 26. Niveles séricos de anticuerpos anti-p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, evaluados por ELISA, en ratones BALB/c (n=15) inoculados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 µg (grupo 3) de p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎. Los resultados se expresan como Porcentaje de Positividad (PP) de los sueros diluidos 1/100, siendo el valor de corte PP= 21. Las barras representan los valores medios ± SEM y los asteriscos () indican diferencias significativas respecto del grupo 1 (p<0.05).

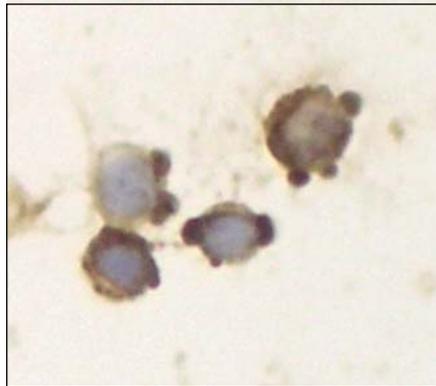
Por otra parte se determinó, mediante ELISA, el nivel de anticuerpos en aquellos sueros que presentaban PP superiores al valor de corte. En aquellos animales inoculados con 20 µg de péptido (grupo 2) los títulos fueron entre 1/100 y 1/500 a partir del día 34 de inoculación, a excepción de solo un animal que presentó un valor de 1/4000 a partir del día 48, manteniéndose hasta el final de la inoculación. Los títulos de los sueros de animales inoculados con 100 µg (grupo 3) fueron comprendidos entre 1/500 y 1/1000 a partir del día 34, alcanzando a los 90 días un título de 1/4000.

D.2.3.1b Reconocimiento de los anticuerpos anti-péptido por el epitope nativo de la proteína viral p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.

Para evaluar si el anticuerpo anti-péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ era capaz de reconocer el epitope nativo de la proteína viral p26, se empleó inmunohistoquímica como se describiera anteriormente. A tal efecto, células esplénicas obtenidas de un animal infectado en fase aguda (equino identificado con el número 637) fueron fijadas en portaobjetos e incubadas con aquellos sueros de mayor título (1/4000), diluidos 1/50, según lo descrito en la sección C.9 . Luego de incubar con un anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado a biotina, se puso de manifiesto la reacción Ag– Ac como se describiera anteriormente (fotografía 10).

En la fotografía 10a se observa el reconocimiento del anticuerpo murino anti-péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ hacia las proteínas virales nativas presentes en la membrana de las células mononucleares infectadas, evidenciado por el precipitado marrón de la reacción enzimática. Se tiene como referencia la fotografía 10b, correspondiente a células mononucleares infectadas incubadas con suero de ratones del grupo 1 y tratadas de igual manera.

10 a)



10 b)



Fotografía 10. *Células mononucleares esplénicas provenientes de animales infectados con el VAIE incubadas con a) suero murino del grupo 3 inoculados con p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, (día 90) o con b) suero murino del grupo 1 (día 90) y luego con un conjugado anti-murino biotinilado. La interacción antígeno-anticuerpo se evidencia por un precipitado marrón, reacción enzimática de la peroxidasa con su sustrato DAB.*

D.2.3.2 *Evaluación de la inmunidad celular.*

Con la finalidad de detectar si el péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ inoculado era capaz de estimular clones celulares productores de citoquinas tipo 1 o tipo 2, se cuantificó IFN γ e IL-4, respectivamente.

D.2.3.2a Determinación de los niveles séricos de IFN γ .

La determinación de los niveles séricos de IFN γ murino, inoculados con p26, en dosis de 0; 20 y 100 μ g/ animal fue realizada como se describiera para gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎. Los valores obtenidos se calcularon mediante la correspondiente curva estándar, efectuada con concentraciones conocidas de IFN γ recombinante murino. La recta obtenida se representó mediante puntos en un eje de coordenadas cartesianas: logaritmo de las lecturas de DO vs logaritmo de la concentración de IFN γ (pg/ml). La ecuación de la recta fue determinadas mediante análisis de regresión lineal y realizada bajo el programa Microsoft, planilla de cálculo Excel (figura 27).

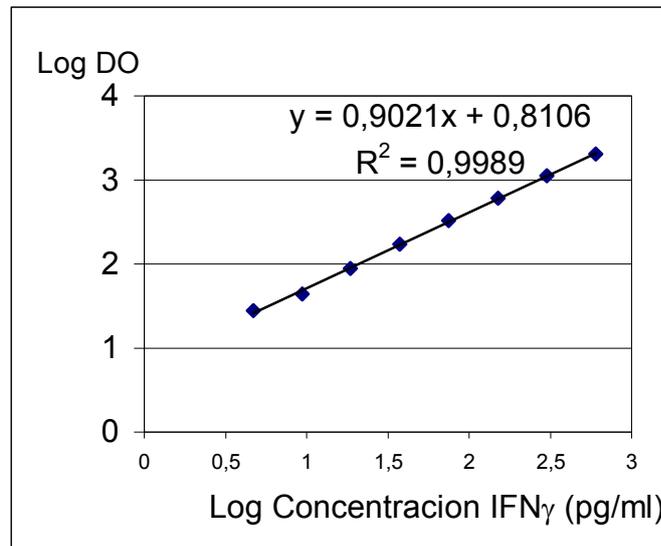


Figura 27. *Curva estándar de IFN γ* . En el eje de las abscisas se representa el logaritmo de la concentración de IFN γ , expresada en pg/ml y en el eje de ordenadas el logaritmo de las lecturas de las DO, correspondiente al promedio de tres determinaciones realizadas en cada dilución.

Los resultados obtenidos de IFN γ sérico murino fueron, en aquellos animales inoculados con 20 μ g (grupo 2), menores respecto del control (grupo 1) a los 20, 48, 64 y 90 días de inoculación ($p < 0,05$). Cuando se analizaron los niveles de IFN γ en aquellos animales inoculados con 100 μ g (grupo 3) se observó un aumento significativo el día 20 de inoculación ($p = 0,004$) y una disminución a partir del día 34 ($p < 0,05$).

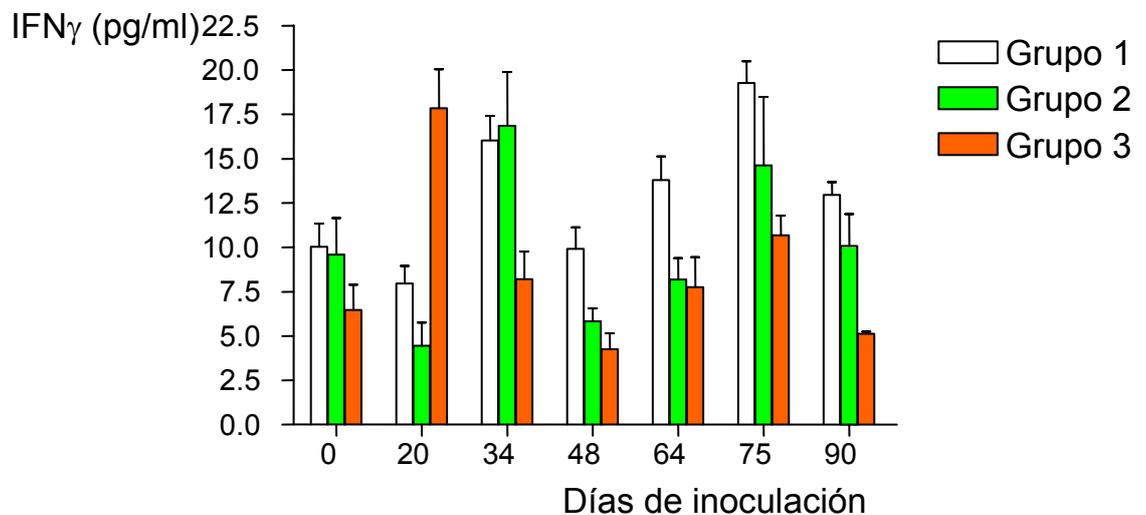


Figura 28. Niveles séricos de $IFN\gamma$, evaluados por ELISA de captura, en ratones BALB/c ($n=15$) inoculados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 μg (grupo 3) de $p26_{(318-346)}$. En el eje de las ordenadas se expresan, en pg/ml, los valores obtenidos de dicha interleuquina y el eje de las abscisas los días de inoculación. Las barras representan los valores medios \pm SEM, los asteriscos () indican diferencias significativas respecto del grupo 1 ($p < 0.05$).

D.2.3.2 b Determinación de los niveles séricos de IL-4.

La determinación de los niveles séricos de IL-4 en ratones BALB/c inoculados con 0, 20 y 100 μg $p26_{(318-346)}$ se realizó mediante ELISA de captura, tal como se describiera anteriormente. La curva estándar se realizó empleando IL-4 recombinante murina en concentraciones comprendidas entre 0 y 500 pg/ml.

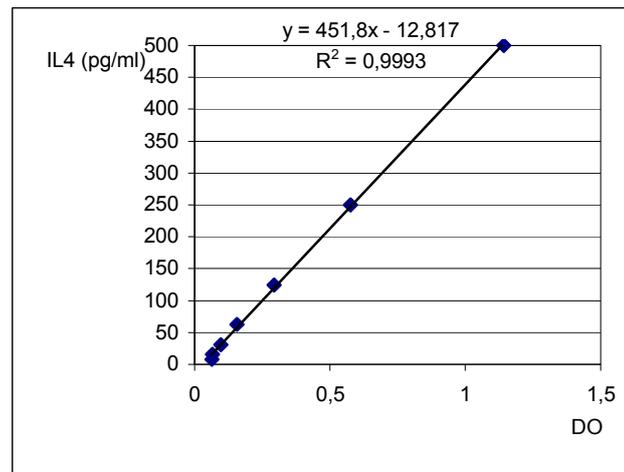


Figura 29. *Curva estándar de IL-4*. En el eje de las abscisas se representan las lecturas de las DO, correspondiente al promedio de tres determinaciones realizadas en cada dilución y en el eje de ordenadas la concentración de IL-4, expresada en pg/ml

Los resultados obtenidos de IL-4 sérica, expresados en pg/ml y representados en el gráfico en la figura 30, muestran que no hubo diferencias significativas a lo largo de las inoculaciones.

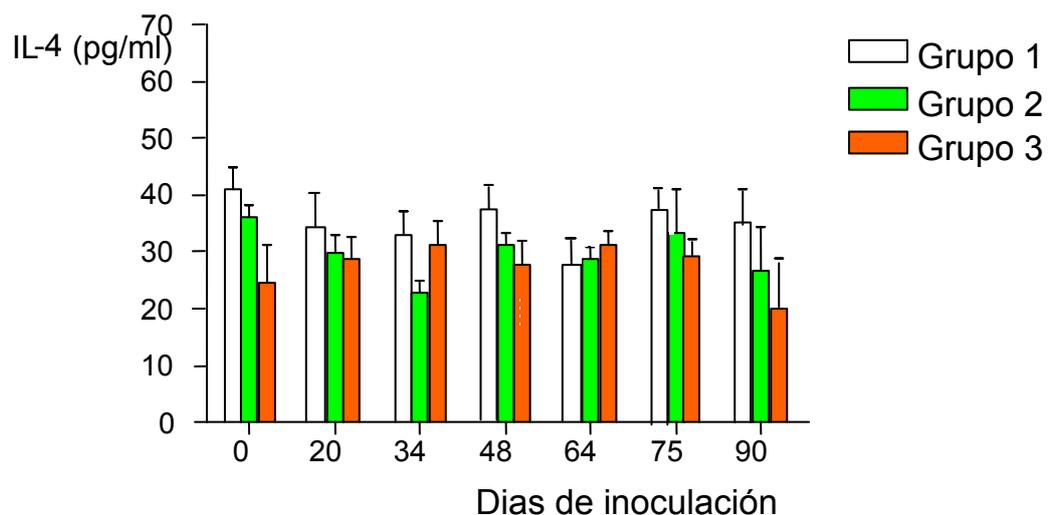


Figura 30. *Niveles séricos de IL-4, evaluados por ELISA de captura, en ratones BALB/c (n=15) inoculados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 µg (grupo 3) de p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎*. En el eje de las ordenadas se expresan, en pg/ml, los valores obtenidos de dicha interleuquina y el eje de las

abscisas los días de inoculación. Las barras representan los valores medios \pm SEM.

D.2.3.2c Determinación de linfoproliferación específica e inespecífica.

Para determinar si el péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ sería capaz de inducir una respuesta linfoproliferativa, las células mononucleares esplénicas de los grupos de ratones inoculados, obtenidas a los 7 días posteriores a la última inoculación (97 días) fueron cultivadas *in vitro*, durante 5 días a 37°C en ambiente de 5% CO₂, con FHA ó 0,5 μ g de p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, tal como se describiera en las secciones C.8.1 y C.8.4. La proliferación celular fue evaluada mediante el método de la BrdU, descrito en la sección 8.5, y los resultados, expresados como índice de estimulación (IP), se representan en la figura 31.

Los resultados muestran que los 3 grupos presentaron similares índices de proliferación frente a FHA, siendo los índices específicos superiores en los grupos 2 y 3 respecto al grupo 1 (grupo1 vs grupo 2, $p= 0.034$; grupo 1 vs grupo 3, $p=0.046$).

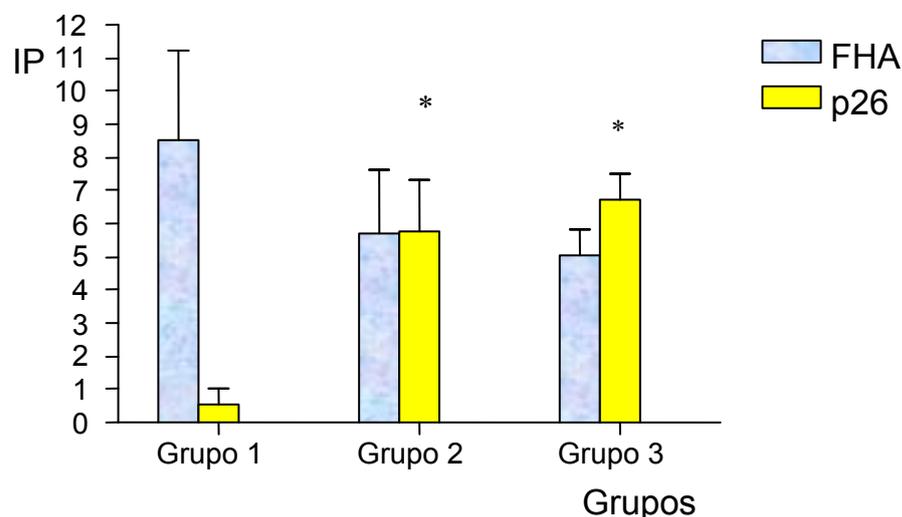


Figura 31. Índices de proliferación, evaluados mediante incorporación de BrdU en células mononucleares esplénicas de ratón, inmunizados con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) o 100 (grupo 3) μ g de p26. Las células fueron incubadas con p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ o FHA 5 días a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5%. Las barras representan los valores medios \pm SEM y los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto del grupo 1 ($p < 0.05$).

E. Discusión y Conclusiones

A los efectos de analizar si los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ correspondientes a secuencias conservadas de las proteínas del VAIE, podrían ser considerados candidatos para el diseño de una vacuna que proteja a los equinos de una posible infección con el VAIE, en este Trabajo de Tesis se analizó el poder antigénico e inmunogénico de cada uno de ellos. El poder antigénico, evaluando la capacidad de estos péptidos de ser reconocidos tanto por los anticuerpos como por los linfocitos provenientes de equinos infectados naturalmente por el virus y el poder inmunogénico evaluando la capacidad de desencadenar, en ratones, una efectiva respuesta inmune, celular y humoral.

E.1 Antigenicidad de los péptidos sintéticos presentes en las proteínas gp90, gp45 y p26

La condición fundamental para emplear péptidos sintéticos como antígenos es la de demostrar primeramente si son capaces de imitar a los sitios antigénicos correspondientes a las proteínas nativas, y por ende de ser reconocidos por las células y moléculas producidas en respuesta a la infección viral (Van Regenmortel, 1999; Van Regenmortel y Muller, 1999). En este trabajo hemos podido demostrar que los sueros de equinos naturalmente infectados con el VAIE presentan Ac anti-proteínas nativas virales capaces de reconocer secuencias peptídicas sintéticas presentes en las proteínas gp90, gp45 y p26. En efecto, hemos encontrado no solo regiones de reconocimiento en las secuencias lineales de las proteínas gp90 y p26 sino además que, más del 70% de los sueros de los animales infectados presentaban anticuerpos capaces de reconocer a los tres péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.

La antigenicidad se evaluó mediante ELISA, enfrentando cada uno de ellos, gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, con sueros equinos persistentemente infectados con el VAIE, Test de Coggins positivos.

Los resultados demuestran que el péptido sintético gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ fue reconocido por el 96% de los sueros de equinos naturalmente infectados. Resultados similares han sido obtenidos por Ball y colaboradores, quienes analizando al péptido 12₍₄₁₅₋₄₄₀₎ observaron que era capaz de ser reconocido por el 100 % de los equinos analizados, 15 naturalmente y 5

experimentalmente infectados (Ball y col., 1992). Cuando analizamos el poder antigénico de los péptidos gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, se observó que el péptido gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ fue reconocido por el 93% de los sueros analizados y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ por el 70%. Los resultados obtenidos al analizar gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ concuerdan con los obtenidos por Chong y colaboradores, quienes han encontrado que los péptidos sintéticos R32₍₅₂₂₋₅₃₄₎ y R51₍₅₃₄₋₅₃₇₎ correspondientes a la glicoproteína gp45, fueron reconocidos por el 100% y por el 90% de los sueros provenientes de equinos experimentalmente infectados, respectivamente (Chong y col., 1991^a; Ball y col., 1994). Estos autores analizaron además al péptido R33₍₅₃₇₋₅₄₃₎, correspondiente al epítipo gp45-A, definido mediante un anticuerpo monoclonal, encontrando que solamente era reconocido por el 45% de los sueros analizados (Ball y col., 1994).

Respecto al péptido sintético p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, los resultados mostraron un menor poder antigénico respecto a los péptidos correspondientes a las glicoproteínas gp90 y gp45. Chong y colaboradores, analizando una secuencia similar, Sam 50₍₃₂₆₋₃₅₁₎, mediante el empleo de un polipéptido recombinante, observaron que fue reconocido por el 100 % de los sueros extraídos de animales naturalmente infectados (Chong y col., 1991^b). Esto podría deberse no solo a la diferencia en 13 residuos aminoacídicos, sino además a que el polipéptido recombinante podría presentar una estructura conformacional que se asemeje más a la proteína nativa.

Localización de epítopes B en las proteínas gp90 y p26.

Es bien sabido que cualquier antígeno proteico por lo general posee un mosaico de determinantes antigénicos diversos, definidos por la población heterogénea de moléculas de anticuerpos presentes en el suero de animales inmunizados con ellos (Roitt & Delves, 2001). Para localizar hipotéticamente a estos epítopes hemos empleado secuencias peptídicas sintetizadas simultáneamente sobre membranas de celulosa derivatizadas e incubadas con un "pool" de sueros positivos y negativos al Test de Coggins, poniéndose en evidencia los sitios reconocidos por los Acs presentes en sueros de equinos persistentemente infectados.

Si bien en la estrategia corrientemente empleada para definir epitopes se utilizan anticuerpos monoclonales, numerosos investigadores han observado que no siempre estas regiones son también reconocidas por los Ac policlonales anti-proteínas nativas (Hussain y col., 1987; Hussain y col., 1988; Chong y col., 1991^b, Ball y col., 1992; Grund y col., 1996). Además se estima que, al existir diversidad antigénica en las proteínas analizadas, el empleo de sueros policlonales, tal como fue realizado en esta Tesis, garantiza la detección de una adecuada diversidad de paratopes, capaces de reconocer a los diferentes epitopes.

En la proteína gp90, mediante el análisis de una biblioteca de decapeptidos, se han localizado cuatro regiones de máxima reactividad, identificadas como: A_{gp90(118-162)}, B_{gp90(418-444)}, C_{gp90(25-66)} y D_{gp90(178-249)} y otras de menor reactividad, identificadas como: región E_{gp90(4-21)} (spots 2 y 3), F_{gp90(88-102)} (spot 30) y G_{gp90(103-120)} (spots 35 y 36).

Los resultados más relevantes fueron los obtenidos en la región A_{gp90(118-162)}, donde se destacarían dos secuencias, NATECWGSFPGCRPFQNY₍₁₁₈₋₁₃₅₎ y FSYETNRSMHMDNN₍₁₃₆₋₁₄₉₎. Si bien hasta el presente no se ha reportado en la literatura la presencia de epitopes en la región 124-137, en la región 138-160 se han identificado regiones antigénicas, en coincidencia con nuestros resultados (Ball y col., 1992). Dado que la región 118-135 es conservada, se considera de interés realizar oportunamente un estudio más exhaustivo de esta región, mediante la preparación de nuevas bibliotecas peptídicas y de péptidos sintéticos, con el objetivo de realizar una caracterización antigénica e inmunogénica más completa.

En tanto, en la región B_{gp90(418-444)}, se destaca la secuencia peptídica VKTSGITPLPISSEANTGLIR₍₄₂₁₋₄₄₁₎, y en ambos extremos de la misma dos epitopes mínimos, WKLVKTSGIT₍₄₁₈₋₄₂₇₎ y LIRHK₍₄₃₉₋₄₄₃₎. La elevada antigenicidad observada en la región C-terminal de la proteína gp90, enfatiza lo ya descrito en la literatura en relación a que los segmentos terminales de las proteínas suelen tener mayor antigenicidad, al estar más expuestos al sistema inmune y al tener una mayor flexibilidad. (Ball y col., 1992; Chong y col., 1991^b).

Dentro de la región C_{gp90(25-66)}, se podrían ubicar tres epitopes dominantes EENTMFQPYCYNND₍₂₈₋₄₂₎, CYNNDKNSMAESKEARD₍₃₇₋₅₄₎ y

ARDQEMNLKEESKEE₍₅₂₋₆₆₎. Respecto al primero, éste no ha sido identificado previamente en la literatura, probablemente debido a que se encuentre en una región de elevada variabilidad. Respecto al segundo epítipo, Ball y colaboradores han observado que un péptido sintético que imita la región 35-53, fue reconocido por sólo el 10 % de los equinos inoculados con cepa viral patogénica, en discrepancia con nuestros resultados (Ball y col., 1992). Ello podría deberse a diferencias metodológicas empleadas en uno y otro caso, es decir, mientras nuestras experiencias fueron realizadas empleando péptidos sintéticos unidos covalentemente a soportes de celulosa e incubados con sueros provenientes de animales naturalmente infectados, Ball y colaboradores trabajaron con péptidos adsorbidos sobre placas de poliestireno y sueros de animales experimentalmente infectados. Por otra parte, la reactividad observada en ARDQEMNLKEESKEE₍₅₂₋₆₆₎ es coincidente con lo reportado en la literatura, donde se ha descrito la presencia de un epítipo en la región KEARDQEMN₍₅₀₋₅₈₎ (Ball y col., 1992). Por otra parte, secuencias antigénicas han sido definidas en la región 55-65 de la gp120 del VIH (Goudsmit, 1988).

En la región D_{gp90(178-249)} se encontraron tres secuencias de mayor reconocimiento tales como: YQCKKVNLNSSDSSNPVRVED₍₁₇₈₋₁₉₈₎, VMNTTEYWGFKWLECNQTENF₍₁₉₉₋₂₁₉₎ y LVPENEMVNINDTDT₍₂₂₃₋₂₃₇₎. Esta reactividad se correlaciona con lo observado por otros autores en el PND₍₁₇₅₋₂₁₃₎, donde se han definido dos epítopos B: gp90- ENT₍₁₉₁₋₂₀₀₎ y gp90- DNT₍₂₀₁₋₂₀₉₎, y una región antigénica extendida, ubicada en desde los aa 187 a 216. (Ball y col., 1992; Zheng y col., 1997^{a/b}). Por otra parte, en la primer secuencia de reconocimiento YQCKKVNLNSSDSSNPVRVED₍₁₇₈₋₁₉₈₎ está presente la región variable V3₍₁₈₅₋₁₉₉₎, funcionalmente equivalente al “loop” V3 del VIH-1, donde se ha demostrado que tanto el extremo N-terminal como la región central del “loop” V3 son altamente inmunogénicos, por cuanto el 90 % de los pacientes infectados por VIH tienen Ac anti- loop V3 (Wagner y col., 1992; Zvi y col., 1995^{a/b}; Boudet y col., 1996; Zvi y col., 2000).

La baja reactividad encontrada sobre el extremo N- terminal de la proteína mediante la biblioteca de decapentapéptidos, concuerda con resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo, donde se demostró que un péptido sintético, que representa la región 7-26 e identificado como gp90-1, solamente fue reconocido por Acs presentes en 5 de los 32 sueros

procedentes de animales persistentemente infectados en forma natural (Soutullo y col., 2001). Estos resultados difieren de lo observado por Ball y colaboradores, por cuanto estos autores han demostrado, mediante ELISA, que un péptido sintético que imita esta misma región fue reconocido por Acs presentes en el 100% de los sueros provenientes de animales experimentalmente infectados. Estas diferencias podrían deberse a las diferentes cepas virales infectantes. En este trabajo los animales fueron infectados por cepas salvajes, no identificadas, a diferencia de las empleadas por Ball y colaboradores, quienes analizaron animales experimentalmente infectados con una cepa perfectamente establecida (Ball y col., 1992).

En síntesis, en este trabajo, se han encontrado dos regiones de mayor antigenicidad: $A_{(118-162)}$ y $B_{(418-444)}$, ubicadas en regiones altamente conservadas, identificándose por primera vez, dentro de la región $A_{(118-162)}$ el epitope NATECWGSFPGCRPFQNY₍₁₁₈₋₁₃₅₎. Además, se han identificado dos regiones de menor reactividad, $C_{(25-66)}$ y $D_{(178-249)}$, relacionadas con dominios presentes en la proteína gp120 del VIH y en PND de la gp90, respectivamente.

En este trabajo además se han localizado regiones antigenicas en la proteína p26.

Las proteínas de la cápside de VAIE y VIH-1, p24 y p26 respectivamente, presentan un alto grado de homología en sus secuencias (30% de identidad), y además poseen una estructura tridimensional similar, consistente en dos dominios α -helicoidales: el dominio N-terminal y el dominio C-terminal, unidos mediante un lazo (loop) flexible. El dominio N-terminal consiste en siete hélices (H1-H7) y el dominio C-terminal está formado por cuatro α -hélices (H8-H11); las hélices H10 y H11 están unidas por un puente disulfuro entre los residuos C₃₂₂ y C₃₄₂. Estos residuos de cisterna son conservados en la mayoría de los retrovirus, y estudios de mutagénesis han revelado que el puente disulfuro cumple un rol esencial en la infectividad del VIH-1 (McDermott y col., 1996).

La secuencia completa de la proteína p26 fue analizada mediante una biblioteca de decapeptidos, y el dominio C-terminal₍₂₇₇₋₃₅₉₎ fue adicionalmente analizado mediante una biblioteca de hexapeptidos.

El análisis de los resultados obtenidos ha puesto en evidencia la presencia de las regiones reactivas, identificadas como: A_{p26} (170-217), B_{p26} (245- 271), C_{p26} (230-253), D_{p26} (266-310) y E_{p26} (317-349).

Respecto a la región A_{p26(170-217)}, se considera que la misma estaría constituida principalmente por dos epitopes, VDCTSEEMNAFLDVV₍₁₇₀₋₁₈₄₎ y KQILLDAIDKIADDWDNRHPLPNA₍₁₉₁₋₂₁₄₎. Si bien aún no hay trabajos referidos a la ubicación de epitopes B en la primera de ellas, hay estudios que identifican secuencias que han sido reconocidas por LTh como "LTc (Lonning y col., 1999^{a/b}, McGuire y col., 2000; Chung y col., 2004). Por otra parte, numerosos autores han reportado en la proteína p24-VIH-1 en similar ubicación, la presencia de varios epitopes B, tales como GATPQDLNTML₍₁₇₀₋₁₈₀₎, DLNTMLNTVG₍₁₇₅₋₁₈₄₎, AAMQMLKETINE₍₁₈₈₋₁₉₉₎, LKETINEEAAEWDRVHPV₍₁₉₃₋₂₁₀₎ y EAADWDRLH₍₂₀₀₋₂₀₈₎, siendo este último epitope el mas ampliamente usado en reactivos para diagnósticos de VIH-1 por su relevancia (Gorny y col., 1989; Niedrig y col., 1989; Hinkula y col., 1990; Robinson 1990; Janvier y col., 1990; Franke y col., 1992; Truong y col., 1997; Tonarelli y col., 2000; Lottersberger y col., 2003; Lottersberger y col., 2004)

En la región B_{p26(245-271)}, en donde se localizó el epitope QFRQTYRQWIIAMSEGIKVM₍₂₄₈₋₂₆₈₎, numerosos autores han identificado secuencias reconocidas por LTh y han definido un epitope T "promiscuo", denominado Gag₍₂₅₀₋₂₆₉₎ (Zhang y col, 1998; Lonning y col, 1999^{a/b}; McGuire y col., 2002; Fraser y col., 2002; Fraser y col., 2003, Fraser y col., 2005). Por otra parte, Chong y colaboradores empleando un polipéptido que representa la región 249-292, han encontrado que solamente fue reconocido por el 10% de los sueros analizados (Chong y col., 1991^b). Sin embargo, en la proteína p24 de VIH-1 fue identificado un epitope en la región NPPIPVGGEIYKRWII₍₂₅₃₋₂₆₇₎ que presenta residuos conservados W₂₅₆, I₂₅₇ y I₂₅₈, compartidos entre ambas proteínas (Ferns y col., 1987; Ferns y col., 1989).

En lo referente a la región C_{p26(230-253)}, donde la secuencia GLGVPRERQMEPAFD₍₂₃₃₋₂₄₇₎ podría representar un epitope B, otros autores han encontrado que la región Gag₍₂₂₁₋₂₄₅₎ era reconocida por LTh productores de IFN γ (Frazer y col., 2002; Mc Guire y col., 2002).

En el extremo C-terminal de la proteína p26 se localizaron dos regiones: D_{p26(266-310)} y E_{p26} (317-349). En la primera los epitopes principalmente estarían

ubicados en la región 275-304, es decir dentro de la secuencia correspondiente a la MHR₍₂₇₇₋₂₉₂₎. En ella se observa que la secuencia QNIRQGAKEPYPEFV₍₂₇₅₋₂₈₉₎, que abarca la región del loop que conecta a los dos dominios, sería reactiva en virtud de la presencia del epítoto GAKEPY₍₂₈₀₋₂₈₅₎, en tanto que otros dos epítotos FVDRLI₍₂₈₈₋₂₉₃₎ y GHPQEI₍₃₀₀₋₃₀₅₎ podrían contribuir a la región de mayor reactividad (275-304) dentro de la región D_{p26}₍₂₆₆₋₃₁₀₎. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Chong y colaboradores, quienes identificaron un epítoto B, denominado p26-D KEPYPEFVDRLISQI₍₂₈₂₋₂₉₆₎ (Chong y col., 1991^b). En relación a la proteína p24-VIH-1, la presencia de epítotos B dentro de la región MHR ha sido reportada, incluyendo las regiones **IRQGPKEPFRDYVDRFYKTL**₍₂₈₅₋₃₀₄₎ y **FRDYVDRFYK**₍₂₉₃₋₃₀₂₎ (Hinkula y col., 1990; Robert-Hebmann y col., 1992^{a/b}; Lottersberger, y col., 2003). Además, se ha observado que los residuos R₂₇₈Q₂₇₉G₂₈₀; K₂₈₂E₂₈₃P₂₈₄ y V₂₈₉D₂₉₀R₂₉₁, también están presentes en estos epítotos B del VIH-1. Probablemente esta homología, presente en ambas regiones MHR, podría explicar que en el 80% de los animales persistentemente infectados haya anticuerpos anti-p26₍₂₇₇₋₃₅₉₎ que reconocen también a la proteína capsídica p24 del VIH-1, según observaciones realizadas por Grund y colaboradores (Grund y col., 1994). Por otra parte, otro epítoto EISKFLT₍₃₀₄₋₃₁₀₎, podría ser responsable de la reactividad observada en la secuencia IKSEGHPQEISKFLT₍₂₉₆₋₃₁₀₎. Similares hallazgos han sido reportados por otros investigadores, quienes han localizado al epítoto B, QEISKFLTD₍₃₀₃₋₃₁₁₎ identificado como EIA6A1 (Stephens y col., 1986; McGuire y col., 1994^a).

A pesar de que no se observó reactividad en la región 310-317 cuando fue evaluada con la membrana de decapentapéptidos, el análisis mediante la membrana de hexapéptidos permitió ubicar el siguiente epítoto, dentro de la hélice de dimerización (H9): FLTDTLTIQN₍₃₀₈₋₃₁₇₎. Estos resultados son coincidentes con lo observado por Chong y colaboradores, quienes describieron que el fragmento polipeptídico recombinante Sam 50.5₍₃₀₇₋₃₄₀₎ fue reconocido por el 80% de los sueros analizados (Chong y col., 1991^b).

Con respecto a la región E_{p26}₍₃₁₇₋₃₄₉₎, la mayor reactividad encontrada en la región 323- 346, podría deberse a la presencia de los siguientes epítotos: QNANEE₍₃₁₆₋₃₂₁₎, ECRNAM₍₃₂₁₋₃₂₆₎, NAMRHL₍₃₂₄₋₃₂₉₎, RHLRPE₍₃₂₇₋₃₃₂₎ y

EKMYACRDIGTTKQ₍₃₃₇₋₃₅₀₎. Ello concuerda con lo descrito por Chong y colaboradores, quienes demostraron que el polipéptido recombinante Sam 50₍₃₂₆₋₃₅₁₎ era reconocido por Acs presentes en el 100% de los equinos naturalmente infectados examinados (Chong y col., 1991b). Otros autores han encontrado un epítipo KILKALGPAATLEEMMTACQGVG₍₃₁₃₋₃₂₂₎ en la proteína p24 del VIH-2, el que comparte con el péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ los residuos E₃₂₀E₃₂₁ y A₃₄₁C₃₄₂ (Hinkula y col., 1990, Niedrig y col., 1991).

En síntesis, en la proteína p26 se han podido localizar 5 regiones de reconocimiento, tres de las cuales descritas por primera vez, una cuarta relacionada con la MHR y finalmente, a semejanza de lo observado para gp90, una localizada en la región C-terminal, acorde a la secuencia del péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ evaluado en la presente Tesis.

Reconocimiento de los péptidos sintéticos por los linfocitos T de equinos infectados naturalmente por el VAIE.

La capacidad de los péptidos sintéticos, gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, de ser reconocidos por linfocitos T proveniente de animales serológicamente positivos, fue analizada mediante ensayos de linfoproliferación. El análisis de resultados demostró que el péptido sintético gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ fue reconocido por el 79%, el péptido gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ por el 47% y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ por solo el 31% de estos animales. Las diferencias encontradas podrían en parte, deberse a la heterogeneidad, diversidad alélica, entre los animales analizados. Sin embargo sería dificultoso determinar la restricción alélica para el reconocimiento de un determinado péptido ya que, hasta el presente solo se han tipificado 11 alelos de los Antígenos de Histocompatibilidad (ELA-A) (Chung y col., 2004; Tagmeyer y col., 2007). Otro de los motivos podría ser que el péptido sintético gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ contenga epítopos T promiscuos los que serían reconocidos por moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad disímiles. Estos epítopos han sido identificados por Lonning y colaboradores en la región comprendida entre los residuos aminoacídicos 254-273, presente en la proteína p26 (Lonning y col., 1999^a). Por otra parte, son numerosos los autores que han identificado estos epítopos universales o promiscuos en otros microorganismos infecciosos (Sininaglia y col., 1988; Panina-Bordignon y col., 1989; Wiertz y col., 1992; Calvo-Calle y col., 1997; Sparbier y Walden, 1999; Olive y col., 2001; Drabner y col., 2002).

Recientemente Tagmeyer y colaboradores, trabajando con diferentes secuencias peptídicas de la proteína gp90 y con linfocitos provenientes de animales vacunados con la cepa a virus atenuado, EIAV_{D9}, no observaron reactividad en la zona comprendida entre los aa 416-444, correspondiente al péptido gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ analizado en este trabajo, y sí en otras secuencias peptídicas (Tagmeyer y col., 2007). Ello podría deberse a la metodología empleada en la elección de las secuencias a ser evaluadas, dado que estas fueron seleccionadas en virtud de los resultados obtenidos luego de evaluar un pool de secuencias peptídicas en ensayos de linfoproliferación y citotoxicidad. De este modo estos autores localizaron 9 epitopes Th en las regiones 1-20, 31-50, 61-120, 181-200, 221-300 de la proteína gp90, asociados con la inmunidad protectora ya que han sido reconocido por linfocitos Th procedentes de equinos vacunados con la cepa AIEV_{D9} atenuada (Tagmeyer y col., 2007).

Respecto a la gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎, Tagmyer y colaboradores observaron que al menos uno de los pépticos definidos como 52₍₅₁₁₋₅₃₀₎, 53₍₅₂₁₋₅₄₀₎ y 54₍₅₃₁₋₅₅₀₎ fueron capaces de ser reconocido por LTc proveniente de animales vacunados con la cepa AIEV_{D9} atenuada. Por otra parte, estos autores observaron que LT proveniente de estos animales fueron capaces de proliferar frente a los péptidos sintéticos comprendidos entre los residuos aminoacídicos 491-510, 591- 610, 651-850 (Tagmeyer y col., 2007).

Teniendo en cuenta los resultados observados en este trabajo donde el péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ fue reconocido por el 31% de los animales infectados, se podría pensar una mayor restricción al CMH (ELA) por parte de los LT. Ello estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por Chung y col quienes han observado que el 18% de los animales infectados experimentalmente presentaban LTc capaces de reconocer a la misma secuencia peptídica p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, analizada en este trabajo. Estos autores han observado además, que el 41% de dichos animales presentaban LTc capaces de reconocer a una región denominada EC4₍₃₁₇₋₃₅₉₎ (Chung y col., 2004). Por otra parte, Lonning y colaboradores, analizando mediante ensayos de proliferación, la capacidad de los péptidos sintéticos 16₍₃₁₄₋₃₃₃₎, 17₍₃₂₆₋₃₄₅₎ y 18₍₃₃₈₋₃₅₉₎, correspondientes a una región similar al péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ analizado en este trabajo, observaron que dichos péptidos fueron reconocidos por el 60%, 20% y 40%, respectivamente

(Lonning y col., 1999^a). Sin embargo, Zhang y colaboradores, analizando los péptidos 26₍₃₁₄₋₃₃₃₎ y 27₍₃₂₆₋₃₄₅₎ no observaron reconocimiento de estos péptidos por los linfocitos T proveniente de animales persistentemente infectados con el virus (Zhang y col., 1998; Zhang y col 1999).

En síntesis, en virtud de que los tres los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, fueron reconocidos tanto por anticuerpos como por LT, podríamos concluir que en cada uno de ellos existirían epitopes tanto B como T, capaces de ser reconocidos por anticuerpos o LT de animales persistentemente infectados. Cabe destacar que los péptidos sintéticos gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ presentaron mayor poder antigénico que el péptido sintético p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.

E.2 Inmunogenicidad de los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.

En virtud del carácter antigénico que demostraron tener estos tres péptidos sintéticos, se evaluó, posteriormente, su capacidad inmunogénica. Para ello se inocularon ratones BALB/c con 0, 20 ó 100 µg/animal, con la finalidad de analizar la respuesta inmune humoral, a través de la síntesis de anticuerpos, y la respuesta inmune celular mediante la producción de las citoquinas IL-4 e IFN γ y/o midiendo los índices de linfoproliferación específicos para dichos péptidos. Para ello, en base a la bibliografía existente, se seleccionó la especie animal a ser inmunizada, dosis y vías de inoculación (Lovgren y Larsson, 1994; Tabatabai y Pugh, 1994; Obeid y col., 1995; Nehete y col.; 1995; Murray, 1998; Van Regenmortel y Muller, 1999; Elliott y col., 1999; Rogers y Croft, 1999; Ruedl y col., 2000; Cho y col., 2000; Rothoef y col., 2003).

Los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ fueron inoculados luego de haber sido disueltos en RPMI 1640 y emulsionados en ACF. Existen controversias respecto a la conveniencia o no de conjugar los péptidos sintéticos a proteínas transportadoras. Son numerosos los autores que consideran que, para generar una elevada tasa de anticuerpos, es necesario conjugarlos a proteínas, tales como KLH, BSA o a ovoalbumina, así como a partículas denominadas. ISCOMs (Lovgren y Larsson, 1994; Ijaz y col., 1995; Obeid y col., 1995; Hamajima y col., 1995; Amores-Sanchez y col., 2000, Le y col., 2001; Zimmerman y col., 2001; Van Houten y col., 2006). Los resultados observados en este

trabajo demostrarían que, a pesar de haber inoculado péptidos sintéticos de bajo peso molecular sin ser conjugados, éstos han sido capaces de desencadenar una adecuada respuesta inmune humoral y celular. Similares resultados han sido obtenido por distintos investigadores, quienes sostienen la conveniencia de inocular péptidos sintéticos sin conjugar, argumentando que el procedimiento empleado en la conjugación podría modificar la capacidad inmunogénica del péptido, ya sea alterándolo químicamente y/o actuando la proteína transportadora como inmunógeno o como inmunosupresora (Herzenberg y Tokuhisa, 1980; Pfaff y col., 1982; Schulze y col., 1985; Briand y col., 1985; Edwards y col., 1989; Lovgren y Larsson, 1994, Robinson y col., 1995, Amores-Sanchez y col., 2000; Karle y col., 2003, Bruner y col., 2003).

Cuando se inoculó el péptido sintético gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ se observó que la respuesta inmune fue diferente según sea la dosis empleada. En efecto, cuando se emplearon 20 µg/animal no hubo síntesis de anticuerpos IgG específicos, probablemente debido a que haya sido muy baja la disponibilidad antigénica que tuvieron los LB “naive”, evitando iniciar una respuesta humoral de magnitud considerable. Esto podría acentuarse por la mayor susceptibilidad que presentan los péptidos lineales a la degradación provocada por las proteasas, respecto a la de los péptidos sintéticos cíclicos (Bona y col., 1998; Fitzmaurice y col., 2000). Respecto a los niveles de IFN γ en este grupo de animales, éstos fueron superiores a los del grupo control durante el segundo mes de inmunización. Este aumento se podría deber a la liberación de esta citoquina por las células NK y/o DC y/o CD8⁺ activadas (Bodmer y col., 1989; Fagerberg y col., 1999; Sedlik y col., 2000; Liu y col., 2001; Janeway y col., 2005). Numerosos trabajos demuestran la participación de las células CD8⁺ en la respuesta inmune frente a péptidos sintéticos (Bodmer y col., 1989, Fagerberg y col., 1999; Elliot y col., 1999; Sedlik y col., 2000). Nehete y colaboradores, en particular, fueron capaces de inducir una respuesta citotóxica en ratones BALB/c, inoculando, en una única dosis, 20 µg/animal de un péptido sintético lineal compuesto por 15 aa que imita un epitope de la proteína gp120 del virus VIH-1, en ACF (Nehete y col., 1995). En cuanto a los niveles de IL-4, éstos fueron similares a los encontrados en los animales del grupo control durante los tres meses de la experiencia, a excepción del día 48, donde los valores de IL-4 fueron menores, probablemente a consecuencia de un mecanismo de

retroalimentación negativa que ejercería el IFN γ sobre la síntesis de citoquinas Th2.

Cuando los animales fueron inoculados con 100 μ g/ animal del péptido sintético gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, se desencadenó tanto una respuesta humoral, evidenciada por la síntesis de Acs, como celular asociada a la producción de IFN γ , puesta en evidencia a partir del día 20 y hasta el día 64. Estos resultados nos indicarían que el IFN γ podría ser liberado, además de las células ya mencionadas, por las células Th1 activadas. Esto se debería confirmar determinando los isotipos de IgG presentes en los sueros de los animales inmunizados. Es probable que la producción IFN γ este también relacionada a la presencia de ACF. En efecto, se ha demostrado que inoculando péptidos sintéticos lineales se induce una respuesta Th1 en presencia de ACF, induciendo la producción de anticuerpos IgG2a, isotipo asociado a una respuesta Th1 (Robinson y col., 1995; Calvo-Calle y col., 2006).

Al analizar el poder inmunogénico del péptido sintético gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎, se observó que, independientemente de la dosis empleada, los animales fueron capaces de desencadenar tanto una respuesta inmune humoral como celular. En efecto, la síntesis de Acs fue evidenciada a partir de la 4^a inoculación y los linfocitos fueron capaces de proliferar en presencia de dicho péptido. Esto indicaría la presencia de linfocitos T de memoria cuyos TCR serían capaces de reconocer secuencias peptídicas, presentes en el péptido gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎. A los efectos de analizar cuáles serían los posibles epitopes T que participarían en este reconocimiento, aplicando el programa Bioinformático syfpeithi (<http://www.syfpeithi.de>) para moléculas CMH murinas BALB/c H-2^d, se podrían sugerir dos posibles epitopes T: RQQVEETFNL₍₅₂₂₋₅₃₁₎ y LIGCIERTHV₍₅₃₁₋₅₄₀₎. (Reizis y col., 1998; Sbai y col., 2001; Nussbaum y col., 2003; González y col., 2004).

Al analizar el poder inmunogénico del péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, al igual que lo observado con el péptido gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎, ambos grupos de animales, los inoculados con 20 o con 100 μ g/animal fueron capaces de desencadenar una respuesta inmune humoral y celular. Esto podría deberse a la presencia de tres posibles epitopes T: ECRNAMRHL₍₃₂₁₋₃₂₉₎, RHLRPEDTL₍₃₂₇₋₃₃₅₎, DTLEEKMYA₍₃₃₃₋₃₄₅₎, definidos por el programa Bioinformático syfpeithi, citado anteriormente (Reizis y col., 1998; Sbai y col., 2001; Nussbaum y col., 2003, González y col., 2004). En ambos grupos de animales los valores de IFN γ fueron inferiores a

los del grupo control, a excepción del día 20 donde los niveles fueron superiores al inocular 100 µg/animal. En cuanto a los niveles de IL-4, estos fueron similares a los observados en el grupo control. El hecho de haberse observado que el péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ no fue capaz de estimular ni la producción de IFN γ ni de IL-4, indicaría que dicho péptido no sería capaz de inducir una típica respuesta inmune Th1/Th2, sino más bien estimular la proliferación de linfocitos T de memoria, denominados células T no polarizadas (T_{np}), CXCR5⁺, CCR7⁺ y L-selectina⁺, incapaces de producir IL-4 e IFN γ , pero que participarían en la colaboración T-B, hacia la producción de IgA, IgM e IgG (Breitfeld y col., 2000; Kim y col., 2001^{a/b}; Brière y col., 2001).

Analizando las diferencias entre las respuestas inmunes desencadenadas con cada una de los péptidos sintéticos, hemos observado que al inocular el péptido gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, para generar niveles similares de anticuerpos, fue necesario inmunizar a los animales durante un mayor tiempo y en cantidades 5 veces superiores que las empleadas al inocular los péptidos gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ o p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎. Esto podría ser atribuido a diferencias estructurales entre el péptido sintético lineal [gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎] y los cíclicos [gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎]. Estos últimos serían mejor reconocidos por el BCR y menos susceptibles, que los lineales, a la degradación por las proteasas. Por otra parte, ambos péptidos cíclicos presentan una mayor proporción de residuos aminoacídicos cargados y/o aromáticos, (E, Y, K, D, R, W, H y F) que el lineal, lo que les conferiría una mayor capacidad inmunogénica asociada a la producción de anticuerpos (Brown, 1994^{a/b}; Fitzmaurice y col., 1996; Margni, 1996^e; Valero y col., 2000; Gomes y col., 2001; Olive y col., 2001; Misumi y col., 2003).

El péptido gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, a pesar de presentar una conformación lineal, fue capaz de desencadenar una respuesta inmune asociada a Th1 y/o CD8⁺. Esto podría deberse a la mayor afinidad tanto de este péptido por las moléculas MHC como a la de este complejo por el TCR (Murray, 1998; Vijaykrishnan y col., 1998; Rogers y Croft, 1999; González y col., 2004).

Los tres péptidos sintéticos empleados en los planes de inmunización indujeron la síntesis de Acs murinos anti-gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, anti-gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y anti-p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, siendo cada uno de ellos capaces de reconocer a sus respectivos epítopes virales nativos, presentes en el citoplasma y en la membrana de células mononucleares esplénicas, ubicación viral demostrada por microscopía electrónica por McGuire y colaboradores, obtenidas de un equino infectado

naturalmente con el virus (McGuire y col., 1994^a). Si bien no hemos podido evaluar si los Acs murinos presentaban reactividad hacia Ags presentes en las células esplénicas de animales no infectados, no hemos observado reacción Ag-Ac entre células esplénicas de animales infectados con los sueros murinos provenientes de los grupos controles.

Dadas las características de los péptidos analizados en este trabajo, podríamos sugerir que los tres péptidos sintéticos evaluados se comportarían, no solo como inmunógenos sino como mimetopes, según conceptos de Van Regenmortel. Este investigador postuló que deberían ser consideradas mimetopes todas aquellas secuencias peptídicas sintéticas, que por una parte, sean reconocidas por anticuerpos anti-proteína nativa y que a su vez, sean capaces de generar anticuerpos con especificidad hacia las proteínas nativas (Van Regenmortel y col., 1998; Van Regenmortel, 2000). Empleando este mismo concepto para diferentes moléculas sintéticas, varios han sido los investigadores que han considerado su empleo como moléculas candidatas a vacunas (Milich y col., 1988, Lombarda y col., 1993, Tabatabai y col., 1994; Robinson y col., 1995, Hamajima y col., 1995; Ijaz y col., 1995; Barlett y col., 1998, Van Regenmortel y col., 1998, Volpina y col., 1999; Van Van Regenmortel, 2000; Noya y col., 2001; Noya y col., 2001; Bruner y col., 2003; Herrera y col., 2004). Sin embargo, sería conveniente también, analizar si estos anticuerpos anti-péptidos presentan la capacidad de neutralizar al virus.

En síntesis, podríamos concluir que los péptidos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ y gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ serían capaces de desencadenar una elevada síntesis de anticuerpos y una efectiva respuesta inmune celular, ya que fueron capaces de estimular la producción de IFN γ en el primer caso y la proliferación celular en el segundo caso. Por otra parte, los anticuerpos murinos anti-gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, anti-gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y anti-p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ reconocieron a los antígenos virales nativos, presentes en las células mononucleares de animales persistentemente infectados con el VAIE.

Dado el carácter antigénico e inmunogénico de los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ y gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ demostrado en la presente Tesis, se considera que estas moléculas sintéticas deberían ser incluidas en una vacuna futura que confiera protección, en equinos, de la infección con el VAIE. La exclusión del péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, no solo se atribuiría a su menor poder antigénico e

inmunogénico, sino que, una vez inoculado, generaría Acs capaces de reaccionar con el antígeno de Coggins, evitando de este modo discriminar animales vacunados de infectados.

Si bien el éxito de una futura vacuna basada en el empleo de moléculas sintéticas que imiten epitopes, dependerá en gran parte, de la selección adecuada de los inmunógenos, habrá que tener en cuenta también otros factores, tales como la vía de inmunización, el empleo de adyuvantes y la estrategia empleada en la elaboración de la misma (Langeveld y col., 1994; Gosh y Jackson, 1999; Olive y col., 2001; Huerta y col., 2002; Uhl y col., 2002; Finstad y col., 2004; Herrera y col., 2004; Liu y col., 2006; Warger y col., 2007; Bermúdez y col., 2007).

Actualmente, varios investigadores están evaluando la efectividad de la inmunización transcutánea con péptidos sintéticos. Ellos consideran que ésta sería la vía mas adecuada para mejorar la respuesta inmune protectora, permitiendo que estos inmunógenos puedan atravesar la barrera epidérmica para ser captados por las células de Langherhams o bien alcanzar la dermis, donde sean fagocitados por las células dendríticas y/o plasmocitoides y/o macrófagos allí presentes (Warger y col., 2007). Los peptidos sintéticos se deberían aplicar en forma tópica, junto con inidaxoquinolina (R-827), que induce una fuerte respuesta celular, conjuntamente con la toxina colérica y oligonucleótidos de DNA ricos en CpG, a fines de potenciar, la primera, la producción de anticuerpos y la proliferación de Th1 y la segunda, para inducir una mayor respuesta citotóxica. En estas condiciones se demostró una efectiva respuesta inmune, no conociéndose al presente el alcance de la memoria inmunológica.

Teniendo en cuenta que la vía de infección natural del VAIE es por vía cutánea, la inmunización transcutanea, en las condiciones previamente descritas, podría ser una de las estrategias mas adecuadas en la protección contra el VAIE.

Otra de las estrategias seria el empleo de ISCOM ó de liposomas ó de lipopéptidos ó de MAP para la elaboración de una vacuna. En estos casos lo péptidos sintéticos serían liberados lentamente al torrente sanguíneo sin ser degradados fácilmente por las proteasas. Sin embargo, este tipo de inmunizaciones han tenido éxito relativo (Deres y col., 1989; Collins y col., 1992; Morein y col., 1994; Olive y col., 2001; Fraser y col., 2003; Fraser y col., 2005).

Otra alternativa posible, evaluada en VIH, consistiría en vacunar con DC autólogas, previa incubación *in vitro* con péptidos sintéticos promiscuos de las proteínas del núcleo del VIH. No obstante haberse probado que este tipo de inmunización logró desencadenar una respuesta inmune celular en ratones con diferentes haplotipos, aun no ha sido probada en humanos, teniendo como desventaja que la producción de las mismas es personalizada (Ridgway, 2003; Jiang y col., 2006).

Otra de las estrategias empleadas para el diseño de vacunas que confieran protección contra diferentes virus, tales como los virus herpes, VIH-1 e influenza, consiste en el empleo de vectores génicos, virales o bacterianos, producidos mediante la tecnología del DNA recombinante (Chimini y col., 1989; Ulmer y col., 1994; Caseres y col., 1997; Bot y col., 1997). Si bien se ha demostrado que estas vacunas han sido capaces de generar una respuesta inmune celular T citotóxica a largo plazo, existiría una competición entre los Ags bacterianos o virales en la generación de la respuesta inmune (Burke y col., 1988; Rutgers y col., 1988; Evans y col., 1989; Li y col., 1992; Hahn y col., 1992; Bona y col., 1998; Settle y Fikes, 2003). Este tipo de vacunas no ha sido aconsejable en el caso del VIF, ya que si bien se ha logrado desencadenar una fuerte respuesta citotóxica, la producción de anticuerpos neutralizantes ha sido muy escasa en los felinos vacunados (Dunham, 2006).

E.3 Diagnóstico de la infección

A los efectos de realizar un diagnóstico de la enfermedad viral con mayor precisión, se aplicaron diferentes metodologías, Test de Coggins o Test de doble difusión radial (AGID), ELISA y PCR. Se observó una mayor sensibilidad al aplicar ELISA, respecto al Test de Coggins y PCR respecto a ELISA. En efecto, de los 64 animales analizados, 25 fueron positivos al Test de Coggins, 28 al Test de ELISA y 40 por PCR. De éstos últimos, 18 resultaron negativos por los métodos serológicos. No obstante 6 animales con resultados serológicos positivos, fueron negativos por PCR. Aunque con algunas discrepancias, diversos autores han demostrado una menor sensibilidad del Test de doble difusión radial (AGID), respecto de las pruebas diagnósticas ELISA y PCR para la detección de retrovirus (Suzuki y col., 1982; Matsushita y col.,

1989; Chong y col., 1991^a; Burki y col., 1992; Lew y col., 1993; Issel y Cook, 1993; Ball y col., 1994; Eaves y col., 1994; Fechner y col., 1996; Trono y col., 2001; Soutullo y col., 2001; Pare y Simard, 2004, Jin y col., 2004). En efecto, en un estudio comparativo entre estas técnicas, para la detección del Virus de la leucosis bovina, se han encontrado que, en 126 animales examinados, 75 fueron positivos por AGID, en tanto que 100 lo fueron por ELISA así como por PCR (Felmer y col., 2006).

Dado que no siempre es posible la detección del VAIE cuando éste está integrado como provirus en monocitos de sangre periférica, por sus bajos niveles (menor a 1 copia/ 5×10^6 células), para aumentar la sensibilidad analítica hemos estimado conveniente efectuar dos rondas de amplificación.

Similar estrategia han aplicado otros autores (O'Rourke y col., 1991; Langemeier y col., 1996; Nagarajan y Simard, 2001). En efecto, Nagarajan y colaboradores, luego de efectuar PCR "nested" para detección del DNA viral (provirus) en mononucleares de sangre periférica de animales naturalmente y persistentemente infectados, observaron que 7 animales, con resultados positivos de PCR-nested, presentaban reacciones serológicas negativas (Test de Coggins y Western). Si bien estos autores no descartaron la posibilidad de que estos animales estuvieran cursando una fase aguda, consideraron que éstos podrían estar persistentemente infectados, donde la replicación viral esté muy restringida y por ende la cantidad de Acs sea indetectable (Nagarajan y Simard, 2001). Otros autores han observado que algunos equinos lograban ser infectivos, aún a pesar de tener sucesivos Test de Coggins negativos (Issel y Coggins, 1979; Mc Connell y Katada, 1981, Issel y Cook, 1993; Hammond y col., 1997). Langemeier y colaboradores, al comparar resultados de RT-PCR-nested con Test de Coggins, CELISA y Western Blot, encontraron 8 animales con RT-PCR positivas y negativos al Test de Coggins y CELISA, 5 de los cuales presentaron una sola banda de reactividad en Western Blot. En tanto los 3 restantes fueron negativos por los 3 métodos serológicos. Estos 8 animales, al igual que los analizados en este trabajo, estuvieron conviviendo no menos de 20 años con animales infectados (Langemeier y col., 1996).

Los resultados de PCR positivos y serología negativa observados en este trabajo podrían deberse a la presencia de DNA_v integrado como provirus en monocitos de sangre periférica, comportándose dichos animales como portadores virales. En un principio se pensó que dichos animales podrían estar cursando una fase aguda de la enfermedad, donde el título de anticuerpos no

sería el suficiente para obtener resultados por ELISA positivos. Dado que al año siguiente dichos animales continuaron siendo negativos por ELISA y Test de Coggins, se descartó esta posibilidad. Es por ello que una de las posibles causas que explicarían en parte este hallazgo podría relacionarse con el hecho de que, al no haber replicación viral, no habría síntesis de proteínas virales y por ende no habría respuesta inmune específica (Maury, 1994; Maury y col., 1994). Fenómenos similares han sido descritos en otras patologías, tal como en infecciones retrovirales por el Virus de la Leucosis Bovina (VLB) (Kaaden y col., 1982; Jacobs y col., 1992; Fechner y col., 1996).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, sería interesante determinar si los animales con resultados de PCR positiva y serología negativa, serían capaces de transmitir el virus.

En este trabajo se observó también un grupo de seis animales con serología positiva y PCR negativa. Se estima que una de las posibles causas estaría asociada a la presencia de inhibidores de la polimerasa, por lo que en futuros ensayos se debería incluir, como control de amplificación, cebadores que también amplifiquen el gen de la β -actina. Otra causa podría relacionarse con la baja carga viral de estos animales. En efecto, Whetter y colaboradores han demostrado que animales experimentalmente inoculados con 200 ml de sangre entera de un animal inoculado con la cepa viral CL-22 V, capaz de generar una infección persistente, logran infectar a un animal sano provocando una respuesta inmune con presencia de anticuerpos pero sin que se detecte, por PCR, DNA viral en PBMC (Wetter y col., 1990). Por otra parte, la reacción de PCR detecta no menos de 10 copias de DNA viral, por lo que se estima que en 10 ml de sangre podría haber menos de 5 copias (Taylor y col., 1987; Rice y col., 1989; Kim y Casey, 1994; Sellon y col., 1996; Harrold y col., 2000). Este mismo fenómeno también ha sido observado en VIH, donde no siempre es posible detectar secuencias virales en sangre periférica mediante ensayos de PCR (Ou y col., 1988; Simmonds y col., 1990).

Esto nos permitiría concluir que para realizar un correcto diagnóstico que no dependa del período de la enfermedad por el que transcurren los animales, sería conveniente utilizar ambas metodologías, ELISA y PCR.

F. Resumen

La Anemia Infecciosa Equina (AIE) es una enfermedad infectocontagiosa causada por un lentivirus, familia Retroviridae, que afecta solo a la especie *Equidae* provocándoles una infección persistente y asintomática de por vida. Comienza con frecuentes ciclos febriles e intensa replicación viral, los que disminuyen hasta anularse en la fase de portador asintomático, donde los mecanismos inmunológicos participarían activamente. El virus contiene dos glicoproteínas de envolturas (gp90 y gp45) y cuatro proteínas internas no glicosiladas, denominadas p26, p15, p11 y p9. A diferencia de las glicoproteínas gp90 y gp45, la proteína p26 es la más conservada no solo entre las proteínas de las cuasiespecies virales, sino también entre las proteínas capsídicas de otros lentivirus.

El virus ingresa por picadura de tábanos hematófagos a dermis, infectando tanto a las células dérmicas como a los macrófagos tisulares mediante el receptor ELR1, presente en ellas. Durante la fase aguda los picos febriles y virémicos se asocian a una respuesta principalmente citotóxica, capaz de reconocer epitopes variables y constantes de las proteínas del virus. Al no lograr su eliminación, durante la fase crónica se ponen en juego mecanismos efectores dados por anticuerpos neutralizantes y linfocitos T citotóxicos, tendientes a eliminar al virus. Éste modificará continuamente su composición antigénica de modo de evadirse de los mecanismos inmunes. Ambos, virus y sistema inmune cumplen en parte su cometido en la fase asintomática, por cuanto los mecanismos inmunológicos efectores logran eliminar las cuasiespecies virales ancestrales y mantienen al virus como población viral latente en los reservorios titulares, sin que éste se replique.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y el hecho de que hasta el presente no se han identificado cuales serian los epitopes T y/o B capaces de generar una respuesta inmune protectora, el objetivo del presente trabajo fue analizar el carácter antigénico e inmunogénico de los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ del virus de la Anemia Infecciosa Equina con la finalidad de diseñar, en un futuro, una vacuna que confiera una efectiva protección al huésped.

El poder antigénico fue evaluado, mediante ELISA y mediante linfoproliferación, por el método de la BrdU, en sueros y linfocitos provenientes de equinos persistentemente infectados, respectivamente. Los resultados mostraron que los péptidos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ fueron reconocidos por el 96, 95 y 70% de los sueros, respectivamente. Los ensayos de linfoproliferación mostraron que el péptido gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ fue reconocido por el 79%, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ por el 47% y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ por solo el 31% de los animales infectados.

Por otra parte, la antigenicidad fue además evaluada mediante bibliotecas peptídicas correspondientes a las proteínas gp90 y p26. Para ello se analizó la reactividad que presentaban sueros positivos y negativos al Test de Coggins, mediante ELISA, frente a secuencias peptídicas sintetizadas simultáneamente sobre membranas de celulosa (método Spot). Se localizaron cuatro regiones de mayor reactividad en la proteína gp90, a saber A_{gp90(118-162)}, B_{gp90(418-444)}, C_{gp90(25-66)} y D_{gp90(178-249)}, y cinco en la proteína p26, identificadas como A_{p26(170-217)}, B_{p26(245-271)}, C_{p26(230-253)}, D_{p26(266-310)} y E_{p26(317-349)}.

Para evaluar el carácter inmunogénico, los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ fueron inoculados, una vez emulsionados en adyuvante completo de Freund, a ratones BALB/c durante 3 meses, cada 15 días, con 0 (grupo 1), 20 (grupo 2) y 100 (grupo 3) µg/animal. La respuesta inmune humoral fue analizada, evaluando la síntesis de anticuerpos y su capacidad para reconocer a las respectivas proteínas virales nativas. La respuesta inmune celular fue evaluada cuantificando las citoquinas IL-4 e IFN γ en ratones inoculados con gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, y midiendo los índices de proliferación específicos en los linfocitos provenientes de animales inoculados con gp 45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.

Los resultados mostraron que los péptidos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ y gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ fueron capaces de producir una mayor síntesis de anticuerpos que p26. Los anticuerpos producidos en los tres casos fueron capaces de reconocer a las proteínas virales nativas. Al evaluarse la respuesta inmune celular se observó

que el péptido sintético gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ fue capaz de estimular la producción de IFN γ en tanto que los péptidos gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ y p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ estimularon la proliferación de linfocitos provenientes de los animales inoculados con dichos péptidos.

Los resultados obtenidos indicarían que, en virtud del poder antigénico e inmunogénicos observado en los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ y gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎, estas moléculas podrían ser consideradas candidatas a ser incluidas en una vacuna que confiera protección a los equinos. La no inclusión del péptido p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ se debería a que éste presenta un escaso poder antigénico e inmunogénico, pero fundamentalmente a que no permitiría discriminar entre animales vacunados de infectados.

En este trabajo se analizaron, además, diferentes metodologías a los efectos de obtener un diagnóstico preciso independiente del periodo por el cual transcurre esta enfermedad. Los resultados mostraron que sería conveniente aplicar el método ELISA, empleando los péptidos sintéticos gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ y gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ como antígenos, para detectar anticuerpos, y el método de doble PCR, para la detección del ADN viral.

G. Summary

Equine Infectious Anemia (EIA) is an infectious and contagious disease caused by a lentivirus, family Retroviridae that affects only the *Equidae* family, causing a life-long persistent and asymptomatic infection. The disease is initially characterized by frequent febrile episodes and intense viral replication, which diminish until disappearing at the asymptomatic carrier stage, when the immunological mechanisms would actively participate. The virus has two envelope glycoproteins (gp90 and gp45) and four non-glycosylated internal proteins, referred to as p26, p15, p11, and p9. Unlike glycoproteins gp90 and gp45, p26 is the most conserved one not only among the proteins of the viral quasispecies, but also among the capsid proteins of other lentiviruses.

The virus is transmitted through blood feeding horsefly bites infecting both dermal cells and tissue macrophages through the ELR1 receptor that is present in them. During the acute stage, febrile and viremic episodes are associated with a mainly cytotoxic response, capable of recognizing variable and constant epitopes of the virus proteins. As the virus can be eliminated by them, during the chronic phase, effector mechanisms operate by neutralizing antibodies and T cytotoxic lymphocytes.

The virus will constantly modify its antigenic composition so as to evade the immune mechanisms. Both the virus and the immune system partly accomplish their objective in the asymptomatic phase, since effector immunological mechanisms succeed in eliminating the ancestral viral quasispecies and maintain the virus as a latent viral population in the tissue reservoirs, without virus replication.

Based on the above statements and on the fact that the T and/or B epitopes, capable of eliciting protective immune response, have not been identified so far, the objective of this work was to analyze the antigenic and immunogenic capacity of the synthetic peptides gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎, and p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ of the Equine Infectious Anemia Virus with the aim of designing a vaccine that effectively protects the host in the future.

Antigenicity was evaluated through ELISA and lymphoproliferation through the BrdU method, in sera and lymphocytes from persistently infected horses, respectively. The results showed that peptides gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ and p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ were recognized by 96, 95 and 70% of the sera, respectively. Lymphoproliferation assays showed that peptide gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ was recognized by 79%, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ by 47%, and p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ only by 31% of the infected animals.

Furthermore, antigenicity was also evaluated through peptide libraries corresponding to the proteins gp90 and p26. For this purpose, reactivity of sera positive and negative to Coggins test was evaluated by ELISA, upon incubating peptide sequences simultaneously synthesized on cellulose membranes (Spot method). Four regions of higher reactivity were located in the protein gp90, namely A_{gp90} (118-162), B_{gp90}(418- 444), C_{gp90} (25-66) and D_{gp90}(178-249), and five in the protein p26, identified as A_{p26}(170-217), B_{p26}(245- 271), C_{p26}(230-253), D_{p26} (266-310), and E_{p26} (317-349).

To evaluate immunogenicity, synthetic peptides gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎, gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ and p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ were emulsified with Freund Complete Adjuvant and inoculated in BALB/c mice for 3 months, every 15 days, with 0 (group 1), 20 (group 2) and 100 (group 3) µg/animal. The humoral immune response was analyzed by evaluating the capacity of antibody synthesis and their capacity to recognize the respective native viral proteins. Cellular immune response was evaluated by quantifying cytokines IL-4 and IFN γ in mice inoculated with gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ and p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎, and measuring the specific proliferation indices in the lymphocytes from animals inoculated with gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ and p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎.

The results showed that peptides gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ and gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ were capable of producing greater antibody synthesis than p26, and all of them recognized native viral proteins. The evaluation of the cellular immune response showed that synthetic peptide gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ was capable of stimulating the production of IFN γ , whereas synthetic peptides gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ and p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎

stimulated proliferation of lymphocytes from animals inoculated with these peptides.

The results obtained would indicate that the synthetic peptides gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ and gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎, could be included in a vaccine to protect horses from EIAV. Peptide p26₍₃₁₈₋₃₄₆₎ would not be included because it has low antigenicity and immunogenicity, but mainly because it would not permit discrimination between vaccinated and infected animals.

Indeed, in this work it was analyze different methods to accurately diagnose EIA, regardless of the disease stage. The results showed that ELISA, using synthetic peptides gp90₍₄₁₆₋₄₄₄₎ and gp45₍₅₂₂₋₅₄₆₎ as antigens, should be applied to detect antibodies, and double PCR should be used to detect viral DNA.

H. Bibliografía

A

- Akens, M.K.; Holznagel, E.; Franchini, M. & Bracher, V. (1997). Comparative analysis of equine lymphocytes subsets in whole blood and gradient-purified samples. *Vet Immunol and Immunopathol*, 58:231-237.
- Alcami, A. & Koszinowski, U.H. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today*, 21(9): 447- 455.
- Alvarez, I.; Gutierrez, G.; Vissani, A.; Rodríguez, S.; Barrandeguy, M. & Trono, K. (2007). Standardization and validation of an agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia using a recombinant p26 antigen. *Vet Microbiol*, 125(3-4):344-351.
- Amores-Sánchez, I.; Gómez- Cordero, I.; Balujad-Conde, I.; Acosta-Bas, C.; Brittos-Moreno, D. & Hernández-Martin, M. (2000). Evaluación de la respuesta inmune contra péptidos sintéticos representativos del *Treponema pallidum* en la línea de ratones BALB/c. *Bioqca*, 25(4):95-99.
- Atherton, E. & Sheppard, R. (1989). Solid Phase Peptide Synthesis. A practical approach. Practical Approach Series. Ed. by Richwood D. and Hames, B.D. IRL, Press New York, 25- 34.

B

- Ball, J. M.; Rushlow, K. E. ; Issel, C. & Montelaro, R. C. (1992). Detailed Mapping of the Antigenicity of the Surface Unit Glicoprotein of Equine Infectious Anemia Virus by Using Synthetic Peptide Strategies. *J Virol*, 66(2): 732-742.
- Ball, J.M.; Henry, N.L.; Montelaro, R.C. & Newman, N.J. (1994). A versatile synthetic peptide-based ELISA for identifying antibody epitopes. *J Immunological Methods*, 171: 37-44.
- Ball, J.M.; Swaggerty, C.L.; Pei, X.; Lim, W.S.; Xu, X.; Cox, V.C. & Payne, S.L. (2005). SU proteins from virulent and avirulent EIAV demonstrate distinct biological properties. *Virology*, 333:132- 144.
- Banks, K.L. & Henson, J.B. (1973). Quantitation of immunoglobulin-bearing lymphocytes and lymphocyte response to mitogens in horses persistently infected by Equine Infectious Anemia Virus. *Infect Immunol*, 8(4):679-682.
- Bar, J.; Zosmer, A.; Hod, M.; Elder, M.G. & Sullivan, M.H. (1997). The regulation of platelet aggregation in vitro by interleukin-1-beta and tumor necrosis factor-alpha: changes in pregnancy and in preclampsia. *Thromb Haemostasis*, 78:1255-1261.

- **Barlett, J.A.; Wasserman, S.S.; Hicks, C.B.; Dodge, R.T.; Weinhold, K.J.; Taoke, O.O.; Ketter, N.; Wittek, A.C.; Palker, T.J. & Haynes, D.F. (1998).** Safety and Immunogenicity of an HLA-based HIV envelope polyvalent synthetic peptide immunogen. *AIDS*, 12(11): 1291-1300.
- **Beisel C. E.; Edwards, J. F.; Dunn, L. L. & Rice, N. R. (1993).** Analysis of Multiple mRNAs from Pathogenic Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) in a Acutely Infected Horse Reveals a Novel Protein, Ttm, Derived from the Carboxy Terminus of the EIAV Transmembrane Protein. *J Virol*, 67 (2): 832-842.
- **Belshan, M.; Baccam, P.; Oaks, L.; Sponseller, B.A.; Murphy, S.C.; Cornette, J. & Carpenter, S. (2001).** Genetic and Biological Variation in Equine Infectious Anemia Virus Rev Correlates with Variable Stage of Clinical Disease in an Experimentally Infected Pony. *Virol*, 279:185-200.
- **Ben-Yididia, T. & Arnon, R. (1997).** Design of peptide and polypeptide vaccines. *Curr Opin Biotechnol*, 8:442-448.
- **Bendali-Ahcéne, S.; Cadore, J.L. & Fontaine, M. (1997).** Anti- α chain monoclonal antibodies of equine MHC class-II antigens: applications to Equine Infectious Anaemia. *Res Vet Sci*, 62:99-104.
- **Bermúdez, A.; Reyes, C.; Guzman, F.; Vanegas, M.; Rosas, J.; Amador, R.; Rodríguez, R.; Patarroyo, M.A. & Patarroyo, M.E. (2007).** Synthetic vaccine update: Applying lessons learned from recent SPf66 malarial vaccine physicochemical, structural and immunological characterization. *Vaccine*, 25:4487- 4501.
- **Birkett, A. J.; Yélamos, B.; Rodríguez-Crespo, I.; Gavilanes, F. & Peterson, D.L. (1997).** Cloning, expression, purification, and characterization of the major core protein (p26) from Equine Infectious Anemia Virus. *Biochim Biophys Acta*, 1339: 62-72.
- **Bodmer, H.C.; Bastin, J.M.; Askonas, B.A. & Townsend, A.R.M. (1989).** Influenza-specific cytotoxic T-cell recognition is inhibited by peptides unrelated in both sequence and MHC restriction. *Immunol*, 66:163-169.
- **Boletín Oficial de la República Argentina del 19/8/05.** Resolución 617/05 de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. "Programa de Control y Erradicación de las Enfermedades Equinas" y su "Reglamento de Control Sanitario".
- **Bona, C.A.; Casares, S. & Brumeanu, T.D. (1998).** Towards development of T-cell vaccines. *Immunol Today*, 19(3):126-133.

-
- **Bot, A.; Antohi, S. & Bona, C.A. (1997).** Immune response of neonates elicited by somatic transgene vaccination with naked DNA. *Front Biosci*, 2, D173-D188.
 - **Boudet, F.; Theze, J. & Zouali, M. (1991).** UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J Immunol Methods*, 142(1): 73-82.
 - **Boudet, F.; Lasarte, J.J.; Sarobe, P.; Borrás-Cuesta, F. & Theze, J. (1996).** Fine analysis of immunoreactivity of V3 peptides: antibodies specific for V3 domain of laboratory HIV type 1 strains recognize multiple V3 sequences synthesized from field HIV type 1 isolates. *Aids Res Hum Retroviruses*, 12(18):1671- 1679.
 - **Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochim*, 72:248- 254.
 - **Breathnach, C.C.; Soboll, G.; Suresh, M. & Lunn, D.P. (2005).** Equine herpesvirus-1 infection induces IFN- γ production by equine T lymphocyte subsets. *Vet Immunol Immunopathol*, 103: 207-215.
 - **Breitfeld, D.; Ohl, L.; Kremmer, E.; Ellwart, J.; Sallustro, F.; Lipp, M. & Forster, R. (2000).** Follicular B-helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B-cell follicles and support immunoglobulin production. *J Exp Med*, 192: 1553-1562.
 - **Briand, J.P.; Muller, S. & Van Regenmortel, M.H.V. (1985)** Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J Immunol Methods*, 78: 59-69.
 - **Brière, F.; Dubois, B.; Fállete, J.; Vandenabeele, S.; Caux, C & Banchereau, J. (2001).** B cells. *Dendritic Cells: Biology and Clinical Application*, 19:255- 261
 - **Brindley, M.A. & Maury, W. (2005).** Endocytosis and a low- pH step are required for preproductive entry of equine infectious. *J Virol*, 79:14482-14488.
 - **Brown, F. (1994^a).** Synthetic peptides and purified antigens as vaccines. *Int J Technol Assessment Health Care*. 10 (1):161-166.
 - **Brown, F. (1994^b).** Peptide vaccines: dream or reality?. The Leeuwenhoek Lecture, *Phil Trans R Soc Lond B*, 344:213-219.
 - **Bruner, M.; Beall, J.B.; Carlone, G.M.; Ades, F.; Guarner, J. & Sampson, J. (2003).** Evaluation of synthetic M type-specific peptides as antigens in a multivalent group A streptococcal vaccine. *Vaccine*, 21:2698-2703.

- **Burke, K.L.; Dunn, G., Ferguson, F.M.; Minor, P.D. & Almond, J.W. (1988).** Can the new polio vaccines take the heat?. *Nature*, 332(789):81-82.
- **Burki, F.; Rossmanith, W. & Rossmanith, E. (1992).** Equine lentivirus, comparative studies on four serological test for the diagnosis of equine infectious anemia. *Vet Microbiol*, 33:353-360.
- **Burroughs Tencza. S; Islam, K. R.; Kalia, V.; Nasir, M.S.; Jolley, M.E. & Montelaro, R.C. (2000).** Development of a Florescence Polarization-Based diagnostic Assay for Equine Infectious Anemia Virus. *J Clin Microbiol*, 38(5): 1854-1859.

C

- **Calvo-Calle, J.M.; Hammer, J.; Sinigaglia, F.; Calvito, P.; Moya Castro, Z.R. & Nardin, E. (1997).** Binding of malaria T cell epitopes to DR and DQ molecules in vitro correlates with immunogenicity in vivo. Identification of a universal T cell epitope in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *J Immunol*, 159: 1362-1373.
- **Campbell, R.S.E. & Robinson, W.F. (1998)** The comparative pathology of the lentiviruses. *J Comp Path*, 119:333-395.
- **Carbone, F.R. & Heath, W.R. (2003).** The role for dendritic cell subsets in immunity to viruses. *Curr Opin Immunol*, 15:416-420.
- **Carpenter, S.; Evans, L.; Sevoian, M. & Chesebro, B. (1987).** Role of the Host Immune Response in Selection of Equine Infectious Anemia Virus variant. *J Virol*, 61(12): 3783- 3787.
- **Carpenter, S. & Chesebro, B. 1989.** Change in Host Cell Tropism Associated with In vitro Replication of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 63(6): 2492-2496.
- **Carpenter, S.S.; Alexanderssen, M.J.; Long, S.; Perryman, S. & Chesebro, B. (1991).** Identification of a hypervariable region in the long-terminal repeat of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 65:1605-1610.
- **Carvalho, M.; Kirkland, M. & Derse, D. (1993).** Protein Interaction with DNA elements in variant Equine Infectious Anemia Virus enhancers and their impact on transcriptional activity. *J Virol*, 67(11):6586-6595.
- **Carver, J.A.; Esposito, G.; Viglino, P.; Fogolari, F.; Guichard, G.; Briand, J.P.; Van Regenmortel, M.H.V.; Brown, F. & Mascagni, P. (1997).** Structural comparison between retro-inverso and parent peptides: Molecular basis for the biological activity of a retro-inverso analogue of the immunodominant fragment of VP1 coat protein from Foot-and-Mouth Disease Virus. *Biopolymers*, 41(5): 569-590.

-
- Caseres, S.; Brumeanu, T-D.; Bot, A. & Bona, C.A. (1997). Protective immunity elicited by vaccination with DNA encoding for a B cell and a T cell epitope of the A/PR/8/34 influenza virus. *Viral Immunol*, 10: 129-136.
 - Charman, H.; Long, C. & Coggins, L. (1979). Specificity of response to viral proteins in horses infected with Equine Infectious Anemia Virus. *Infect Immun*, 23 (2): 472- 478.
 - Cheevers, W.P; Ackley, C.M. & Crawford, T. B. (1978). Structural proteins of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 28 (3): 907- 1001.
 - Chen, C.; Jin, J.; Rubin, M.; Huang, L.; Sturgeon, T.; Weixel, K.M.; Stolz, D.B.; Watkins, S.C.; Bamburg, J.R.; Weisz, O.A. & Montelaro, R.C. (2007). Association of *gag* multimers with filamentous actin during Equine Infectious Anemia Virus assembly. *Curr HIV Res*, 5(3):315-323.
 - Chimini, G.; Pala, P.; Sire, J.; Jordan, B.R. & Maryanski, J.L. (1989). Recognition of oligonucleotide-encoded T cell epitopes introduced into a gene unrelated to the original antigen. *J Exp Med* 169, 297-302.
 - Cho, T.H.; Chang, S.H. & Jan, Y.S. (2000). Dose-dependent selective priming of Th1 and Th2 immune responses is achieved only by an antigen with an affinity over a certain threshold level. *Mol Cell*, 10(6): 695- 704.
 - Chong, Y-H.; Ball, J. M.; Issel, C. J.; Montelaro, R. C. & Rushlow, K. E. (1991^a). Analysis of equine humoral immune responses to the transmembrane envelope glycoprotein (gp45) of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 65 (2): 1013-1018.
 - Chong, Y-H.; Payne, S. L.; Issel, C. J.; Montelaro, R. C. & Rushlow, K. E. (1991^b). Characterization of the antigenic domains of the major core protein (p26) of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 65(2): 1007-1012.
 - Chung, C.; Leib, S.R.; Fraser, D.G.; Ellis, S.A. & McGuire, T.C. (2003). Novel classical MHC I alleles identified in horses by sequencing clones of reverse transcription-PCR products. *Eur J Immunogenet*, 30: 387-396.
 - Chung, C.; Mealey, R. & McGuire, T. C.(2004). CTL from EIAV carrier horses with diverse MHC class I alleles recognize epitope cluster in *gag* matrix and capsid proteins. *Virology*, 327: 144-154.
 - Chung, C.; Mealey, R. H.; McGuire, T.C. (2005). Evaluation of high functional avidity CTL to *gag* epitope clusters in EIAV carrier horses. *Virology*, 342(2): 228-239.
 - Clements, J.E. & Zink, M.C. (1996). Molecular Biology and Pathogenesis of Animal Lentivirus Infection. *Clin Microbiol Reviews*, 9(1): 100- 117.

-
- Coggins, L. & Patten, V. (1970). Immunodiffusion Test for Equine Infectious Anemia. Proceedings of 74th Annual Meeting USA Animal Health Association, 568-517.
 - Coggins, L. & Norcross, N. L. (1970). Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. Cornell Vet, 60: 330.
 - Coggins, L.; Norcross, N.L. & Nusbaum, S.R. (1972). Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. Am J Vet Res, 33:11-18.
 - Coligan, J.E.; Kruisbeek, A.M.; Margulies, D.H.; Shevach, E.M. & Strober, W. (1998^a). Curr Protocols in Immunol. Isolation and fractionation of mononuclear cell population. (Ed. Coico, R.). Editorial John Wiley & Sons, Inc. EU, 3.0.1-3.1.5.
 - Coligan, J.E.; Kruisbeek, A.M.; Margulies, D.H.; Shevach, E.M. & Strober, W. (1998^b). Curr Protocols in Immunol. Proliferative assays for T cell function. (Ed. Coico, R.). Editorial John Wiley & Sons, Inc. EU, 3.12.1-3.21.8.
 - Collins, D.S.; Findlay, K. & Harding, C.V. (1992). Processing of exogenous liposome-encapsulated antigens in vivo generates class I MHC-restricted T cell responses. J Immunol, 148: 3336-3341.
 - Cook, R.F.; Leroux, C.; Cook, S.J.; Berger, S.L.; Lichtenstein, D. L.; Ghabrial, N.N.; Montelaro, R.C. & Issel, C.J. (1998). Development and characterization of an in vivo pathogenic molecular clone of Equine Infectious Anemia Virus. J Virol, 72(2): 1383- 1393.
 - Cook, S.J.; Cook, R.F.; Montelaro, R.C. & Issel, C.J. (2001). Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of Equine Infectious Anemia Virus. Vet Microbiol, 79: 93-109.
 - Cook, R.F.; Cook, S.J.; Li, F.; Montelaro, R.C. & Issel, C.J. (2002). Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for Equine Infectious Anemia Virus (EIAV). J Virol Methods, 105:171-179.
 - Cook, R.F.; Cook, S.J.; Berger, S.L.; Leroux, C.; Ghabrial, N.N.; Gantz, M.; Bolin, P.S. Mousel, M.R.; Montelaro, R.C. & Issel, C.J. (2003). Enhancement of Equine Infectious Anemia Virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides. Virol, 313: 588-603.

- Cook, R.F.; Cook, S.J.; Bolin, P.S.; Howe, L.J.; Zhou, W.; Montelaro, R.C. & Issel, C.J. (2005). Genetic immunization with codon-optimized Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) surface unit (SU) envelope protein gene sequences stimulates immune responses in ponies. *Vet Microbiol*, 108: 23-37.
- Costa, L.R.R.; Miranda Santos, I.K.F.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (1997). Tumor necrosis factor- α production and disease severity after immunization with enriched major core protein (p26) and/ or infection with Equine Infectious Anemia Virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 57: 33-47.
- Craigo, J.K.; Li, F.; Steckberck, J.D.; Durkin, S.; Howe, L.; Cook, S.J.; Issel, C. & Montelaro, R.C. (2005). Discerning an effective balance between Equine Infectious Anemia Virus attenuation and vaccine efficacy. *J Virol*, 79(5): 2666-2677.
- Craigo, J.K.; Sturgeon, T.J.; Cook, S.J.; Issel, C.J.; Leroux, C. & Montelaro, R.C. (2006). Apparent elimination of EIAV ancestral species in a long-term inapparent carrier. *Virology*, 344: 340-353.
- Craigo, J.K.; Zhang, B.; Barnes, S.; Tagmyer, T.L.; Cook, S.J.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (2007^a). Envelope variation as a primary determinant of lentiviral vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(38):15105-15110.
- Craigo, J.K.; Durkin, S.; Sturgeon, T.J.; Tagmyer, T.; Cook, J.S.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (2007^b). Immune suppression of challenged vaccinates as a rigorous assessment of sterile protection by lentiviral vaccines. *Vaccine*, 25: 834-845.

D

- Dai, C.B.; Xiao, Y.; Lu, H.; Shen, R.X. & Shao, Y.M. (2003). Expression and immunogenicity of Equine Infectious Anemia Virus membrane protein gp 90. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chungng Bing Du Xur Za Zhi*, 17(1):73-76.
- Deres, K.; Schild, H.; Wiesmueller, K-H.; Jung, G. & Ramensee, H-G. (1989). *In vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature*, 324: 561-564.
- Desmettre, P. (1999). Diagnosis and prevention of equine infectious diseases: present status, potential, and challenges for the future. *Adv Vet Med*, 41:359-377.

- Drabner, B.; Reineke, U.; Schneider-Mergener, J.; Humphreys, R. E.; Hartmann, S. & Lucius, R. (2002). Identification of T helper cell-recognized epitopes in the chitinase of the filarial nematode *Conchocerca volvulus*. *Vaccine*, 20:3685-3694.
- Dunham, S.P. (2006). Lessons from the cat: Development of vaccines against lentiviruses. *Vet Immunol Immunopathol*, 112:67-77.

E

- Eaves, F.; Molly, J.; Dimmock, C. & Eaves, L. (1994). A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol*, 39: 313-321.
- Edwards, R.J.; Singleton, A.M.; Boobis, A.R. & Davies, D.S. (1989) Cross-reaction of antibodies to coupling groups used in the production of anti-peptide antibodies. *J Immunol*, 135:215-200.
- Egberink, H.F.; Ederveen, J.; Montelaro, R.C.; Pederson, N.C.; Horzinek, M.C. & Coleen, M.J.M. (1990) Intracellular proteins of feline immunodeficiency virus and their antigenic relationship with Equine Infectious anaemia Virus proteins. *J Gen Virol*, 71: 739-743.
- Elliot, S. E.; Pye, S.; Le, T.; Mateo L.; Cox, J.; Mac Donald, L.; Scalzo, A. A.; Forbes, C. A. & Suhrbier, A. (1999). Peptide based cytotoxic T-cell vaccines; delivery of multiple epitopes, help, memory and problems. *Vaccine*, 17: 2009-2019
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82:70-77.
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1972). Enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8:871-879.
- Erlich, H. A. (1989). PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplifications. Using PCR to engineer DNA. (Ed. Myers, T.W. & Gelfand, D.H.). Stockton Press. New York, EU, 61-70.
- Esser, M. T. ; Marchese, R. D. ; Kierstead, L. S. ; Tussey, L. G. ; Wang, F. ; Chirmule, N. & Washabaugh, M. W. (2003). Memory T cells and vaccines. *Vaccine*, 21 :419-430.
- Evans, D. J.; Mckeating, J. & Merdith, J.M. (1989). An engineered poliovirus chimaera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Nature*, 339: 385-388.

F

- Fagerberg, J.; Askelof, P.; Wigzel, H. & Mellstedt, H. (1999). Induction of CD4+ and CD8+ *Bordetella pertussis* toxin subunit S1 specific T cells by immunization with synthetic peptides. *Cell Immunol*, 196:110-121.
- Fagerness, A.J., Flaherty, M.T.; Perry, S.T., Jia, B., Payne, S.L. & Fuller, F.J. (2006). The S2 accessory gene of Equine Infectious Anemia Virus is essential for expression of disease in ponies. *Virology*, 349(1):22-30.
- Fainboin, L. & Geffner, J. (2005^a). Introducción a la Inmunología Humana. Procesamiento y presentación antigénica a los linfocitos T. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina, 169-192.
- Fainboin, L. & Geffner, J. (2005^b). Introducción a la Inmunología Humana. Inmunidad Mediada por Células T. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina, 235-260.
- Fainboin, L. & Geffner, J. (2005^c). Introducción a la Inmunología Humana. Inmunidad Antiviral. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina, 353- 388.
- Fechner, H.; Kung, A.; Geue, L.; Blankenstein, P.; Mewes, G.; Ebner, D. & Beier, D. (1996). Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of Bovine Leukaemia Virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B*, 10:621-630.
- Felmer, R.; Zúñiga, J. & Recabal, M. (2006). Comparative study of nested PCR, ELISA and AGID tests in the detection for Bovine Leukaemia Virus infection in serum, blood and milk samples. *Arch Med Vet*, 38(2):137-141.
- Ferns, R.B.; Tedder, R.S. & Weiss, R.A. (1987). Characterization of monoclonal antibodies against the human immunodeficiency virus *gag* products and their use in monitoring HIV isolate variation. *J Gen Virol*, 68:1543-1551.
- Ferns, R.B.; Partridge, J.C.; Spence, R.P.; Hunt, N. & Tedder, R.S. (1989). Epitope location of 13 anti-*gag* HIV-1 monoclonal antibodies using oligopeptides and their cross-reactivity with HIV-2. *AIDS*, 3: 829-834.
- Fields, G. & Noble, R. (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9 fluorenylmethoxycarbonyl aminoacids. *Int J Pept Protein Res*, 35: 161-214.

-
- **Finstad, C.L.; Wang, C.Y.; Kowalski, J.; Zhang, M.; Li, M.L.; Li, X.M.; Xia, W.G.; Bosland, M.C.; Murphy, K.K.; Walfield, A.M.; COF, W.C. & Zamb, T.J. (2004).** Synthetic luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) vaccine for effective androgen deprivation and its application to prostate cancer immunotherapy. *Vaccine*, 22:1200-1212.
 - **Fischer, T.; Buttner, M. & Rziha, H.J. (2000).** T helper 1-type cytokine transcription in peripheral blood mononuclear cells of pseudorabies virus (Suid herpesvirus 1) - primed swine indicates efficient immunization. *Immunol*, 101:378-387.
 - **Fitzmaurice, C.J.; Brown, L.E.; McInerney, T.L. & Jackson, D.C. (1996)** The assembly and immunological properties of non-linear synthetic immunogens containing T-cell and B-cell determinants. *Vaccine*, 9: 553-560.
 - **Fitzmaurice, C.J.; Brown, L.E.; Kronin, V. & Jackson, D. (2000).** The geometry of synthetic peptide-based immunogens affects the efficiency of T cell stimulation by professional antigen-presenting cells. *Int Immunol*, 12(4):527-535.
 - **Flint, S.J.; Enquist, L.W.; Drug, R.M.; Racaniello, V.R. & Skalka, A.M. (2000).** Principles of virology molecular biology, pathogenesis, and control. Virus entry into cells. (Ed. Skalka, A.M.) ASM Press. Washington, DC, 133- 161.
 - **Frank R. (1992).** Spot-Synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, 48: 9217-9232.
 - **Frank, R. (1993).** Strategies and techniques in simultaneous solid phase synthesis based on the segmentation of membrane type supports. *Bioorg Med Chem Lett*, 3: 425-430.
 - **Frank R & Overwin H. (1996).** SPOT-synthesis: epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. In: Morris, G.E. (Ed.), *Methods in Molecular Biology. Epitope Mapping Protocols*. Human Press, Totowa, 66:149-169.
 - **Frank, R. (2002).** The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports-principles and applications. *J Immunol Methods*, 267:13-26.
 - **Franke, L.; Grunow, R.; Meissner, R.; Portsman, T. & von Baehr, R. (1992).** Inhibition of HIV-1 infection in vitro by murine monoclonal anti-p24 antibodies. *J Med Virol* 37: 137–142.

- Fraser, D. G.; Oaks, J. L.; Brown, W. C. & McGuire T. C. (2002). Identification of broadly recognized, T helper 1 lymphocyte epitopes in an equine lentivirus. *Immunol*, 105: 295- 305.
- Fraser, D. G.; Mealey, R. H. & McGuire, T. C. (2003). Selecting peptides to optimize Th1 responses to an equine lentivirus using HLA-DR binding motifs and defined HIV-1 Th peptides. *Immunogenetics*, 55: 508-514.
- Fraser, D.G.; Leib, S. R.; Zhan, B. S.; Mealey, H. R.; Brown W. C. & McGuire, T. C. (2005). Lymphocyte proliferation responses induced to broadly reactive Th peptides did not protect against Equine Infectious Anemia Virus challenge. *Clin Diag Lab Immunol*, 12 (8): 983-993.

G

- Garcia, M.; Alsina, M.A. & Haro, I. (2000). Liposomas as vehicles for the presentation of a synthetic peptide containing an epitope of hepatitis A virus. *Vaccine*, 18:276-283.
- Ghadersohi, A.; Coelen, R.J. & Hirst, R.G. (1997). Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol*, 56: 87-98.
- Ghosh, S. & Jackson, D.C. (1999). Antigenic and immunogenic properties of totally synthetic peptide based anti-fertility vaccines. *Int Immunol*, 11(7):1103-1110.
- Gomes P.; Giraldo, E. & Andreu, D. (2001). Antigenicity modulation upon peptide cyclization: application to the GH loop of foot-and-mouth disease virus strain C₁-Barcelona. *Vaccine*, 19:3459-3466.
- González, S.; Nazábal, C.; Rao, K.V.S.; Reyes, O.; Garay, H.E.; Caballero, E.; Alvarez-Obregón, J.; Sardiñas, G. & Silva, R. (2004). Cell mediated immune response elicite in mice alter immunization with the P64k meningococcal protein: epitope mapping. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 42: 233-239.
- Gorny, M.K.; Gianakakos, V.; Sharpe, S. & Zolla-Pazner, S. (1989) Generation of human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 86(5):1624–1628.
- Goudsmit, J. (1988). Immunodominant B-cell epitopes of the HIV-1 envelope recognized by infected and immunized hosts. *AIDS*, 2 (1) :S41-S45.
- Greene, W.K.; Meers, J.; Delfierro, G; Carnegie, P.R. & Robinson, W.F. (1993). Extensive sequence variation of feline immunodeficiency virus *env* genes in isolates from naturally cats. *Arch Virol*, 133: 51-62.

- Grund, C.; Lechman, E. R.; Issel, C. J. & Montelaro, R. C. (1994). Lentivirus cross-reactive determinants present in the capsid protein of equine infectious anaemia virus. *J Gen Virol*, 75: 657-662.
- Grund, C. H.; Lechman, E. R.; Pezzuolo, N. A.; Issel, C. J. & Montelaro, R. C. (1996) Fine specificity of equine infectious anaemia virus gp90-specific antibodies associated with protective and enhancing immune responses in experimentally infected and immunized ponies. *Short communication. J Gen Virol*, 77: 435-442.
- Gutmann, S.; Zawatzky, R. & Muller, M. (2005). Characterisation and quantification of equine interferon gamma. *Vet Immunol Immunopathol*, 104:105-115.

H

- Haase, T.A. (1986). Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*, 322 (10): 130-136.
- Hahn, C.S.; Hahn, Y.S.; Braciale, T.J. & Rice, C.M. (1992) Infectious Sindbis Virus transient expression vectors for studying antigen processing and presentation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 2679-2683.
- Hamajima, K.; Bukawa, H.; Fukushima, J.; Kawamoto, S.; Kaneko, T.; Sekigawa, K.; Tanaka, S.; Tsukuda, M. & Okuda, K. (1995). A macromolecular multicomponent peptide vaccine prepared using the glutaraldehyde conjugation method with strong immunogenicity for HIV-1. *Clin Immunol Immunopathol*, 77(3): 374-379.
- Hammond, S.A.; Cook, S.J.; Lichtenstein, D.L.; Issel, S.J. & Montelaro, R.C. (1997). Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by Equine Infectious Anemia Virus is a complex and lengthy process. *J Virol*, 71:3870-3852.
- Hammond, S. A.; Issel, C. J. & Montelaro, R. C. (1998). General method for the detection and in vitro expansion of cytolytic T Lymphocytes. *J Immunol Methods*, 213: 75-83.
- Hammond, S.A.; Cook, S.J.; Falo, L.D.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (1999^a). A particulate viral protein vaccine reduces viral load and delays progression to disease in immunized ponies challenged with Equine Infectious Anemia Virus. *Virol*, 254:37- 49.
- Hammond, S.A.; Raabe, M. L.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (1999^b). Evaluation of antibody parameters as potential correlates of protection or enhancement by experimental vaccines to Equine Infectious Anemia Virus. *Virol*, 262: 416- 430.
- Hammond, S.A.; Horohov, D. & Montelaro, R.C. (1999^c). Functional characterization of equine dendritic cells propagated *ex vitro* using recombinant human GM-CSF and recombinant equine IL-4. *Vet Immunol Immunopathol*, 30:197-214.

-
- Hammond, S.A.; Li, F.; McKeon, B. M.; Cook, S. J.; Issel, C. J. & Montelaro, R. C. (2000). Immune responses and viral replication in long-term Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 74:5968-5981.
 - Harrold, S. M.; Cook, S. J. & Cook, R. F. (2000) Tissue sites of persistent infection and active replication of Equine Infectious Anemia Virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *J Virol*, 74(7):3112-3121.
 - Hatanaka, H.; Iorin, O.; Raoi, Z.; Fry, E.; Kingsman, A. & Stuart, D. I. (2002). Structure of Equine Infectious Anemia Virus matrix protein. *J Virol*, 76 (4): 1876-1883.
 - Heldens, J.G.M., Weststrate, M.W. & Van Den Hoven, R. (2002). Area under curve calculations as a tool to compare the efficacy of Equine Influenza vaccines. A retrospective analysis of three independent field trials. *J Immunol Methods*, 264:11-17.
 - Herrera, S.; Banelo, A.; Perlazza, B.L.; Valencia, A.Z.; Cifuentes, C.; Hurtado, S. Quintero, G.; López, J.A.; Corradin, G. & Arévalo-Herrera, M. (2004). Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Int J Parasitol*, 34:1535-1546.
 - Herzenberg, L. A. & Tokuhsa, T. (1980). Carrier-priming leads to hapten-specific suppression. *Nature*, 285:664- 670.
 - Hinkula, J.; Rosen, J.; Sundqvist, V.A.; Stigbrand, T. & Wahren B. (1990). Epitope mapping of the HIV-1 *gag* region with monoclonal antibodies. *Mol Immunol*, 27: 395–403.
 - Horohov, D.W. (2000). Equine T-Cell cytokines. Protection and pathology. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 16(1):1-14.
 - Howe, L.; Leroux, C.; Issel, C. J. & Montelaro, R. C. (2002). Equine Infectious Anemia Virus envelope evolution in vivo during persistent progressively increases resistance to *in vitro* serum antibody neutralization as a dominant phenotype. *J Virol*, 76 (21):10588- 10597.
 - Howe, L.; Craig, J.K.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (2005). Specificity of serum neutralizing antibodies induced by transient immune suppression of inapparent carrier ponies infected with a neutralization-resistant Equine Infectious Anemia Virus envelope strain. *J Gen Virol*, 86:139-149.
 - Huerta, M.; De Aluja, A. S.; Frangoso, G.; Toledo, A.; Villalobos, N.; Hernández, M.; Gevorkian, G.; Acero, G.; Díaz, A.; Alvarez, I.; Avila, R.; Beltán, C.; Garcia, G.; Martinez, J. J.; Larralde, C. & Sciutto, E. (2002). Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis:

successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine*, 20:262-266.

- Hunter, E. & Swanstrom, R. (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Microbiol Immunol* 157: 187-253
- Hussain, K.A.; Issel, C.J.; Schnorr, K.L.; Rwambo, P.M. & Montelaro, R.C. (1987). Antigenic analysis of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) variants by using monoclonal antibodies: Epitopes of Glycoprotein gp90 of EIAV stimulate neutralizing antibodies. *J Virol*, 61(10): 2956- 2961.
- Hussain, K.A.; Issel, C.J.; Schnorr, K.L.; Rwambo, P.M.; West, M. & Montelaro, R.C. (1988). Antigenic mapping of the envelope proteins of Equine Infectious Anemia Virus: identification of a neutralization domain and a conserved region on glycoprotein 90. *Arch Virol* 1988, 98: 213-224.

I

- Ijaz, M.K.; Alkarmi, T.O.; El-Mekki, A.W.; Galadari, S.H.I.; Dar, F.K. & Babiuk, L.A. (1995). Priming and induction of anti-rotavirus antibody response by synthetic peptides derived from VP7 and VP4. *Vaccine*, 13(4):331-338.
- Innis, M. A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J. J. & White, T. J. (1990). *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Optimization of PCRs.* Academic Press. San Diego. California. EU, 3-11.
- Issel, C.J. & Coggins, L. (1979). Equine Infectious Anemia: current knowledge. *J Am Vet Med Assoc*, 174: 727-733.
- Issel, C.J. & Foil, L.D. (1984). Studies on Equine Infectious Anemia Virus transmission by insects. *J Am Vet Med Assoc*, 184:293- 297.
- Issel, C.J.; Adams, W.V. & Foil, L.D. (1985). Prospective study of progeny of inapparent carriers of Equine Infectious Anemia Virus. *Am J Vet Res*, 46(5): 1114-1116.
- Issel, C.J.; Morohov, D.W; Lea, D.F.; Adams Jr,W.V.; Hagius, S.D.; McManus, J.M.; Allisn, A.C. & Montelaro, R.C. (1992). Efficacy of inactivated whole-virus and subunit vaccines in preventing infection and disease caused by Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 66(6): 3398-3408.
- Issel, C.J. & Cook, R.F. (1993). A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. (1993). *J Vet Diagn Invest*, 5:137-141.

J

- **Jacobs, R.;** Song, Z.; Poor, H.; Henney, J.; Taylor, A.; Jefferson, B.; Vernaw, W. & Valli, V. (1992). Proviral detection and serology in bovine leukaemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphosarcoma. *Can J Vet Res*, 56:339-348.
- **Janeway, C.A.;** Travers, P.; Walport, M. & Shlomichk, M.J. (2005). Immunobiology. The immune system in health and disease. Adaptive Immunity to infection. (Eds.Lawrence, E.). Editorial Garland Sci Publishing. USA. 409-460
- **Janvier, B.;** Archinard, P. ; Mandrand, B. ; Goudeau, A. & Barin, F. (1990). Linear B-cell epitopes of the major core protein of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Virol*, 64:4258-4263. *Author's Correction*, *J Virol*, 66:613, 1992.
- **Jiang, S.;** Song, R.; Popov, S.; Mirshahidi, S. & Ruprecht, R.M. (2006). Overlapping synthetic peptides as vaccines. *Vaccine*, 24:6356-6365.
- **Jin, S.;** Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (2004). Serological method using recombinant S2 protein to differentiate Equine Infectious Anemia Virus (EIAV)- infected and EIAV-vaccinated horses. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(6):1120-1129.
- **Jin, S.;** Zhanf, B.; Wiesz, O. A. & Montelaro, R. C. (2005). Receptor-mediated entry by Equine Infectious Anemia Virus utilizes a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol*, 79(23): 14489-14497.

K

- **Kaaden, O.;** Lange, S.; Romanowski, W.; Marre, H.; Pfeisticker, J. & Roselius, R. (1982). Transient viraemia with Bovine Leukaemia Virus in bulls. *Zentralbl Veterinarmed B*, 29:269-274.
- **Karle, S.;** Nishiyama, Y.; Taguchi, H.; Zhou, Y.-X.; Loun, J.; Planque, S.; Hanson, C. & Paul, S. (2003). Carrier-dependent specificity of antibodies to a conserved peptide determinant of gp120. *Vaccine*, 21: 1213-1218.
- **Kemeny, L.J.;** Mott, L.O. & Pearson, J.E. (1971). Titration of Equine Infectious Anemia Virus. Effect of dosage on incubation time and clinical signs. *Cornell Vet*, 61:687-695.
- **Kim, C.H.;** Casey, J.W. (1992). Genomic variation and segregation of Equine Infectious Anemia Virus during acute infection. *J Virol*, 66:3879-3882.
- **Kim, C.H. & Casey, J.W.** (1994). In vivo replication status and envelope heterogeneity of Equine Infectious Anemia Virus in an inapparent carrier. *J. Virol.*, 68:2777-2780.

- Kim, C.H.; Campbell, J. & Butcher, E.C. (2001^a) Nonpolarized memory T cells. *Trends in Immunol*, 22(10): 527- 530.
- Kim, C. H.; Rott, L. S.; Clark-Lewis, I.; Campbell, D.J.; Wu, L. & Butcher, E.C. (2001^b). Sub-specialization of CXCR5+ T cells; B-helper activity is focused in a germinal-center localized subset of CXCR5+ T cells. *J. Exp. Med.*, 193: 1373-1382.
- Kono, Y. (1969). Viremia and Immunological responses in horses infected with Equine Infectious Anemia Virus. *Nat Inst Anim Health Q (Tokyo)*, 9:1-9.
- Kono, Y. & Kobayashi, K. (1970). Changes in pathogenicity of Equine Infectious Anemia Virus during passages in horse leukocyte cultures. *Natl Inst Health Q (Tokyo)*, 10:106-112.
- Kono, Y. (1973). Recurrences of Equine Infectious anemia. Approaches to understanding the mechanisms. In: Bryans, JT, Gerber, H (Eds.), *Proceedings of the Third International Conference on Equine Infectious Diseases*. Karger, Basel, 175-186.
- Kono, Y.; Hirasawa, K.; Fukunaga, Y. & Taniguchi, T. (1976). Recrudescence of Equine Infectious Anemia by treatment with immunosuppressive drugs. *Natl Inst Anim Health Q*, 16:8-15.
- Kono, Y. & Kobayashi, K. (1979). Changes in pathogenicity of Equine Infectious Anemia Virus during passages in horse leukocyte cultures. *Natl Inst Health Q (Tokyo)*, 10:106-112.
- Kowalski, M.; Potz, J.; Basiripour, L.; Doreman, T.; Chun, W.; Terwilliger, E.; Dayton, A.; Rosen, C.; Haseltine, W. & Sodroski, J. (1987). Functional regions of the envelope glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus type 1. *Sci*, 237:1351-1355.
- Krchnák, V.; Vágner, J.; Safár, P. & Lebl, M. (1988). Noninvasive continuous monitoring of solid-phase peptide synthesis by acid-base indicator. *Collect Czechoslov Chem Commun*, 53: 2542-2548.

L

- Langemeier, J. L.; Cook, S. J.; Cook, R. F.; Rushlow, K. E.; Montelaro, R. C. & Issel, C. J. (1996). Detecton of Equine Infectious Anemia Viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. *J Clin Microbiol*, 34(6):1481-1487.
- Langeveld, J.P.M.; Casal, I.J.; Osterhauns, A.D.M.E.; Cortes, E., de Swart, R.; Vela, C.; Dalsgaard, K.; Puijk, W.; Schaaper, W.M.M. & Meloen, R.H. (1994). First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J of Virol*, 68 (7): 4506-4513.

- Lanier, J.G.; Newman, M.J.; Lee, E.M.; Sette, A. & Ahmed, R. (2000). Peptide vaccination using nonionic block copolymers induces protective anti-viral CTL responses. *Vaccine*, 18:549-557.
- Leroux C.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (1997). Novel and dynamic evolution of Equine Infectious Anemia Virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected Pony. *J Virol*, 71(12):9627-9639.
- Leroux, C.; Craigo, J.K.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (2001). Equine Infectious Anemia Virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. *J. Virol.*, 75(10):4570-4583.
- Leroux, C.; Cadoré, J-L. & Montelaro, R.C. (2004). Review article. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us?. *Vet Res*, 35:485-512.
- Levy, D.E. & Garcia-Sastre, A. (2001). The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12: 143-156.
- Lew, A.M.; Thomas, L.M. & Huntington, P.J. (1993). A comparison of ELISA, FAST-ELISA and gel diffusion tests for detecting antibody to Equine Infectious Anemia Virus. *Vet Microbiol*, 34:1-5.
- Li, S.; Schulman, J.L.; Moran, T.; Bona, C. & Palese, P. (1992). Influenza A virus transfectants with chimeric hemagglutinins containing epitopes from different subtypes. *J Virol*, 66(1): 399-404.
- Li, F.; Puffer, B.A. & Montelaro, R.C. (1998). The S2 gene of Equine Infectious Anemia Virus is dispensable for viral replication in vitro. *J Virol*, 72: 8344-8348.
- Li, F.; Leroux, C.; Craigo, J.K.; Cook, S.J.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (2000). The S2 gene of Equine Infectious Anemia Virus is a highly conserved determinant of viral replication and virulence properties in experimentally infected ponies. *J Virol*, 74: 573-579.
- Li, F.; Craigo, J.K.; Howe, L.; Steckbeck, J.D.; Cook, S.J.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (2003). A live attenuated Equine Infectious Anemia Virus proviral vaccine with a modified S2 gene provides protection from detectable infection by intravenous virulent virus challenge of experimentally inoculated horses. *J Virol*, 77:7244-7253.
- Li, H.; Zhang, X.; Fan, X.; Shen, T.; Tong, X.; Shen, R. & Shao, Y. (2005). A conservative domain shared by HIV gp120 and EIAV gp90: Implications for HIV vaccine design. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 21(12):1057-1059.

-
- Lichtenstein D.L.; Rushlow, K.E.; Cook, F.; Raabe, M.L.; Swardson, C.J.; Kociba, G.J.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (1995). Replication *in vitro* and *in vivo* of an Equine Infectious Anemia Virus mutant deficient in dUTPase activity. *J Virol*, 69(5):2881-2888.
 - Lichterfeld, M.; Kaufmann, D.E.; Yu, X.G.; Mui, S.K.; Addo, M.M.; Johnston, M.N.; Cohen, D.; Robbins, G.K.; Pae, E.; Alter, G.; Wurcel, A.; Stone, D.; Rosenberg, E.S.; Walker, B.D. & Altfeld, M. (2004). Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T Cells. *JEM*, 200 (6):701- 712.
 - Lim, W.-S.; Payne, S.L.; Edwards, J.F.; Kim, I. & Ball, J.M. (2005). Differential effects of virulent and avirulent Equine Infectious Anemia Virus on macrophage cytokine expression. *Virol*, 332: 295-306.
 - Liu, Y- J.; Soumelis, V. & Kadowaki, N. (2001). T-cell activation and polarization by dendritic cells. *Dendritic Cells: Biology and Clin Application*, 3:21-28.
 - Liu, S.; Yu, X.; Wang, C.; Wu, J.; Kong, X. & Tu, C. (2006). Quadruple antigenic epitope peptide producing immune protection against classical swine fever virus. *Vaccine*, 24:7175-7180.
 - Lombarda, S.; Garcelli, C.; La Rosa, C.; Zaccaro, L.; Specter, S.; Malvaldi, G.; Tozzini, F.; Esposito, F. & Bendinelli, M. (1993). Identification of a linear neutralization site within the third variable region of the Feline Immunodeficiency Virus Envelope. *J Virol*, 67(8):4742-4749.
 - Lonning, S.M.; Zhang, W. & McGuire, T.C. (1999^a). *Gag* protein epitopes recognized by CD4⁺ T-helper lymphocytes from Equine Infectious Anemia Virus -infected carrier horses. *J Virol*, 73 (5):4257-4265.
 - Lonning, S.M.; Zhang, W; Leib, S.R. & McGuire T.C. (1999^b). Detection and induction of Equine Infectious Anemia Virus specific cytotoxic T-lymphocyte responses by use of recombinant retroviral vectors. *J Virol*, 73 (4): 2762-2769.
 - Lottersberger, J.; Salvetti, J.L. & Tonarelli, G. (2003). Desarrollo y evaluación de péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos anti-VIH. *Rev Argent Microbiol*, 35: 149–155.
 - Lottersberger, J.; Salvetti, J.L.; Beltramini, L.M. & Tonarelli G. (2004). Antibody recognition of synthetic peptides mimicking immunodominant regions of HIV-1 p24 and p17 proteins. *Rev Argent Microbiol*, 36: 151–157.

- Lovgren, K. & Larsson, M. (1994). Conjugation of synthetic peptides to carrier iscoms: factors affecting the immunogenicity of the conjugate. *J of Immunol Methods*, 173:237-243.
- Lynn, W.S.; Tweedale, A.; Cloyd, M.W. (1988). Human immunodeficiency virus (HIV-1) cytotoxicity: perturbation of the cell membrane and depression of phospholipid synthesis. *Virology*, 163:43-51.
- Le T.T.T.; Drane, D.; Malliaros, J. Cox, J.C.; Rothel, L.; Pearse, M.; Woodberry, T.; Gardner, J. & Suhrbier, A. (2001). Cytotoxic T cell polyepitope vaccines delivered by ISCOMs. *Vaccine*, 19:4669-4675.

M

- **Maghni, K.; Nicolescu, O.M. & Martin, J.G. (1999).** Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-Bromo-2-Deoxyuridine (BrdU) ELISA. *J Immunol Methods*, 223:185-194.
- **Margni, R. (1996^a).** *Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Métodos utilizados para la identificación y cuantificación de antígenos y anticuerpos.* Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina, 697-728.
- **Margni, R. (1996^b).** *Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Metodologías para la evaluación de células inmunocompetentes.* Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina, 729-771.
- **Margni, R. (1996^c).** *Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Electroforesis en gel de poliacrilamida.* Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina, 906-922.
- **Margni, R. (1996^d).** *Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Preparación de sueros inmunes y purificación de Anticuerpos.* Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina, 937-944.
- **Margni, R. (1996^e).** *Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Antígenos.* Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina, 47-74.
- **Martarano, L.; Stephens, R.; Rice, N. & Derse, D. (1994).** Equine Infectious Anemia Virus trans-regulatory protein Rev controls viral mRNA stability, accumulation, and alternative splicing. *J Virol*, 68: 3102-3111.
- **Mascaro, L. A. (1975)** *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos.* Editorial Albatros 1975, Buenos Aires. Capítulo X. *Enfermedades del sistema circulatorio*, 437-453.

- **Matsushita, T.; Hesterberg, L.K.; Porter, J.P.; Smith, B.J. & Newman, L.E. (1989).** Comparison of diagnostic tests for the detection of Equine Infectious Anemia antibody. *J Vet Diagn Invest*, 1:50-52.
- **Matthews, J.N.S; Altman, D. G.; Campbell, M.J. & Royston, P. (1999).** Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J*, 300:230- 235.
- **Maury, W. (1994^a).** Monocyte maturation controls expression of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 68(10): 6270-6279.
- **Maury, W.J.; Carpenter, S.; Graves, K. & Chesebro, B. (1994^b).** Cellular and viral specificity of Equine Infectious Anemia Virus *Tat* transactivation. *Virol*, 200:632-642.
- **Maury, W.; Perryman, S; Oaks, J.L.; Seid, B.K.; Crawford, T.; McGuire, T.C. & Carpenter, S. (1997).** Localized sequence heterogeneity in the long terminal repeats of in vivo isolates of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 71(7): 4929-4937.
- **Maury, W.; Oaks, J.L. & Bradley, S. (1998).** Equine endothelial cells support productive infection of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 72:9291- 9397.
- **McConnell, S. & Katada, M. (1981).** Transmission of Equine Infectious Anemia Virus from a horse negative to agar gel immunodiffusion test. *Eq Vet J*, 13:123-126.
- **McConnico, R.S.; Issel, C.J.; Cook, S.J.; Cook, R.F.; Floyd, C. & Bisson, H. (2000).** Predictive methods to define infection with Equine Infectious Anemia Virus in foals out of reactor mares. *J Equine Vet Sci*, 20(6):387-392.
- **McDermott, J.; Farrell, L.; Ross, R. & Barklis E. (1996).** Structural analysis of human immunodeficiency virus type 1 *gag* protein interactions, using cysteine-specific reagents. *J Virol* 70: 5106–5114.
- **McGuire, T.C.; Hoosier, G.I.V. Jr & Henson, J.B. (1971).** The complement-fixation reaction in Equine Infectious Anemia: Demonstration of inhibition by IgG (T). *J Immunol*, 167(6): 1738-1744.
- **McGuire, T.C. (1977).** Immunoglobulin G subclass [IgG and IgG (T)]. Interaction with the p26 group specific antigen of Equine Infectious Anemia Virus: immunodiffusion and complement-fixation reactions. *Am J Vet Res*, 38(5):655-658.
- **McGuire, T.C. (1986).** Pathogenesis of Equine Infectious Anemia. *Animal Models of Retrovirus Infection and their relationship to AIDS*, 295-300.

-
- McGuire, T.C.; O'Rourke, K.I.; Baszler, T.V.; Leib, S.R.; Brassfield, A.L. & Davis, W. (1994^a). Expression of functional protease and subviral particles by vaccinia virus containing Equine Infectious Anaemia virus *gag* and 5' *pol* genes. *J Gen Virol*, 75:895-900.
 - McGuire, T.C.; Tumas B.D.; Byrne K. M.; Hines, M. T.; Leib, S. R.; Brassfield, A. L.; O' Rourke, K. & Perryman, L. E. (1994^b). Major Histocompatibility complex-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes from horses with Equine Infectious Anemia Virus recognize *env* and *gag*/PR Proteins. *J Virol*, 68(3):1459-1467.
 - McGuire, T.C.; Zhang, W.; Hines, M.T.; Henney, P.J. & Byrnes, K. M. (1997). Frequency of memory cytotoxic T lymphocytes to Equine Infectious Anemia Virus proteins in blood from carrier horses. *Virol*, 238: 85-93.
 - McGuire, T.; Leib, S.R.; Lonning, S.M.; Zhang, W.; Byrne K.M. & Mealey, R.H. (2000). Equine infectious anaemia virus proteins with epitopes most frequently recognized by cytotoxic T lymphocytes from infected horses. *J Gen Virol*, 81: 2735-2739.
 - McGuire, T.C.; Fraser, D. G. & Mealey, R. H. (2002). Cytotoxic T lymphocytes and neutralizing antibody in the control of Equine Infectious Anemia Virus. *Viral Immunol*, 15(4): 521-531.
 - McGuire, T.C.; Leib, S. R.; Mealey, R. M.; Fraser, D. G. & Prieur, D. J. (2003). Presentation and binding affinity of Equine Infectious Anemia Virus CTL envelope and matrix protein epitopes by an expressed equine classical MHC Class I Molecule. *J Immunol*, 171: 1984-1993.
 - Mealey, R. H.; Fraser, D. C.; Oaks, J. L.; Cantor, G. H. & McGuire, T.C. (2001). Immune reconstitution prevents continuous Equine Infectious Anemia Virus replication in an arabian foal with severe combined immunodeficiency: lessons for control of lentivirus. *Clin Immunol*, 101(2): 237-247.
 - Mealey, R. H.; Zhang, B.; Leib, S. R.; Littke, M. H. & McGuire, T. C. (2003). Epitope specificity is critical for high and moderate avidity cytotoxic T lymphocytes associated with control of viral load and clinical disease in horses with Equine Infectious Anemia Virus. *Virol*, 313: 537-552.
 - Mealey, R. H.; Leib, S. R.; Pownder, S. L. & McGuire, T. (2004). Adaptive immunity is the primary force driving selection of Equine Infectious Anemia Virus envelope SU variants during acute infection. *J Virol*, 78 (17): 9295-9305.
 - Mealey, R.; Sharif, A.; Ellis, S. A.; Littke, M. H.; Leib, S. R. & McGuire, T. C. (2005). Early detection of dominant Env-specific and subdominant *gag*-specific CD8+ lymphocytes in Equine Infectious Anemia Virus –

- infected horses using major histocompatibility complex class I/ peptide tetrameric complexes. *Virology*, 339:110-126.
- **Messele, T.; Roos, M.T. L.; Hamann, D.; Koot, M.; Fontanet, A. I.; Miedema, F.; Schellekens, P.T.A. & Rinde, F. T. (2001).** Nonradioactive techniques for measurements of *in vitro* T-Cell proliferation: alternatives to the [³H] Thymidine incorporation assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7:687- 692.
 - **Milich, D.R.; Hughes, J.L.; McLachlan, A. & Thornton, G.B. (1988).** Hepatitis B synthetic immunogen comprised of nucleocapsid T-cell sites and an envelope B-cell epitope. *Immunol*, 85:1610-1614.
 - **Miller, M.; Garry, R.; Jaynes, J. & Montelaro, R.C. (1991)** A structural correlation between lentivirus transmembrane proteins and natural cytolytic peptides. *AIDS Res Hu Retroviruses*, 7: 511-519.
 - **Miller, R. J.; Scott, C. J., Bridges, S. & Nava, S. Minireviews. (2000).** Human Immunodeficiency Virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *J Virol*, 74: 7187-7195.
 - **Misumi, S.; Endo, M.; Mukai, R.; Tachibana, K.; Umeda, M.; Honda, T.; Takamune N. & Shoji, S. (2003).** A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression. *J Biol Chem*, 278, 34: 32335-32343.
 - **Montelaro, R. C.; Parekh, A.; Orrego, A. & Issell, C. J. (1984^a).** Antigenic variation during persistent infections by Equine Infectious Anaemia Virus, a retrovirus. *J Biol Chem*, 259 (16):10539:10544
 - **Montelaro, R.C.; West, M. & Issel, C.J. (1984^b).** Antigenic reactivity of the major glycoprotein of equine infectious anemia virus, a retrovirus. *Virology*, 136: 368- 374.
 - **Montelaro, R.C.; Robey, W.G.; West, M.D.; Issel, C.J. & Fischinger, P.J. (1988).** Characterization of the serological cross-reactivity between glycoproteins of the Human Immunodeficiency Virus and Equine Infectious Anaemia Virus. *J Gen Virol*, 69:1711-1717.
 - **Morein, B.; Vilacres-Erikson, M.; Lovgren, K. & Akerblom, L. (1994).** Recombinant and Synthetic Vaccines. (Ed. Talwar, G.P.). Norosa Publishing House, 447-457.
 - **Muller, S.; Benkirane, N.; Guichard, G.; Van Regenmortel, M.H.V. & Brown, F. (1998).** The potential of retro-inverso peptides as synthetic vaccines. *Exp Opin Invest Drugs*, 7(9):1429-1438.
 - **Murakami, K.; Sentsui, H.; Shibara, T.; Yokohama, T. (1999).** Reduction of CD4+ and CD8+ T lymphocytes during febrile periods in horses experimentally infected with Equine Infectious Anemia Virus. *Vet Immunol Immunopathology*, 67:131-10.

- **Murphy, F.A.; Gibas, E.P.J.; Horzinek, M.C. & Studdert, M.J. (1999^a).** Veterinary Immunology. Viral taxonomy and nomenclature. (Ed. Springer Netherlands). Academic Press. San Diego. California. EU, 23-42.
- **Murphy, F.A.; Gibas, E.P.J.; Horzinek, M.C. & Studdert, M.J. (1999^b).** Veterinary Immunology. Viral Replication. (Ed. Springer Netherlands). Academic Press. San Diego. California. EU, 43-60.
- **Murphy, F.A.; Gibas, E.P.J.; Horzinek, M.C. & Studdert, M.J. (1999^c).** Veterinary Immunology Immune Response to Viral Infections. (Ed. Springer Netherlands). Academic Press. San Diego. California. EU, 127-144.
- **Murphy, F.A.; Gibas, E.P.J.; Horzinek, M.C. & Studdert, M.J. (1999^d).** Veterinary Immunology. Retroviridae. (Ed. Springer Netherlands). Academic Press. San Diego. California. EU, 23-42.
- **Murray J. (1998)** How the MHC selects Th1/Th2 immunity. *Immunol Today*, 19(4): 157-162.

N

- **Nagarajan, M.M. & Simard, C. (2001).** Detection of horses infected naturally with Equine Infectious Anemia Virus by nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 94. 97-109.
- **Nagarajan, M.M. & Simard, C. (2007).** *Gag* genetic heterogeneity of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada. *Virus Res*, pS0168-1702.
- **Nakajima, H. & Ushimi, C. (1970).** Immunodiffusion studies of purified Equine Infectious Anemia Virus. *Inf Immun*, 3:373-377.
- **Nehete, P.N.; Casement, K.S.; Arlinghaus, R.B. & Sastry, K.J. (1995).** Studies on in vivo induction of HIV-1 envelope-specific cytotoxic T lymphocytes by synthetic peptides from the V3 loop region of HIV-1 III_B gp 120. *Cell Immunol*, 160(2):217-23.
- **Niedrig, M.; Hinkula, J.; Weigelt, W.; L'age-Stehr, J.; Pauli, G.; Rosen, J. & Wahren B. (1989).** Epitope mapping of monoclonal antibodies against human immunodeficiency virus type 1 structural protein by using peptides. *Virol*, 63: 3525–3528.
- **Niedrig, M.; Hinkula, J.; Harthus, H-P.; Broker, M.; Hopp, L.; Pauli, G. & Wahren, B. (1991).** Characterization of murine monoclonal antibodies directed against the core proteins of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Virol*, 65(8): 4529–4533.

- Norcross, N.L. & Coggins, L. (1971). Characterization of an Equine Infectious Anemia antigen extracted from infected horse spleen tissue. *Infect Immun*, 4 (5): 528- 531.
- Noya, O.; Alarcón de Noya, B.; Ballen, D.E.; Bermúdez, H.; Bout, D. & Hoebeke, J. (2001). Immunogenicity of synthetic peptides from the Sm31 antigen (cathepsin B) of the *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasite Immunol*, 23:567-573.
- Nussbaum, A.K.; Cuttler, C.; Tenzer, S. & Schild, H. (2003). Using the World Wide Web for predicting CTL epitopes. *Curr Opin Immunol*, 15:69-74.

O

- Oaks, J.L.; McGuire, T.C.; Ulibarri, C. & Crawford, T.B. (1998). Equine Infectious Anemia Virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *J Virol*, 72:7263-7269.
- Obeid, O.E.; Partidos, C.D.; Howard, C.R. & Steward, M.W. (1995). Protection against Morbillivirus-Induced Encephalitis by immunization with a rationally designed synthetic peptide vaccine containing B- and T-cell epitopes from the fusion protein of Measles Virus. *J Virol*; 69(3):1420-8.
- Ohishi, K.; Kabeya, H; Amanuma, H & Onuma, M. (1997). Peptide-based Bovine Leukemia Virus (BLV) vaccine that induces BLV-Env specific Th-1 type immunity. *Leukemia*, 3: 223-6.
- Oleksowicz, L.; Mrowiec, Z.; Zuckerman, D.; Isaacs, R.; Dutcher, J. & Puszkin, E. (1994). Platelet activation induced by interleukin-6: evidence for a mechanism involving arachidonic acid metabolism. *Thromb Haemostasis*, 72: 302-308.
- Olive, C.; Toth, I. & Jackson, D. (2001). Technological advances in antigen delivery and synthetic peptide vaccine developmental strategies. *Mini Rev Med Chem*, 1:129-438.
- Ou, C.Y.; Kwok, S.; Mitchell, S.W.; Mack, D.H.; Sninsky, J.J.; Krebs, J.W.; Feorino, P.; Warfield, D. & Schochetmen, G. (1988). DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Sci*, 239: 295-297.
- O'Rourke, K.; Perryman, I.E. & McGuire, T.C. (1988). Antiviral antiglicoprotein and neutralizing antibodies in foals with Equine Infectious Anaemia Virus. *J Gen Virol*, 69: 667- 674.
- O'Rourke, K. I.; Perryman, L. E. & McGuire, T.C. (1989). Cross-neutralizing and subclass characteristics of antibody from horses with Equine Infectious Anemia Virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 23: 41-49.

- O'Rourke, K.I.; Besola, M.L. & McGuire, T.C. (1991). Proviral sequences detected by polymerase chain reaction in peripheral blood cells of horses with Equine Infectious Anemia lentivirus. *Arch Virol*, 117(1/2): 109-119.

P

- Pancino, G.; Ellerbrok, H.; Sitbon, M.; & Sonigo, P. (1994). Conserved framework of envelop glycoproteins among lentivirus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 188: 77-105.
- Panina-Bordignon, P.; Tan, A.; Termijtelen, A.; Demotz, S.; Corradin, G. & Lanzavecchia, A. (1989). Universally immunogenic T cell epitopes promiscuous binding to human MHC Class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol*, 19:2237-2242.
- Pare, J. & Simard, C. (2004). Comparison of comercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of Equine Infectious Anemia. *Can J Vet Res*, 68(4):254-258.
- Pauli, R.; Passeggi, C.; De Torres, R.; Virgilio, J. & Enrique, H. (1982). Aislamiento del virus de anemia infecciosa equina en Santa Fe y desarrollo de un antígeno para inmunodifusión por cromatografía de afinidad. *Rev Med Vet*, 63 (1): 29-37.
- Payne, S.L.; Fang, F-D.; Liu, C.P.; Dhruva, B.R.; Rwambo, P.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (1987). Antigenic variation and lentivirus persistence: variations in envelope gene sequences during EIAV infection resemble changes reported for sequential isolates of HIV. *Virology* 161: 1266- 1270.
- Payne, S.L.; Rushlow, K.; Dhruva, B.R.; Rwambo, P.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (1989). Localization of conserved and variable antigenic domains of Equine Infectious Anemia Virus envelope glycoproteins using recombinant *env*-encoded protein fragments produced in *Escherichia coli*. *Virology*, 172: 609-615.
- Payne, S.L.; Raush, J.; Rushlow, K.; Montelaro, R.C.; Issel, C.; Flaverty, M.; Perry, S.; Sellon, D & Fuller, F. (1994). Characterization of infectious molecular clones of Equine Infectious Anaemia Virus. *J Gen Virol*, 75: 425-429.
- Payne, S.L.; Qi, X-M.; Shao, H.; Dwyer, A. & Fuller, F.J. (1998). Disease induction by virus derived from molecular clones of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 71(1): 483-487.
- Pearson, J.E.; Becvar, C.S. & Mot, L.O. (1971). Evaluation of the immunodiffusions (Coggins) test for the diagnosis of Equine Infectious Anemia. *Proc US Animal Health Association*, 74: 259-267.

- **Pearson, J.E. & Gipson, C.A. (1988).** Standardization of Equine Infectious Anemia Immunodiffusion and CELISA tests and their application to control of the disease in the United States Equine. *Vet Sci*, 8:60-61.
- **Perry, S.T.; Flaherty, M.T.; Kelley, M.J.; Calbough, D.L.; Tronick, S.; Coggins, L.; Whetter, L.; Lengel, C.R. & Fuller, F. (1992).** The surface envelope protein gene region of Equine Infectious Anemia Virus is not important determinant of tropism *in vitro*. *J Virol*, 66: 4085- 4097.
- **Perryman, L.E.; O'Rourke, K.I. & McGuire, T.C. (1988).** Immune responses are required to terminate viremia in Equine Infectious Anemia lentivirus infection. *J Virol*, 62:3073-3976.
- **Perryman, L.E.; O'Rourke, K.I.; Mason, P.H. & McGuire, T.C. (1990).** Equine monoclonal antibodies recognize common epitopes on variants of Equine Infectious Anaemia Virus. *Immunol*, 71: 592- 594.
- **Pfaff, E.; Mussgay, M.; Bohm, H. O.; Schulz, G.E. & Schaller, H. (1982)** Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize Foot-and -Mouth Disease Virus. *EMBO J*, 1: 869-874.
- **Pinto, L.A.; Berzofsky, J.A.; Fowke, K.R.; Little, R.F.; Galíndez-Merced, F.; Humphrey, R.; Ahlers, J.; Dunlop, N.; Cohen, R.B.; Steingerg, S.M.; Nara, P.; Shearer, G.M. & Yarchoan, R. (1999).** HIV-specific immunity following immunization with HIV synthetic envelope peptides in asymptomatic HIV-infected patients. *AIDS*, 13(15):2003-2012.
- **Piza, A.S.; Pereira, A.R.; Terreran, M.T.; Mozzer, O.; Tanuri, A.; Brandao, P.E. & Richtzenhain, L.J. (2007).** Serodiagnosis of Equine Infectious Anemia by agar gel immunodiffusion and ELISA using a recombinant p26 viral protein expressed in *Escherichia coli* as antigen. *Prev Vet Med*, 78(3-4):239-245.
- **Price, D.A.; Klenerman, P.; Booth, B.L.; Phillips, E.R. & Sewell, A.K. (1999).** Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity. *Immunol Today*, 20(5): 212- 216.
- **Proviterra, P.; Bouamr, F.; Murray, D.; Carter, C. & Scarlata, S. (2000).** Binding of Equine Infectious Anemia Virus matrix protein to membrane bilayers involves multiple interactions. *J Mol Biol*, 296: 887-898.

Q

- **Quinlivan, M.; Cook, R.F. & Cullinane, A. (2007).** Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the *gag* gene. *Vet Rec* 160(18):611-618.

R

- Raabe, M.L., Issel C.J.; Cook, S.J.; Cook, R.F.; Woodson, B. & Montelaro, R.C. (1998^a). Immunization with a recombinant envelope protein (rgp90) of EIAV produces a spectrum of vaccine efficacy ranging from lack of clinic disease to severe enhancement. *Viol*, 245:151-162.
- Raabe, M.L.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (1998^b). Equine monocyte-derived macrophage cultures and their applications for infectivity and neutralization studies of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol Methods*, 71:87-104.
- Raabe, M.L.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (1999). *In Vitro* antibody-dependent enhancement assays are insensitive indicators of *in vivo* vaccine enhancement of Equine Infectious Anemia Virus. *Viol*, 259:416-427.
- Reizis, B.; Eisenstein, M.; Mor, F. & Cohen, I.R. (1998). The peptide-binding strategy of the MHC class II I-A molecules. *Immunol Today*, 19(5):212-216.
- Rice, N.R.; Lequarte, A.S.; Casey, J.W.; Lahn, S.; Stephen, R.M. & Edwards, J. (1989). Viral DNA in horses infected with Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 63(12):5194-5200.
- Rice, N.R.; Henderson, L.E.; Sowder, R.C.; Copeland, T.D.; Oroszlan, S. & Edwards, J.F. (1990). Synthesis and processing of the transmembrane envelope protein of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol*, 64:3770-3778.
- Ridgely, S.L. & McGuire, T.C. (2002). Lipopeptide stimulation of MHC class I-restricted memory cytotoxic T lymphocytes from Equine Infectious Anemia Virus - infected horses. *Vaccine*, 20: 1809-1819.
- Ridgely, S.I.; Zhang, B. & McGuire, T.C. (2003). Response of ELA-A1 horses immunized with lipopeptide containing an Equine Infectious Anemia Virus ELA-A restricted CTL epitope to virus challenge. *Vaccine* 21: 491-506.
- Ridgway, D. (2003). The first 1000 dendritic cell vaccines. *Cancer Invest*, 21(6):873-886.
- Rivera, J. A. & McGuire, T. C. (2005). Equine Infectious Anemia Virus - infected dendritic cells retain antigen presentation capability. *Viol*, 335:145-154.
- Robert-Hebmann, V.; Emiliani, S.; Jean, F.; Resnicoff, M.; Traincard, F. & Devaux C. (1992^a). Clonal analysis of murine B-cell response to the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1)-*gag* p17 and p25 antigens. *Mol Immunol*, 29: 729-738.

-
- Robert-Hebmann, V.; Emiliani, S.; Resnicoff, M.; Jean, F. & Devaux, C. (1992^b). Subtyping of Human Immunodeficiency Virus isolates with a panel of monoclonal antibodies: identification of conserved and divergent epitopes on p17 and p25 core proteins. *Mol Immunol*, 29: 1175–1183.
 - Robinson Jr, W. E.; Kawamura, T.; Gorny, M. K.; Lake, D.; Xu, J. Y.; Matsumoto, Y.; Sugano, T.; Masuho, Y.; Mitchell, W. M. & Hersh, E. (1990). Human monoclonal antibodies to the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein gp41 enhance HIV-1 infection in vitro. *EMBO J*, 87(8): 3185–3189.
 - Robinson, K.; Mostratos, A. & Grecis, K. R. (1995). Generation of Rubeola Virus-neutralizing antibodies by vaccination with synthetic peptides. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 10:191-198.
 - Rogers, P.R. & Croft, M. (1999). Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *J Immunol*, 1205-1213.
 - Roitt, I.M & Delves, P.J. (2001). *Inmunología. Fundamentos. Interacción primaria con el antígeno.* (Ed. Blackwell Sci). Editorial Médica Panamericana. Argentina. 89- 118.
 - Rosati, S.; Profiti, M.; Lorenzetti, R.; Bandecchi, P.; Mannelli, A.; Ortoffi, M. & Ciabatti, I.M. (2004). Development of recombinant capsid antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis of animal lentivirus infections. *J Virol Methods*, 121:73-78.
 - Rothoef, T.; Gonschorek, A.; Bartz, H; Anhenn, O. & Schauer, U. (2003). Antigen dose, type of antigen-presenting cell and time of differentiation contribute to the T helper 1/T helper 2 polarization of naive T cells. *Immunol*, 110(4):430-439.
 - Ruedl, C.; Bachmann, M.F. & Kopf, M. (2000). The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand. *Eur J Immunol*, 30(7): 2056-2064.
 - Russell, K. E.; Walker, K. M.; Miller, R. T. & Sellon, D.C. (1998). Hyperglobulinemia and lymphocyte subset changes in naturally infected inapparent carriers of Equine Infectious Anemia Virus. *AJVR*, 59(8): 1009- 1015.
 - Russell, K. E.; Perkins, P. C.; Hoffman, M. R.; Miller, R. T.; Walker, K. M.; Fuller, F. J. & Sellon, D. C. (1999). Platelets from thrombocytopenic ponies acutely infected with Equine Anemia Virus are activated *in vivo* and hypofunctional. *Virol*, 259:7-19.
 - Rutgers, T.; Gordon, D. & Gethoye, A.M (1988). Hepatitis B surface antigen as carrier matrix for the repetitive epitope of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Biotechnology*, 6: 1065-1069.

- **Rwambo, P.M.; Issel, C.J.; Adams, W.V.; Hussain, K.A.; Miller, M. & Montelaro, R.C. (1990).** Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) humoral responses of recipient ponies and antigenic variation during persistent infection. *Arch Virol*, 111:199-212.

S

- **Salinovich, O.; Payne, S.L.; Montelaro, R.C.; Hussain, K.A.; Issel, C.J. & Schnorr, K.I. (1986).** Rapid emergence of novel antigenic and genetic variants of equine infectious anemia virus during persistent infection. *J Virol*, 57:71-80.
- **Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989^a).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Analysis and cloning of eucaryotic genomic DNA.* Cold Spring Harbour Press. New York. EU, 9.4-9.59.
- **Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989^b).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Gel electrophoresis.* Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbor. New York. EU, 6.2- 6.35.
- **Sbai, H.; Mehta, A. & DeGroot, A.S. (2001).** Use of T cells epitopes for vaccine development. *Curr Drug Targets Infect Disor*, 1:303-313.
- **Schulze, M.P.; Leclerc, C.; Jolivet, M.; Audibert, F. & Cedec, L. (1985).** Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J Immunol*, 135: 2319-2322.
- **Sedlik, C.; Dadaglio, G.; Saron, M.F.; Deriaud, E.; rojas, M.; Casal, S.I. & Leclerc, C. (2000).** *In vivo* induction of a high-avidity, high-frequency cytotoxic T-lymphocyte response is associated with antiviral protective immunity. *J Virol*, 74(13):5769-5775.
- **Segrest, D.; Deloof, H.; Dohlman, J. G.; Broulitté, C.G. & Anantharamaiah, G.N. (1990).** Amphipathic helix motif: class and properties. *Proteins*, 8:110-117.
- **Sellon, D.C.; Perry, S.T.; Coggins, L.; Fuller, F.J. & Rushlow, K.E. (1992^a).** Equine Infectious Anemia Virus gene expression: characterization of the RNA splicing pattern and the protein products encoded by open reading frames S1 and S2. *J Virol*, 66:5906-5913.
- **Sellon, D.C.; Perry, S.T.; Coggins, L. & Fuller, F.J. (1992^b).** Wild-type Equine Infectious Anemia Virus replicates *in vivo* predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *J Virol*, 66(10):5906-5913.
- **Sellon, D.C., Walter, K.M.; Russel, K.E., Perry, S.T.; Covington, P. & Fuller, F.J. (1996).** Equine Infectious Anemia Virus replication is

- upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. *J Virol*, 70:590-594.
- **Sellon, D. C.; Russell, K. E.; Monroe, V. L. & Walker, K. M. (1998).** Increased interleukin-6 activity in the serum of ponies acutely infected with equine infectious anaemia virus. *Res Vet Sci*, 66: 77-80.
 - **Sentsui, H.; Inoshima, Y.; Murakami, K.; Akashi, H.; Purevtseren, B.; Pagmajav, O. & Sigiura, T. (2001).** Cross reaction of recombinant Equine Infectious Anemia Virus antigen to heterologous strains and application for serological survey among horses in the field. *Microbiol Immunol*, 45(1): 45-50.
 - **Settle, A. & Fikes, J. (2003).** Epitope-based vaccines: an update on epitope identification vaccine design and delivery. *Curr Opin Immunol*, 15(4): 461-470.
 - **Shen, R-X., Xu, Z.D.; He, X.S. & Zhang, S.X. (1979).** Study on immunological methods of equine infectious anemia. *China Agric Sci*, 41-115.
 - **Shen, R-X. & Wang, Z. (1985).** Development and use of an equine infectious anemia donkey leucocyte attenuated vaccine. *EIAV: a national review of policies, programs, and future objectives. Programs and future objectives.* Harbin Vet Res Institute Chinese Academy of Agricultural Sci. Amarillo, TX: American Quarter Horse Association; 1-26
 - **Shen, T.; Liang, H.; Tong, X.; Fan, X.; He, X.; Ma, Y. ; Xiang, W.; Shen, R.; Zhang, X. & Shao, Y. (2006).** Amino acid mutations of the infectious clone from Chinese EIAV attenuated vaccine resulted in reversion of virulence. *Vaccine*, 24(6): 738-749.
 - **Sherman, L.; Gazit, A.; Yaniv, A.; Kawadami, T.; Dahlberg, J.E. & Tronick, S.R. (1988).** Localization of sequences responsible for trans-activation of the Equine Infectious Anemia Virus long terminal repeats. *J Virol*, 57: 71-80.
 - **Shively, M. A.; Banks, K. L.; Greenlee, A. & Anderson, P. K. (1982).** Antigenic stimulation of T-Lymphocytes in chronic nononcogenic Retrovirus infection: Equine Infectious Anemia. *Infection and immunity*, 36 (1):38-46.
 - **Siedek, E.; Little, S.; Mayall, S.; Edington, N. & Hamblin, A. (1997).** Isolation and characterization of equine dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 60:15-31.
 - **Simmonds, P.; Balfe, P.; Peutherer, J.F.; Ludlam, C.A.; Bishop, J.O. & Brown, J.L. (1990).** Human immunodeficiency virus- infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and a low copy numbers. *J Virol*, 64:864-872.

-
- **Sininaglia, F.; Guttlinger, M.; Kilgus, J.; Doran, D.M.; Matile, H. & Etlinger, H. (1988).** A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC Class II molecule. *Nature*, 336: 778-780.
 - **Stein, C.D.; Lotze, J.C. & Mott, L.O. (1942).** Transmission of Equine Infectious Anemia by the stablefly, *Stomoxys calcitrans*, the horsefly, *tabanus sulcifrons* (Macquart), and by injection of minute amounts of virus. *Am J Vet Res*, 3:183-183.
 - **Steinbach, F.; Deeg, C.; Mauel, S. & Wagner, B. (2002).** Equine Immunol: offspring of the serum horse. *Trends Immunol*, 23(5):223- 225.
 - **Steinman, R.; Dombrowski, J.; O'Connor, T.; Montelaro, R.C.; Tonelli, Q.; Lawrence, K.; Seymour, C.; Goodness, J.; Pedeson, N. & Anderson, P.R. (1990).** Biochemical and immunological characterization of the major structural proteins of Feline Immunodeficiency Virus. *J Gen Virol*, 71: 701-706.
 - **Stephens, R.M.; Casey, J.W.; Rice, N.R. (1986).** Equine Infectious Anemia Virus *gag* and *pol* genes: relatedness to visna and AIDS virus. *Sci*, 231(4738):589-594.
 - **Soutullo, A.; Verwimp, V.; Riveros, M.; Pauli, R. & Tonarelli, G. (2001).** Design and validation of an ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic antigens. *Vet Microbiol*, 79:111-121.
 - **Sparbier, K. & Walden, P. (1999).** T cell receptor specificity and mimotopes. *Curr Opin Immunol*, 11:214-218.
 - **Sponseller, A.B.; Sparks, W.O., Wannemueheler, Y.; Li, Y.; Antons, A.K.; Oaks, L.J. & Carpenter, S. (2007).** Immune selection of Equine Infectious Anemia Virus *env* variants during the long-term inapparent stage of disease. *Virol*, 363: 156-165.
 - **Spyrou, V.; Papanastassopoulou, M; Psychas, V.; Billinis, C., Koumbati, M.; Viemmas, J. & Koptopoulos, G. (2003).** Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. *Vet Microbiol* 95:49-59.
 - **Spyrou, V.; Papanastassopoulou, M.; Koumbati, M.; Nikolakaki, S.V. & Koptopoulos, G. (2005).** Molecular analysis of the proviral DNA of Equine Infectious Anemia Virus in mules in Greece. *Virus Res*, 107(1):63-72.
 - **Suarez, D.L. & Whestone, C. (1997).** Size variation within the second hypervariable region of the surface glycoprotein gene of the bovine lentivirus BIV in experimentally and naturally infected cattle. *J Virol*, 71:2482-2486.

- Suzuki, T.; Ueda, S. & Samejima, T. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anemia. *Vet Microbiol*, 7(4):307-315.
- Swardson, C.J.; Lichtenstein, D.L.; Wang, S.; Montelaro, R.C. & Kociba, G.J. (1997). Infection of bone marrow macrophages by Equine Infectious Anemia Virus. *Am J Vet Res*, 58(12):1402-7.

T

- Tabatabai, L.B. & Pugh, G.W. Jr. (1994). Modulation of immune responses in BALB/c mice vaccinated with Brucella abortus Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine*, 12(10): 919-24.
- Tagmeyer, T.L.; Craigo, J.K.; Cook, S.J.; Issel, C.J. & Montelaro, R.C. (2007). Envelope-specific T-helper and cytotoxic T-lymphocyte responses associated with protective immunity to Equine Infectious Anemia Virus. *J Gen Virol*, 88(4): 1324-1336.
- Takada A. & Kawaoka, Y. (2003). Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications. *Rev Med Virol*, 13:387- 398.
- Tan, P. H.; Beutelspacher, S. C.; Xue, S.-A.; Wang, Y.-H.; Mitchell, P.; McAlister, J. C.; Larkin, D. F. P.; McClure, M. O.; Stauss, H. J., Ritter, M. A.; Lombardi G. & George, A. J.T. (2005). Modulation of human dendritic- cell function following transduction with viral vectors: Implications for gene therapy. *Blood*, 105(10): 3824-3832.
- Taylor, P. M.; Thomas, D. B. & Mills, K. H. G. (1987). In vitro culture of T cell lines and clones. *Lymphocytes, a practical approach.* (Ed.Klaus, G. G. B.) IRL Press. Oxford. England, 133–147.
- Tonarelli, G.G.; Lottersberger, J., Salvetti, J.L.; Jacchieri, S.; Silva-Lucca, R.A. & Beltramini, L.M. (2000). Secondary structure improved bioaffinity correlation in elongated and modified synthetic epitope peptides from p24 HIV-1 core protein. *Lett Pept Sci*, 5: 1–8.
- Toossi, Z.; Young, T.G.; Averilli, L.E.; Hamilton, B.D.; Shiratsuchi, H. & Ellner, J.J. (1995). Induction of Transforming Growth Factor β 1 by purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 63: 224-228.
- Trono, K.; Pérez-Filgueira, D.; Duffy, S.; Borca, M. & Carrillo, C. (2001). Seroprevalence of Bovine Leucemia Virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol*, 26: 235-248.

- Truong, C.; Brand, D.; Mallet, F.; Roingeard, P. & Barin, F.(1997). Comparison of antibody responses to different forms of HIV-1 core antigens by epitope mapping. *J Med Virol*, 51(3):145-51.
- Tschetter, J.R.; Byrne, K. M.; Perryman, L.E. & McGuire, T.C. (1997). Control of Equine Infectious Anemia Virus is not dependent on ADCC mediating antibodies. *Virol*, 230:275-280.
- Tschetter, J.R.; Davis, W.C.; Perryman, L.E. & McGuire, T.C. (1998). CD8 dimer usage on $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes from equine lymphoid tissues. *Immunobiology*, 198(4):424-438.
- Tumas, D.B.; Hines, M.T.; Perryman, L.E.; Davis, W.C. & McGuire, T.C. (1994). Corticosteroid immunosuppression and monoclonal antibody-mediated CD5+ T lymphocyte depletion in normal and Equine Infectious Anaemia Virus-carrier horses. *J Gen Virol*, 75:959-968.

U

- Uhl, E.W.; Heaton-Jones, T.G.; Pu, R.; Yamamoto, J.K. (2002). FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine, a review FIV vaccine 2002. Update and review. *Vet Immunol Immunopathol*, 90:113-132.
- Ulmer, J.B.; Donnelly, J.S. & Liu, M.A. (1994). Vaccination with polynucleotides in modern vaccinology. (Ed. Kustach, E.). Plenum Press. Nueva York. EU, 13-24.

V

- Valero, M.I.; Camarero, J.A.; Haack, T. Mateu, M.G.; Domingo, E.; Giral, E. & Andreu, D. (2000). Native-like cyclic peptide models of a viral antigenic site: finding a balance between rigidity and flexibility. *J Mol Recognit*, 13:5-13.
- Van Houten, N.E.; Zwick, M.B.; Menendez, A. & Scott, J.K. (2006). Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. *Vaccine*, 24: 4188-4200.
- Van Regenmortel, M.H.V.; Guichhard, G.; Benkirane, N.; Briand, J.P.; Muller, S. & Brown, F.(1998). The potential of retro-inverso peptides as synthetic vaccines. *Dev Biol Stand Basel*, 92:139-143.
- Van Regenmortel, M.H.V. & Muller, S. (1999). Synthetic Peptides as Antigens. *Immunization with peptides*. (Ed. P.C. van der Vliet). Elsevier Sci B.V. Amsterdam. The Netherlands, 133-178.
- Van Regenmortel, M.H.V. (1999). Molecular design empirical discovery in peptide-based vaccines. Coming to terms with fuzzy recognition sites and ill-defined structure function relationship in *Immunol. Vaccine*, 18: 216-221.

- Van Regenmortel, M.H.V. (2000). Are there two distinct research strategies for developing biologically active molecules: rational design and empirical selection. *J Mol Recognit*, 13:1-4.
- Venable, R.M.; Pastor, R.W.; Brooks, B.R. & Carson, F.W. (1989). Theoretically determined three-dimensional structures for amphipathic segments of the HIV-1 gp41 envelope protein. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 5:7-22.
- Vijayakrishnan, L.; Manivel, V. & Rao, K.V.S. (1998). B Cells responses to a peptide epitope. VI. The kinetics of antigen recognition modulates B cell-mediated recruitment of T helper subsets. *J Immunol*, 161: 4661-4670.
- Volpina, O. M.; Surovoy, A. Yu.; Zhmak, M. N.; Kuprianova, M. A.; Koroev, D. O.; Chepurkin, A. V.; Toloknov, A. S. & Ivanov, V. T. (1999). A peptide construct containing B-cell and T-cell epitopes from the Foot-and-Mouth Disease Viral VP1 protein induces efficient antiviral protection. *Vaccine*, 17:577-584.

W

- Wagner, R.; Modrow, S.; Boltz, T.; Fließbach, H.; NIEDRIG, M. V.; Brunn, A. & Wolf, H. (1992). Immunological reactivity of a human immunodeficiency virus type 1 derived peptide representing a consensus sequence of the gp120 major neutralizing region V3. *Arch Virol* 127:139-152.
- Wang, Y.C.; Shen, M.; Fang, X.D.; Ye, J; Shen, F.; Walfield, A.M.; Wang, J.J.G.; Li, M.L.; Li, X.M.; Salas, M.; Shearer, M.H.; Kennedy, R.C. & Hanson, C.V. (2002). Synthetic AIDS vaccine by targeting HIV receptor. *Vaccine*, 21:89-97.
- Warger, T.; Schild, H. & Rechtsteiner, G. (2007) Initiation of adaptive immune responses by transcutaneous immunization. *Immunol Lett*, 109: 13-20.
- Whetter, L.; Archambault, D.; Perry, S.; Gazit, A.; Coggins, L.; Yaniv, A.; Clabough, D.; Dahlberg, J.; Fuller, F. & Tronick, S. (1990). Equine Infectious Anemia Virus derived from a molecular clone persistently infects horses. *J Virol*, 64(12): 5750-5756).
- Whitmire, J.K. & Ahmed, R. (2000). Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. *Curr Opin Immunol*, 12:448-455.
- Wiertz, E.J.H.J.; Gaans-van-den Brink, J.A.M.; Gausepohl, H.; Prochnicka-Chalufour, A.; Hoogerhout, P. & Poolman, J.T. (1992). Identification of T cell epitopes occurring in a meningococcal class 1 outer membrane protein using overlapping peptides assembled with simultaneous Multiple Peptide Synthesis. *J Exp Med*, 176:79-88.

- Woolums, A.R.; Siger, L.; Jonson, S.; Gallo, G. & Conlon, J. (2003). Rapid onset of protection following vaccination of calves with multivalent vaccines containing modified-live or modified-live and killed BHV-1 is associated with virus-specific interferon gamma production. *Vaccine*, 21:1158-1164.
- Wright, P. F.; Nilsson, E.; Van Rood, E. M. A.; Lelenta, M. & Jeggo, M. H. (1993). Standardisation and validation of enzyme linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 12:435-450.

Z

- Zhang, W.; Lonning, S.M. & McGuire, T.C. (1998). *Gag* protein epitopes recognized by ELA-A-restricted cytotoxic T lymphocytes from horses with long-term Equine Infectious Anemia Virus infection. *J Virol*, 72(12): 9612-9620.
- Zhang, W.; Auyong, D.B.; Oaks, J. L. & McGuire, T.C. (1999). Natural variation of Equine Infectious Anemia Virus *gag* protein cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Virol*, 261:241-252
- Zhang, B.; Jin S.; Jin, J.; Li, F. & Montelaro, R. C. (2005). A tumor necrosis factor receptor family protein macrophage-tropic equine lentivirus. *PNAS*, 102 (28):9918-9923.
- Zhang, X.; Wang, Y.; Liang, H.; Wei, L.; Xiang, W.; Shen, R. & Shao, Y. (2007). Correlation between the induction of Th1 cytokines by an attenuated Equine Infectious Anemia Virus vaccine and protection against disease progression. *J Gen Virol*, 88: 998-1004.
- Zheng, Y.-H. ; Nakaya, T.; Sentsui, H.; Kameoka, M.; Kishi M. ; Hagiwara, K.; Takahashi, H.; Kono, Y. & Ikuta, K. (1997^a). Insertions, duplications and substitutions in restricted gp90 regions of equine infectious anaemia virus during febrile episodes in an experimentally infected horse. *J Gen Virol*, 78: 807-820.
- Zheng, Y.-H.; Sentsui, H.; Nakaya, T.; Kono, Y. & Ikuta, K. (1997^b). *In vivo* dynamics of equine infectious anemia viruses emerging during febrile episodes: insertions/duplications at the principal neutralizing domain. *J Virol*, 71 (7): 5031-5039.
- Zimmerman, D.H.; Lloyd, J.P.; Heisey, D.; Winship, M.D.; Siwek, M.; Talor, E. & Sarin, P.S. (2001). Induction of cross clade reactive specific antibodies in mice by conjugates of HGP-30 (peptide analog of HIV-1_{SF2} p17) and peptide segments of human β -2-microglobulin or MHC II β chain. *Vaccine*, 19:4750-4759.

- Zvi A.; Kustanovich, I.; Feigelson, D.; Levy, R.; Eisenstein, M.; Matsushita, S.; Richalet-Secordel, P.; Van Regenmortel, M. H. & Anglister, J. (1995^a). NMR mapping of the antigenic determinant recognized by an anti-gp120, Human Immunodeficiency Virus neutralizing antibody. *Eur J Biochem*, 229:178–187.
- Zvi, A.; Kustanovich, I.; Hayek, Y.; Matsushita, S. & Anglister, J. (1995^b). The principal neutralizing determinant of HIV-1 located in V3 of gp120 forms a 12-residue loop by internal hydrophobic interactions. *FEBS Lett*, 368:267–270.
- Zvi, A.; Tugarinov, V.; Faiman, G. A.; Horovitz, A. & Anglister, J. (2000). A model of a gp120 V3 peptide in complex with an HIV-neutralizing antibody based on NMR and mutant cycle-derived constraints. *Eur J Biochem*, 267:767–79.