

Tesis Doctoral

Desarrollo de candidatos vacunales contra Babesia bovis basados en vectores virales y proteínas recombinantes

Jaramillo Ortiz, José Manuel

2016-03-16

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

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

Cita tipo APA:

Jaramillo Ortiz, José Manuel. (2016-03-16). Desarrollo de candidatos vacunales contra Babesia bovis basados en vectores virales y proteínas recombinantes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Jaramillo Ortiz, José Manuel. "Desarrollo de candidatos vacunales contra Babesia bovis basados en vectores virales y proteínas recombinantes". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-16.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales -

“Desarrollo de candidatos vacunales contra *Babesia bovis* basados en vectores virales y proteínas recombinantes”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires área:
Ciencias Biológicas.

Lic. José Manuel Jaramillo Ortiz

Directora: Dra. Silvina Elizabeth Wilkowsky

Consejero de estudios: Dr. Horacio Esteban Hopp

Lugar de trabajo: Laboratorio de Hemoparásitos - Instituto de Biotecnología. Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, CICVyA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA – Castelar.

Buenos Aires, marzo de 2016. Fecha de defensa: 16 - 3 - 16

Desarrollo de candidatos vacunales contra *Babesia bovis* basados en vectores virales y proteínas recombinantes

Resumen

La babesiosis bovina es una enfermedad parasitaria transmitida por garrapatas y causada por los protozoarios intraeritrocíticos *Babesia bovis* y *B. bigemina*. Esta infección provoca importantes pérdidas económicas en varias regiones tropicales y subtropicales del mundo donde el vector está presente. En nuestro país, la zona ganadera afectada incluye el noreste y noroeste por encima del paralelo 33°S en donde la garrapata vector *Rhipicephalus microplus* encuentra las condiciones ecológicas adecuadas para su desarrollo.

La vacunación contra la babesiosis bovina es una de las medidas de control existente para esta parasitosis y se realiza en terneros menores a los nueve meses de edad utilizando principalmente hemovacunas refrigeradas a base de cepas vivas atenuadas de estos parásitos. Si bien esta vacuna es efectiva en una única dosis, confiriendo protección durante toda la vida útil del bovino, presenta algunas desventajas en su producción, vida media y logística de distribución. Por este motivo, el desarrollo de alternativas vacunales que superen estas dificultades resulta de interés para mejorar las condiciones sanitarias de la región y aumentar la competitividad del sector.

En este presente trabajo de tesis, se han desarrollado tres candidatos vacunales basados en las regiones inmunodominantes de tres antígenos de *B. bovis* altamente conservados e inmunodominantes para el bovino; estos son las proteínas MSA-2c (del inglés, *Merozoite Surface protein – 2c*), RAP-1 (*Rhoptry Associated Protein – 1*) y HSP20 (*Heat Shock Protein 20*). Estos 3 antígenos se han obtenido en dos plataformas de expresión diferentes: como vectores virales no replicativos y como proteínas recombinantes.

El primer candidato es un virus vaccinia Ankara modificado (rMVA), un poxvirus no replicativo que codifica en un único marco de lectura estas tres regiones antigénicas como un multiantígeno al que denominamos rMABbo.

Asimismo se ha desarrollado un Adenovirus recombinante (rAd) que codifica el mismo multiantígeno. También, se han obtenido en un sistema procariota las tres proteínas por separado y el multiantígeno recombinante como única poliproteína.

Con los tres inmunógenos desarrollados, se estudió la respuesta inmune celular y humoral inducida por los mismos en el modelo murino en esquemas de vacunación “*prime – boost*” homólogos y heterólogos. Los resultados mostraron que la vacunación heteróloga que combinó el *prime* con rAd o con el rMABbo y el *boost* con el virus rMVA resultaron ser más efectivas que sus esquemas homólogos, pudiendo detectarse en ambos tipos de esquemas heterólogos altos títulos de anticuerpos específicos de tipo IgG con una mayor proporción del isotipo IgG2a, niveles significativos de IFN γ secretado y un alto porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ productoras de una y ambas citoquinas de perfil Th1: IFN γ y TNF α .

Los aportes de este trabajo de tesis permitieron desarrollar nuevos inmunógenos recombinantes basados en un diseño racional de antígenos y plataformas de expresión para optimizar la respuesta inmune protectora hacia *Babesia bovis*. Además se ha caracterizado la respuesta inmune inducida en el modelo murino, permitiendo dilucidar los aspectos claves a tener en cuenta para seleccionar la mejor estrategia vacunal a ser evaluada frente al desafío con *Babesia bovis* en bovinos, único modelo biológico para este parásito.

Palabras clave: *Babesia bovis* – virus Vaccinia Ankara modificado – Adenovirus – multiantígeno – esquemas “*prime – boost*”.

Development of vaccine candidates against *Babesia bovis* based on viral vectors and recombinant proteins

Abstract

Bovine babesiosis is a tick – borne disease caused by the intraerythrocytic protozoan parasites *Babesia bovis* and *B. bigemina*. This infection causes economic losses in tropical and subtropical areas where the tick is present. In Argentina, the livestock area affected includes the northeast and northwest of the parallel 33° S, where the natural vector *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* finds the ecological conditions for its development.

To prevent babesiosis outbreaks in endemic areas, 4-9-month-old calves are vaccinated with live attenuated strains of both parasites. Even though these vaccines are effective in a single dose, conferring protection throughout the life of the bovine, they have some disadvantages in their production, half-life and distribution logistics. Hence, the development of alternative vaccines to overcome these difficulties is of great interest to improve sanitary conditions in order to increase the competitiveness of the livestock production.

In this present work, three vaccine candidates have been developed. These immunogens are based on the immunodominant regions of three highly conserved *B. bovis* antigens that are also immunodominant for cattle: MSA-2c (Merozoite Surface protein - 2c), RAP-1 (Rhoptry Associated Protein - 1) and HSP20 (Heat Shock Protein 20). These three antigens were obtained on two different expression platforms: as non-replicative viral vectors and as recombinant proteins.

The first candidate is a recombinant modified vaccinia Ankara vector (rMVA), a non-replicative poxvirus which encodes an open reading frame of a multi-antigen (rMABbo) . This multi-antigen includes B and T cells epitopes of the three antigens mentioned above. In addition, a recombinant adenovirus (rAd) expressing the same rMABbo was developed. Besides, the complete rMABbo and each of the three antigens were expressed separately in *E.coli* and purified by affinity chromatography for delivery as subunit vaccines.

The humoral and cellular immune responses induced by the three vaccine candidate were evaluated in both homologous and heterologous prime – boost immunizations. The results show that heterologous immunization combining the rAd or the rMABbo as a prime, with rMVA as a boost elicit the most effective immune response in terms of high specific IgG antibody titters with a major IgG2a subclass proportion (indicating a Th1 immune response), a significant level of secreted IFN γ and high percentages of both CD4+ and CD8+ T cells producing both IFN γ and TNF α cytokines.

The present work contributes to the development of a new generation vaccine candidates based on a rational design and antigen expression platforms to optimize the protective immune response to *Babesia bovis*. The characterization of the immune response in the murine model is also an accessible approach to optimize the best vaccination strategy to be evaluated in cattle which is the only biological model against *Babesia bovis* infection.

Keywords: *Babesia bovis* - modified vaccinia Ankara virus - Adenovirus – multi-antigen - prime – boost schemes.

Agradecimientos

Si yo le preguntara a Ud., estimado lector, cual es el recuerdo más remoto que retenga su memoria, tal vez cueste identificarlo pero luego de un momento aparece, casi intacto, como si ese recuerdo hubiera ocurrido recién. Haga el intento. Vio?

Yo retengo dos: y eso es un problema porque en verdad no se cual ocurrió primero. Pero vamos con este: era invierno, estaba en el patio y creo que no estaba solo, mi hermana también estaba conmigo. Yo miraba mi bicicleta, como buscando algún error, como si ya algo allí atrás me molestara. Entonces, entré a la cocina y mire a papa que estaba con mamá y le dije: “Papá, quiero que me saques las rueditas”.

Doctorarse implica necesariamente, el fin de una etapa. Y seguir haciendo ciencia es de ahora en más, andar en bicicleta sin rueditas.

Pero mis padres no me soltaron del asiento de la bicicleta, en aquel tiempo incipiente de andanzas. No sé porque – aunque suena lógico – los padres están, de una manera muy natural, atrás de uno.

Entonces, llegar hasta acá no resulta un logro personal. Fui un afortunado. Anduve con rueditas por la vereda y hubo de esos vecinos que cuidaron, a lo largo de esta gran vereda de 5 años, que yo no me torciera, no chocara o incluso, no quedara pedaleando en falso.

Eso: pedaleo en falso. Pasas de una vereda a otra y cambia el relieve. Y puedes pedaleo en falso. Pero no, fui un afortunado. A mí no me pasó. Hubo veredas de distintos relieves, pero visto ahora, que empiezo a andar sin rueditas, fui un afortunado.

Recorro mentalmente los pasillos del Instituto y allí están, esos vecinos que se encargaron de que haya sido un afortunado.

Luego vuelvo, entro a Hemoparásitos y está lleno de chicos andando en bicicleta, algunos tenemos rueditas, otra ya no. Y aquí me detengo: nos vamos empujando entre nosotros para no quedar pedaleando en falso. Y como somos chicos, podemos empujarnos con cierta limitación. Pero, otra vez: fuimos afortunados. Tuvimos una persona, una señora (los chicos los saben), que nos empuja para no pedaleo en falso. Y a mí, me tocó aún más fortuna.

Con Silvina pude andar en bicicleta - libre - por esta vereda del doctorado. Esta Tesis, insisto, no es un mérito personal: se trata de un resultado colectivo. Mis padres detrás, Silvina al lado, los vecinos más adelante, mis compañeros a la par. Ahora me conozco toda la cuadra.

Fui un afortunado. ¿Cómo voy a hacer para devolver todo esto?

“Lucha es la vida del hombre sobre esta Tierra”

Job, 7:1

Abreviaturas y nomenclaturas propias de esta Tesis.

CICUAE – CICVyA: Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Experimentación – Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas.

EEA – INTA: Estación Experimental Agropecuaria – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

HSP20: del inglés, *Heat Shock Protein* – 20.

MABbo: se refiere a la secuencia codificante del Multiantígeno de *Babesia bovis*.

rAd: adenovirus que expresa el Multiantígeno de *Babesia bovis*.

RAP – 1: del inglés, *Rhoptry Associated Protein* – 1.

rMABbo: se refiere a la poliproteína recombinante del Multiantígeno de *Babesia bovis*.

rMVA: virus MVA que expresa el Multiantígeno de *Babesia bovis*.

SBP: del inglés, *Spherical Body Protein*.

VESA: del inglés, *Variable Erythrocyte Surface Antigen*.

VMSA: del inglés, *Variable Merozoite Surface Antigen*.

wtMVA: cepa *wild type* del virus MVA.

1	Introducción.....	- 5 -
1.1	La Babesiosis.....	- 5 -
1.2	La babesiosis bovina: Distribución geográfica e importancia económica.....	- 7 -
1.3	Los agentes etiológicos Babesia bovis y B. bigemina.....	- 9 -
1.4	El ciclo de vida de Babesia bovis.....	- 10 -
1.5	Medidas de control en nuestro país.....	- 13 -
1.6	Importancia económica de la babesiosis bovina.....	- 16 -
1.7	Signos clínicos.....	- 17 -
1.8	Diagnóstico y tratamiento.....	- 19 -
1.9	Control inmune contra Babesia bovis.....	- 24 -
1.10	Respuesta inmune innata.....	- 24 -
1.11	Respuesta inmune adaptativa.....	- 26 -
1.12	Vacunación.....	- 29 -
1.13	Limitaciones de las vacunas vivas atenuadas.....	- 31 -
1.14	La búsqueda de candidatos vacunales contra B. bovis.....	- 33 -
1.15	Los vectores virales en el desarrollo de vacunas de nueva generación.....	- 41 -
1.16	Los poxvirus.....	- 41 -
1.17	Los poxvirus como vectores de expresión.....	- 42 -
1.18	El virus vaccinia Ankara modificado y su uso como vector de expresión.....	- 47 -
1.19	La respuesta inmune inducida por el virus MVA.....	- 50 -
1.20	Los adenovirus.....	- 53 -
1.21	Respuesta inmune inducida por los adenovirus.....	- 56 -
1.22	Sistema de expresión derivado de Adenovirus.....	- 57 -

1.23	El uso de vectores virales en vacunas de nueva generación.....	- 59 -
1.24	Estrategias de inmunización “prime – boost”	- 62 -
2	Hipótesis y objetivo general.....	- 67 -
2.1	Objetivos específicos.....	- 67 -
3	Materiales y métodos.	- 68 -
3.1	Cepas utilizadas y medios de cultivo bacterianos.....	- 68 -
3.2	Líneas celulares, cultivos primarios y medios de cultivo celular.....	- 68 -
3.3	Cultivos primarios de Fibroblastos de Embrión de Pollo, FEPs.....	- 69 -
3.4	Animales.....	- 71 -
3.5	Virus.....	- 71 -
3.6	Plásmidos y clonado de fragmentos génicos.	- 72 -
3.7	Oligonucleótidos iniciadores o cebadores.	- 75 -
3.8	Antisueros y anticuerpos.....	- 76 -
3.9	Técnicas de biología molecular para la obtención del ADN recombinante	- 77 -
3.9.1	Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (<i>PCR</i>)	- 77 -
3.9.2	Electroforesis en geles de agarosa.....	- 78 -
3.9.3	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	- 79 -
3.9.4	Reacciones de ligado molecular	- 79 -
3.9.5	Transformación de bacterias <i>E. coli</i>	- 80 -
3.9.6	Minipreparaciones de ADN	- 80 -
3.9.7	Secuenciación de ADN.....	- 82 -
3.9.8	Obtención de las proteínas recombinantes.	- 82 -
3.9.9	Expresión y purificación de las proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	- 83 -
3.9.10	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, SDS – PAGE.....	- 85 -
3.9.11	Tinción de proteínas en SDS- PAGE con colorante <i>Coomassie blue</i>	- 85 -
3.9.12	Electrotransferencia de las membranas de nitrocelulosa.....	- 86 -
3.9.13	Detección inmunológica de las proteínas por <i>WB</i>	- 86 -

3.10	Técnicas para la obtención de los virus recombinantes	- 88 -
3.10.1	Obtención del virus recombinante MVA (rMVA) que expresa el multiantígeno MABbo de <i>Babesia bovis</i>	- 88 -
3.10.2	Obtención del adenovirus recombinante (rAd) que expresa el multiantígeno MABbo de <i>Babesia bovis</i>	- 92 -
3.10.3	Técnicas para la caracterización molecular de los virus.	- 99 -
3.10.4	Análisis de los virus recombinantes por WB e inmunofluorescencia.	- 101 -
3.11	Protocolos de inmunización en ratones.....	- 102 -
3.12	Técnicas para la determinación de la respuesta inmune inducida por los inmunógenos... -	105 -
3.12.1	Cultivo <i>in vitro</i> de esplenocitos de ratón.	- 105 -
3.12.2	Cuantificación de IFN γ en sobrenadantes de esplenocitos.....	- 106 -
3.12.3	Marcación intracitoplasmática y citometría de flujo	- 107 -
3.12.4	Titulación de anticuerpos específicos IgG por ELISA indirecto.	- 108 -
3.12.5	Determinación de las subclases IgG1 e IgG2a.....	- 109 -
3.12.6	ELISA indirecto con sueros de bovinos infectados con <i>B. bovis</i>	- 110 -
3.13	Alineamiento múltiple.....	- 112 -
3.14	Análisis de las secuencias.....	- 112 -
3.15	Análisis estadístico.	- 112 -
4	Resultados.	- 114 -
4.1	Obtención y caracterización del virus MVA que expresa el multiantígeno MABbo de <i>B. bovis</i> . -	114 -
4.2	Obtención y caracterización del Adenovirus que expresa el multiantígeno MABbo de <i>B. bovis</i> . -	119 -
4.3	Obtención y purificación de la proteínas recombinantes, rMSA-2c, rRAP-1, rHSP20 y rMABbo.	- 124 -
4.4	Evaluación de la respuesta inmune de los distintos candidatos vacunales.....	- 126 -
4.4.1	Evaluación de la capacidad inmunogénica del rMVA solo o combinado con proteínas recombinantes.	- 126 -

4.4.2	Esquemas de inmunización “ <i>prime – boost</i> ” heterólogos de los vectores virales y el rMABbo. - 134 -
4.5	Evaluación del rMABbo como antígeno de diagnóstico. - 143 -
5	Discusión. - 150 -
6	Conclusiones..... - 179 -
7	Referencias..... - 181 -

1 Introducción.

1.1 La Babesiosis.

La Babesiosis, también conocida como babesiasis, piroplasmosis o fiebre hematórica, es una enfermedad causada por los parásitos protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia*. El nombre del parásito se estableció en honor al biólogo rumano Víctor Babeş (Viena 1854 – Bucarest 1926) quién en 1885 identificó al protozoario del ácaro *Ixodes scapularis*. En general todas las especies de *Babesia* son específicas para su hospedador habitual y existen numerosas especies descritas capaces de infectar un amplio rango de hospedadores como los bovinos, equinos, ovinos, caprinos, caninos, felinos e incluso el humano (**Bock et al., 2004**). Todas las babesias que se han estudiado hasta la actualidad son transmitidas por garrapatas de la familia *Ixodidae* (**Kuttler, 1988**).

El género *Babesia* pertenece al phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoa*, orden *Eucoccidiorida*, suborden *Piroplasmorina* y familia *Babesiidae*. Este phylum agrupa a los organismos que contienen el denominado Complejo Apical, una estructura que se encuentra en la región anterior del protozoario y está compuesta por varias organelas. Éstas, en su conjunto, participan activamente del proceso de invasión del eritrocito. En el género *Babesia*, el Complejo Apical se encuentra formado por las roptrias, micronemas y cuerpos esféricos (**Figura 1.1**) los cuales contienen una serie de proteínas involucradas en el proceso de invasión.

En *B. bovis*, se han identificado en el estadio merozoíto al menos cinco glicoproteínas que conforman la familia de antígenos variables de la superficie, *VSMA*: MSA-1, MSA-2a1, MSA-2a2, MSA-2b, MSA-2c.

Además, se conoce que las roptrias secretan una proteína mayoritaria involucrada también al proceso de invasión, conocida como RAP-1. Algunas proteínas de la familia *VSMA* y RAP-1 han sido caracterizadas a nivel molecular e inmunológico y evaluada su inmunogenicidad tanto en el modelo murino como en bovinos (**Florin-christensen *et al.*, 2014**).

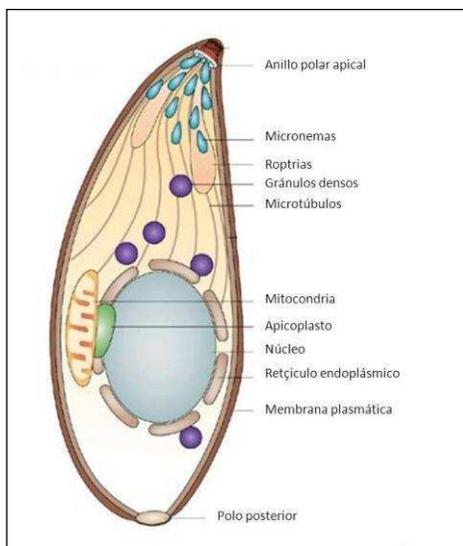


Figura 1.1 Esquema de la estructura de un parásito del phylum *Apicomplexa* en el que se muestran las organelas. Los gránulos densos son llamados cuerpos esféricos en *Babesia* (<http://parasitologiajmv-hilda.blogspot.com.ar>).

1.2 La babesiosis bovina: Distribución geográfica e importancia económica.

Como se mencionó anteriormente, la principal forma de transmisión de los parásitos del género *Babesia* es a través de garrapatas, de manera que la transmisión prenatal o iatrogénica (vacunaciones, descornes u operaciones con material contaminado con sangre de animales enfermos) es epidemiológicamente insignificante (Kuttler, 1988). De esta manera, la distribución geográfica de la babesiosis se encuentra determinada por la presencia de las garrapatas vectores, las cuales son prevalentes en las zonas tropicales y subtropicales del planeta que brindan el marco climático óptimo para su desarrollo (Figura 1.2 A).

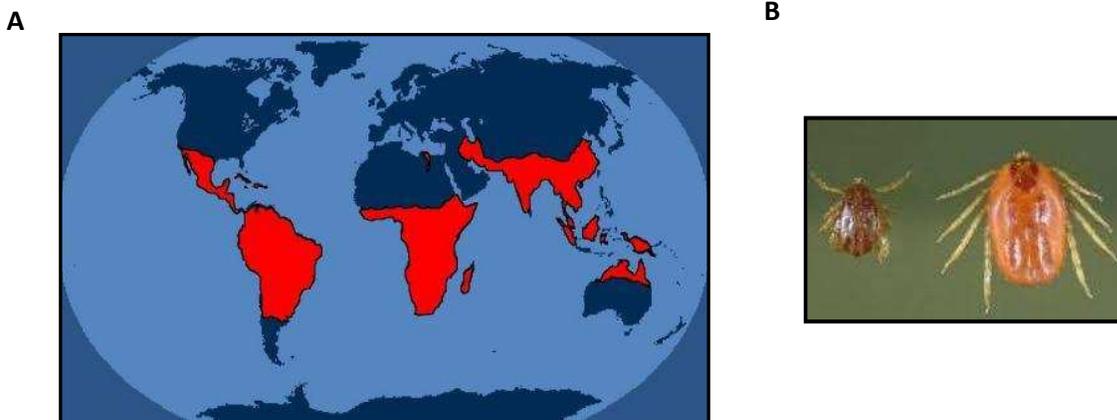


Figura 1.2. Garrapata vector de la babesiosis bovina y su distribución a nivel mundial. A. Distribución de la garrapata vector que comprende las regiones rojas enmarcadas entre los paralelos de latitud 32° Norte y 33° Sur. **B.** *Rhipicepalus (Boophilus) microplus*. Nótese en la foto el dimorfismo sexual de la especie entre el macho (izquierda) y la hembra de mayor tamaño (derecha).

En el caso de *B. bovis* y *B. bigemina*, según cifras estimativas, unos 400 millones de cabezas de ganado habitan en las zonas de distribución de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Figura 1.2B; Echaide, 2008).

Entre algunas de las generalidades del vector transmisor, encontramos que *R. microplus* es una garrapata de un solo hospedador, de manera que una vez que las larvas infestan al bovino, las mismas y luego como ninfas y hembras adultas permanecen parasitando al mismo animal. Las larvas pueden sobrevivir en el ambiente más de 6 meses sin alimentarse y además son capaces de soportar intensos veranos. El término de su desarrollo está dado en unos 40 – 45 días. Se localizan en toda la piel del animal, pero preferentemente en las entrepiernas y el pescuezo.

Su ciclo de vida podemos dividirlo en dos: uno de vida libre (independiente del hospedador) el cual incluye a los estadios de huevo, neo-larva, y teleogina recién desprendida. El otro, parasitario, ligado al bovino, va desde la larva hasta la teleogina. También es importante destacar que otras especies de garrapatas como *R. annulatus*, *R. decoloratus*, *R. geigy*, y *R. evertsi* también son vectores competentes que pueden transmitir *B. bovis* y *B. bigemina*, y habitan regiones diferentes a *R. microplus*, lo cual hace que esta problemática sea aún mayor (Lorusso *et al.*, 2013; Schnittger *et al.*, 2012).

1.3 Los agentes etiológicos *Babesia bovis* y *B. bigemina*.

En la babesiosis bovina, los agentes etiológicos más importantes son *Babesia divergens*, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, siendo estas últimas dos especies las únicas que se encuentran presentes en nuestro país. También existen otras especies del género *Babesia* que pueden infectar al ganado bovino. Entre ellas se incluyen *B. major*, *B. ovata*, *B. occultans* y *B. jakimovi*.

Dado que los parásitos son estrictamente intraeritrocíticos, es posible hallarlos dentro del huésped al inspeccionar un extendido de sangre de un bovino infectado utilizando la coloración de Giemsa. En dichos preparados, se observan distintos estadios del parásito: las formas simples ovaladas (), la forma de anillo (trofozoíto), y las formas pares (luego de la división celular) (**Figura 1.3**).

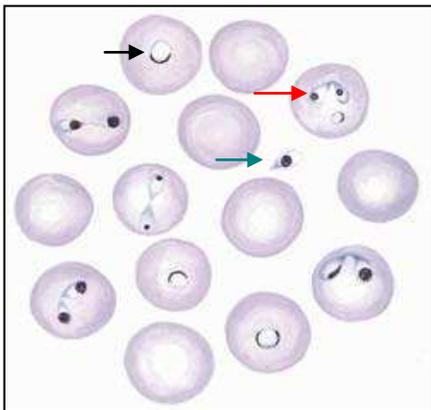


Figura 1.3. Representación esquemática de los distintos estadios de *Babesia sp* en el huésped bovino. Se observan merozoítos libres (flecha verde), trofozoítos (flecha negra) y formas pares (flecha roja). Imagen tomada de la página: *Genome Annotation Research and Development. The Broad Institute. Cambridge Center.* <http://www.broadinstitute.org/>

En el caso de *B. bovis*, estos cuerpos ovalados miden alrededor de 2 x 1,5 μm , mientras que los de *B. bigemina* miden 4,5 x 2 μm . Es por esto que *B. bigemina* se incluye dentro del grupo de las babesias “grandes” y a *B. bovis* dentro del grupo de las babesias “pequeñas”.

1.4 El ciclo de vida de *Babesia bovis*.

El desarrollo del ciclo de vida se muestra en la **Figura 1.4**. *B. bovis* atraviesa al menos tres etapas reproductivas: gamogonia (formación y fusión de gametos en el interior del intestino de la garrapata), esporogonia (reproducción asexual de los esporozoítos en las glándulas salivales) y merogonia (reproducción asexual en el bovino) (**Homer *et al.*, 2000**).

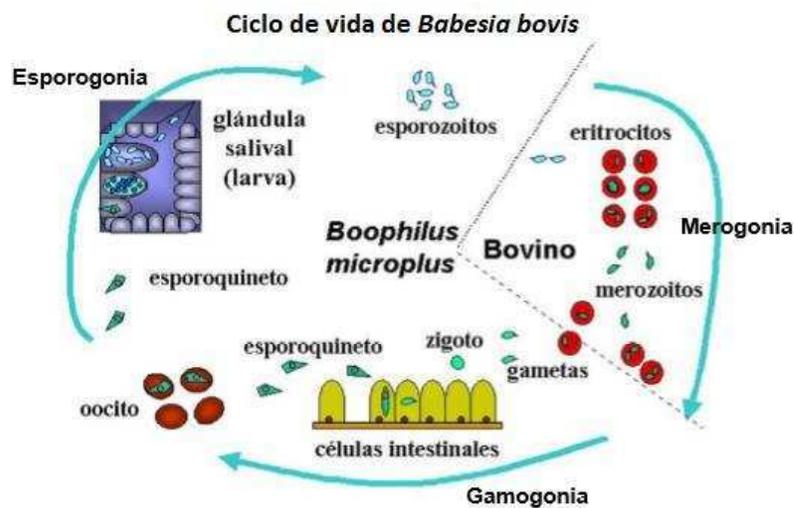


Figura 1.4. Ciclo de vida de *B. bovis*.

En el vector: En ese pasaje hacia el intestino medio del vector, se estimula el desarrollo de dos poblaciones de cuerpos radiados (*strahlenkörper*) a partir de los gamontes (gametocitos). Estos últimos sufren sucesivas multiplicaciones dentro del eritrocito bovino (que ya está en el intestino de la garrapata).

Los gamontes emergen de los glóbulos rojos, pero aun fuera de él continúan multiplicándose. En consecuencia se forman agregados de cuerpos radiados multinucleados.

Una vez completada la división celular, se forman cuerpos radiados de un solo núcleo haploide, los cuales se asumen como gametas que emergen de los agregados y se fusionan de a pares (singamia) para formar una célula esférica (cigoto). Los cigotos infectan selectivamente a las células digestivas del intestino de la garrapata y probablemente allí se multiplican nuevamente para formar los kinetos (vermículos) que migran hacia la hemolinfa de la garrapata. En el caso del ciclo de vida de *B. bigemina* ocurre una división por meiosis que da lugar a la formación de un cigoto haploide, luego por fisión múltiple se forman kinetos poliploides que pasan a la hemolinfa infectando una gran variedad de tipos celulares. Entre los tejidos infectados se encuentran los oocitos en los que ocurren varios ciclos de fisión múltiple. De esta manera se produce la transmisión transovarial de las *Babesias* a la descendencia de la garrapata (**Bock et al., 2004**).

Es importante aclarar que sólo en el estadio larval de la garrapata puede transmitirse *Babesia bovis*, en estadio de ninfa ya pierde esta capacidad, a pesar de mantener la infección. En el caso de *B. bigemina*, el desarrollo se produce en la larva que se está alimentando, pero los esporozoítos se convierten en infectivos a los 9 días, por lo que esto solo ocurre en el estadio ninfal y adulto de la garrapata (**Hoyte, 1961**).

Asimismo, la transmisión puede ocurrir a través de ninfas, hembras y machos adultos. En el caso de *B. bovis*, la formación de esporozoítos infectivos ocurre usualmente entre los 2 y 3 días de la adhesión de la larva al bovino (**Riek, 1966**).

En el bovino: En el momento que la larva de la garrapata infectada se alimenta de la sangre del bovino, los esporozoítos de *B. bovis* presentes en las glándulas salivales pasan al torrente sanguíneo junto con la saliva. Estos podrán invadir únicamente eritrocitos. La entrada se produce por endocitosis en varias etapas. Primero el parásito se une por su región ecuatorial y luego sufre una reorientación, para acomodar su región apical, adyacente a la membrana del eritrocito. Se libera el contenido de las roptrias y se produce una invaginación de la membrana del eritrocito envolviendo al parásito y formando por último una vacuola parasitófora alrededor del mismo. Luego, esta vacuola se desintegra, quedando en contacto la membrana de *B. bovis* con el citoplasma del eritrocito como puede observarse en la **Figura 1.5**.

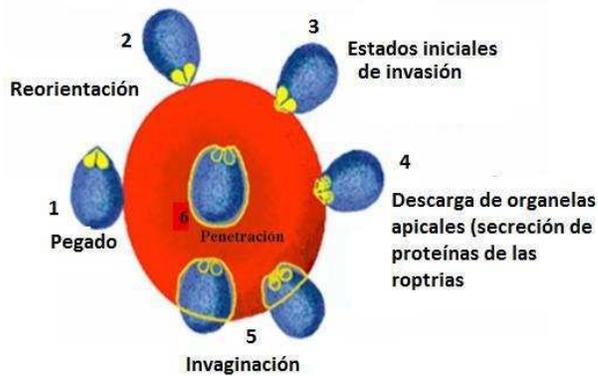


Figura 1.5. Proceso de invasión de los de *B. bovis* al eritrocito Los pasos principales consisten en: 1) pegado o contacto del merozoíto al eritrocito, 2) reorientación del merozoíto, 3) fusión de las membranas del merozoíto y eritrocito, 4) liberación del contenido de las organelas apicales, 5) invaginación del merozoíto y 6) en el centro: entrada o penetración.

Babesia es el único miembro de los *Apicomplexa* que no posee vacuola parasitófora dentro del eritrocito. El parásito, entonces, comienza a dividirse por fisión binaria, formando dos células hijas, llamadas trofozoítos. Los trofozoítos maduran, formando nuevamente roptrias y micronemas en su interior, dando lugar a un merozoíto.

El merozoíto haciendo una fisura sobre la membrana, lisa el eritrocito y vuelve al torrente sanguíneo para invadir nuevos eritrocitos (Friedhoff, 1988; Igarashi, 1988).

1.5 Medidas de control en nuestro país.

Babesia bovis y *B. bigemina* junto con la *Rickettsia Anaplasma marginale*, causan un conjunto enfermedades conocidas popularmente como el Complejo Tristeza Bovina (CTB). Este complejo es considerado como uno de los problemas sanitarios de mayor importancia en la ganadería de la región del Noreste (NE) y Noroeste (NO) argentino, regiones situadas al norte del paralelo 33° Sur con una extensión aproximada de 60 millones de hectáreas (Figura 1.6).

Los últimos datos disponibles indican que la población bovina expuesta a esta enfermedad supera los 12 millones de cabeza de ganado, lo cual representa el 22% de la población bovina total de nuestro país (**Späth et al., 1994**).

En efecto, el CTB bovina representa una seria amenaza con graves consecuencias económicas y sanitarias en la producción ganadera y lechera de todo el norte argentino. Es por ello que las medidas de control están principalmente orientadas a la lucha hacia el vector transmisor.

La primera medida de la que se tiene registro oficial es la la Ley N° 12.556 promulgada en Buenos Aires, el 7 de octubre de 1938. En su artículo primero se establece:

ARTICULO 1º. - Declárase obligatoria en todo el país, la lucha sistemática y ofensiva contra las diferentes especies de garrapata del ganado y de los animales domésticos, en la forma, zonas y tiempo que determine el Poder Ejecutivo.

Esta medida indirecta de control de la babesiosis implica atacar la garrapata vector mediante el uso de acaricidas en baños fijos o portátiles cada 21 días corridos desde el baño anterior. Aunque esta medida resulta efectiva, con el uso de estos compuestos según pasan los años, se han ido seleccionando las poblaciones de garrapatas que desarrollaron resistencia por estar expuestas a estos químicos que se comercializan, productos principalmente derivados de la amidina como el Amitraz o piretroides como el caso de la Cipermetrina y la Flumetrina (**Cutullé et al., 2013; Lovis et al., 2013**).

Por una serie de cambios y/o modificaciones a esta Ley, la entonces Secretaria de Ganadería, Agricultura y Pesca de la Nación mediante la Resolución 27/99 decide aprobar el Plan Nacional de Lucha contra la Garrapata en todo el territorio Nacional, facultando al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) la ejecución del mismo plan.

Se diseña una división de zonas (**Figura 1.6**) conforme al estado ambiental y climatológico de cada una de ellas, estableciéndose una:

Zona indemne: áreas ecológicamente libre de la presencia de parásitos y de la garrapata vector en donde se haya ejecutado y comprobado su erradicación en todos los establecimientos y/o exista un porcentaje menor al 1% de establecimientos infestados.

Zona de lucha o erradicación: áreas ecológicamente aptas para la evolución del ciclo biológico de *B. microplus*, donde los establecimientos se encuentran bajo vigilancia local y zonal en proceso de limpieza obligatoria en preparación y/o erradicación, auditados por el Estado Nacional.

Zona de control: áreas de control en promoción, donde sin existir la obligatoriedad de la erradicación se adopten medidas sanitarias tendientes a garantizar un nivel mínimo de saneamiento. Se reconocerá con certificación oficial la existencia de establecimientos "Limpio Patentado", auditados por el Estado Nacional.

Además, el Plan de Lucha establece la metodología para la erradicación de los focos garrapatosos, el uso de garrapaticidas con determinados principios activos y las pautas para la detección de cepas quimiorresistentes y medidas de divulgación, asesoramiento y capacitación de los productores y médicos veterinarios acordes al alcance del plan. Esta metodología de lucha se enmarca en el contexto del manejo integrado de la garrapata, promoviendo el óptimo uso de los productos químicos seleccionados por SENASA para el control, minimizando los costos productivos directos e indirectos.



Figura 1.6. Distribución geográfica de *R. microplus* en nuestro país. En tono azul se marca la zona de control del vector con una superficie de 74.196.800 HAS. En tono celeste se marca la zona de erradicación con 4.828.976 HAS y en tono gris se marca la zona libre de garrapata (indemne) de 29.140.200 HAS, según datos del Boletín Oficial de SENASA, año 1999. La línea punteada marca el paralelo 33° Sur.

1.6 Importancia económica de la babesiosis bovina.

Las pérdidas económicas directas (pérdida de peso o mortalidad de los animales) e indirectas (costos de diagnóstico, tratamientos, honorarios profesionales y vacunación) asociadas a la babesiosis bovina en Argentina superan los 200 millones de dólares anuales por lo que es considerada una enfermedad de importancia relevante para la industria ganadera y lechera del país (Lonzina *et al.*, 2014).

En el Noreste, la provincia de Corrientes se caracteriza además por una producción creciente del búfalo de agua *Bubalus bubalis*, un tipo de ganado bovino alternativo al convencional *Bos taurus* y *Bos indicus*, que empezó a explotarse en nuestro país a finales del siglo XX. Si bien hay escasos datos sobre el estado sanitario de los búfalos de agua, algunas observaciones muestran que pueden ser parasitados por *R. microplus* (**Benitez et al., 2007**).

Además, en un muestreo realizado en dicha provincia por investigadores del Instituto de Patobiología del INTA – Castelar, se pudo evidenciar que de un total de 103 búfalos de agua, 35 de ellos resultaron positivos para la detección específica de *B. bovis* por *nested PCR*, demostrando que estos animales también pueden ser infectados por este parásito (**Ferreri et al., 2008**). Las evidencias indican que la infección en estos animales sería menos virulenta que en los bovinos del género *Bos* por lo que la importancia de la infección en los búfalos radicaría en la posibilidad de que los vectores infectados pasen de una a otra especie.

1.7 Signos clínicos.

El cuadro clínico de un animal infectado con *Babesia sp.* varía según la edad del animal, su estado nutricional e inmunológico y la patogenicidad de la cepa del parásito. Los bovinos menores a 9 meses generalmente no presentan síntomas, por lo que la mayoría de los casos clínicos de babesiosis se observan en animales adultos.

La babesiosis bovina se asocia con un estado de anemia aguda caracterizada por un cuadro febril que coincide con niveles detectables de parásitos en sangre. La lisis eritrocítica extensiva lleva a la anemia y hemoglobinuria mientras que también se produce ictericia, hipoxia y en algunos casos anoxia tisular debido a la adhesión de los eritrocitos infectados al endotelio de los capilares. La infección también puede inducir el aborto natural.

Cuando el cuadro febril persiste, la parasitemia aumenta y los bovinos infectados pueden superar los 41°C de temperatura corporal. Dado el decaimiento generalizado de los animales infectados, producto de la marcada anemia hemolítica y el apartamiento de los mismos del rodeo, es por esto que se la conoce comúnmente como la “tristeza bovina”, mencionada anteriormente.

Babesia bovis es más virulenta que *B. bigemina*, pudiéndose presentar signos más severos de *shock* nervioso y respiratorio como consecuencia del secuestro de glóbulos rojos infectados que presentan cambios morfológicos en su membrana plasmática y quedan retenidos en los capilares pulmonares y cerebrales (**Uilenberg, 1995; Brown and Palmer, 1999**). Los casos en los que se presenta la sintomatología nerviosa terminan con la muerte del animal.

1.8 Diagnóstico y tratamiento.

Ante la presencia de un posible brote en bovinos con los signos clínicos mencionados anteriormente se debe realizar en primer lugar el diagnóstico para luego tomar la decisión sobre el tipo de tratamiento a seguir. Entonces, el establecimiento que sospecha de la existencia de babesiosis remite al laboratorio un extendido de sangre tomada de la punta de la cola o la oreja y una muestra de sangre con anticoagulante.

El frotis fino o grueso con tinción de Giemsa es el método tradicional de diagnóstico directo y permite la detección de parásitos en infecciones agudas.

El frotis fino permite la diferenciación de especies y el frotis grueso se caracteriza por poseer mayor sensibilidad pudiéndose detectar un parásito cada $10^5 - 10^6$ eritrocitos **(Mosqueda & Cantó, 2012)**.

Si bien este método es práctico, económico y fácil de implementar en un laboratorio medianamente equipado, es considerado por algunos autores como tardío, extenuante y dependiente de considerable experiencia por parte del técnico microscopista.

En etapas crónicas, los niveles de parásitos decrecen y es necesario utilizar técnicas más sensibles para la detección de infecciones. En este sentido, las pruebas de *PCR* resultan particularmente útiles para esta etapa, pudiéndose detectar hasta 1 parásito/ 10^9 eritrocitos **(Mosqueda & Cantó, 2012)**.

Aunque la técnica de *PCR* resulta ser más sensible que un extendido, existen problemas asociados a la complejidad del equipamiento del laboratorio, el entrenamiento del personal y los riesgos de contaminación con amplicones de amplificaciones previas. Esto, sumado a un elevado costo del equipamiento y los reactivos, limitan el amplio uso de esta técnica y restringen su uso a estudios epidemiológicos.

Respecto de las pruebas serológicas, una de las más usadas actualmente a nivel mundial es la Inmunofluorescencia indirecta o IFI. Si bien es una técnica sensible, resulta difícil de implementar ya que requiere contar con cultivos parasitarios para obtener las improntas, permite procesar solo 100 a 150 muestras por día y carece de objetividad por parte del operador (**Mosqueda & Cantó, 2012**).

Se han desarrollado varias pruebas de enzimoimmunoensayo (ELISAs) para la detección de anticuerpos específicos circulantes que el bovino produce contra los antígenos de *B. bovis* y *B. bigemina*. Algunos de estos ELISAs utilizan un antígeno crudo derivado de un lisado de purificados que si bien presentan una especificidad variable (**Barry et al., 1982; Waltisbuhl et al., 1987**) ya han podido ser validadas internacionalmente para el diagnóstico de infección por *B. bovis*. En la EEA INTA – Rafaela han desarrollado dos técnicas de ELISA indirecto para uso como diagnóstico de rutina para *B. bovis* y *B. bigemina*. Ambas pruebas están basadas en un lisado de como antígeno de pegado a la placa.

Si bien poseen una alta especificidad y sensibilidad con valores del 97% y 98% respectivamente, la forma de obtener los parásitos es relativamente cara y además muy laboriosa porque requiere del mantenimiento *in vitro* de eritrocitos bovinos, los cuales son luego infectados para amplificar al parásito (**Florin-christensen et al., 2014**). En virtud de superar esta dificultad, es que se han buscado alternativas a este método. Para ello, se han desarrollado hasta el momento, varios ELISAs utilizando antígenos recombinantes para ambas especies de *Babesia*.

Uno de los antígenos más estudiado en *B. bovis* es la proteína RAP - 1, la proteína mayoritaria de las roptrias presentes en los parásitos Apicomplejos. Algunas evidencias sugieren que RAP - 1 tiene un rol fundamental en la invasión de al eritrocito (**Perkin, 1992; Sam - Yellowe, 1996**).

Además, presenta epitopes B y T conservados entre especies geográficamente distantes lo que hace de RAP -1 un interesante candidato vacunal. (**Brown and Palmer, 1999**).

Esta proteína ha sido utilizada como antígeno sustrato para un ELISA indirecto. En un trabajo realizado por Boonchit y colaboradores (2002), al utilizar la versión completa de la proteína RAP-1 de *B. bovis*, los autores muestran que sueros de animales infectados con *B. bovis* son capaces de reaccionar en el ELISA indirecto pero además observan que hay cierta reacción cruzada con sueros de animales infectados con *B. bigemina*. (**Boonchit et al., 2002**). Ya en 1991, Suarez y colaboradores habían reportado que RAP-1 posee – en los primeros 300 aminoácidos - una identidad de secuencia altamente conservada entre diferentes apicomplejos incluidos *B. bovis* y *B. bigemina* (**Suarez et al., 1991**).

Más tarde, este autor publica un artículo en el que muestra que sueros de animales infectados con *B. bigemina* reaccionaron positivamente contra la porción de aminoácidos 1 – 235 de RAP-1 de *B. bovis* mientras que la porción de aminoácidos comprendida entre el 235 – 565 no mostraba reacción cruzada (**Suarez et al., 1993**). En resumen, el ELISA presentado por Boonchit y colaboradores como un insumo útil para reconocer animales infectados con *B. bovis* posee la desventaja de la reacción cruzada.

Otra proteína recombinante que ha sido utilizada como antígeno de pegado a la placa de ELISA es el antígeno MSA-2c (**Bono et al., 2008**). En este otro trabajo, se observó que este ELISA resultaba ser útil y altamente sensible en detectar anticuerpos solamente entre los días 42 y 98 luego de la primo-inmunización con *B. bovis* y altamente específico en el análisis de sueros provenientes de áreas no endémicas. Sin embargo, luego de la re - inmunización el ensayo mostró menor especificidad evidenciando una reacción cruzada con sueros de bovinos inoculados con *B. bigemina*.

Dado que la re-vacunación con cepas vivas de *Babesia* es una práctica común en establecimientos ganaderos antes de introducir a bovinos en áreas endémicas a la garrapata *R. microplus*, los autores de este trabajo concluyen que esta herramienta resulta útil para detectar anticuerpos solamente en la primo vacunación.

También utilizando la versión recombinante de MSA-2c se ha desarrollado un ELISA competitivo - ELISAc - con el objetivo de aumentar la especificidad y sensibilidad de este antígeno.

Para eso, se desarrolló un anticuerpo monoclonal contra MSA-2c. En este ELISAc se obtuvieron muy buenos valores de sensibilidad y especificidad (96.2 % y 98% respectivamente) y un índice de concordancia k de 0.833 contra la técnica de inmunofluorescencia que también es usada como técnica diagnóstica. Si bien estas técnicas presentan algunas limitaciones aquí mencionadas, su desarrollo y optimización presentan un avance para el diagnóstico de la babesiosis en nuestro país (**Dominguez et al., 2012**). No obstante, es notorio que hasta la fecha, no exista aún un ELISA comercial que abarate los costos de producción del antígeno pero a que al mismo tiempo permita realizar el diagnóstico en diferentes centros veterinarios dado que el Laboratorio de Parasitología de la EEA – INTA Rafaela es por el momento el único laboratorio que ofrece el servicio a todos los productores ganaderos del norte argentino.

Por otro lado, el tratamiento de los animales enfermos se realiza cuando surgen brotes de la enfermedad. En el mercado sólo se encuentran dos drogas: a) Diminazene (comercialmente Ganaseg, Atrisan y Beronal), que actúa sobre *B. bovis* y *B. bigemina* y tiene un amplio margen terapéutico, el cual se aplica a razón de 3,5 a 5 mg/kg de peso durante 1 a 3 días, según la evolución del animal, y b) Imidocarb (comercialmente Imizol), cuya dosis es de 1,2 mg/kg de peso en una sola dosis y ha demostrado ser muy efectivo como agente terapéutico y también se lo ha utilizado como profiláctico, ya que se va eliminando y metabolizando lentamente, previniendo durante 60 días la infección.

1.9 Control inmune contra *Babesia bovis*.

1.10 Respuesta inmune innata.

Diversos mecanismos de la respuesta inmune son activados en los bovinos infectados con especies de *Babesia*. Pero cabe destacar que los terneros de 6 a 9 meses de edad desarrollan una inmunidad innata mucho más fuerte que los bovinos adultos (**Goff et al., 2002**). Esta característica es debida en parte al traspaso de anticuerpos calostrales de la madre al ternero, aunque luego pudo observarse que terneros de madres no inmunizadas mostraban una resistencia natural a la infección con *B. Bovis* y también con *B. Bigemina*. (**Riek F., 1963**).

Parecería estar implicada además una respuesta celular involucrando factores solubles y el bazo sería la fuente de dichas células (**Levy et al., 1982**). Se ha demostrado que la respuesta de los terneros jóvenes a la infección por *B. bovis* involucra la producción temprana de IL-12 e IFN γ y la inducción de la enzima iNOS (**Goff et al., 2002**). En contraste, en animales adultos, la producción de IL-12 e IFN γ aparece más tarde en la infección y la iNOS no es inducida. Además, se ha visto que la IL-10 juega un rol preponderante en la inmunomodulación de la respuesta innata en animales adultos, en virtud de evitar una respuesta inflamatoria prolongada resultando perjudicial para el animal (**Goff et al., 2002**).

Cuando los se encuentran libres en el torrente sanguíneo, las inmunoglobulinas de tipo IgG juegan un rol fundamental en esta etapa temprana de la infección actuando como opsonizantes marcadores para la fagocitosis y bloqueando la entrada del parásito al eritrocito.

Pero una vez dentro del eritrocito, los niveles de parasitemia son controlados por las células del sistema inmune innato. La primera línea de defensa la constituyen las células *Natural Killer (NK)*, los monocitos activados y los macrófagos. Esta primer resistencia contra la babesiosis parece ser controlada por la producción de factores solubles, como el IFN γ de las células *NK* y el TNF α , el óxido nítrico e intermediarios reactivos del oxígeno de los macrófagos (**Shoda et al., 2000**). Se ha probado que estos dos compuestos son producidos durante infecciones agudas. Experimentos *in vitro* sugieren que el óxido nítrico reduce la viabilidad de *B. bovis* (**Schneider et al., 2011**). Es interesante destacar que el bazo juega un rol fundamental en la remoción de los parásitos porque en este órgano linfoide secundario se encuentra una importante actividad macrofagocítica (**Mahoney et al., 1972**). Además, en él se expresan y sintetizan citoquinas y otros mediadores inmunológicos claves en la respuesta inmune a *Babesia spp.* Se han observado mayores niveles de parasitemia por babesiosis primaria en bovinos susceptibles que fueron esplenectomizados comparados con aquellos que conservaron su bazo (**Bock et al., 2004**).

1.11 Respuesta inmune adaptativa.

Brown y colaboradores (**Brown et al., 2006**) postulan que los mecanismos de control de la infección por *B. bovis* requieren tanto de una respuesta inmune innata como adaptativa. Esta última incluye a células colaboradoras del perfil *Th1* CD4⁺ y plasmocitos productores de anticuerpos neutralizantes. La **Figura 2.1** muestra un esquema general de los mecanismos involucrados en el control de la respuesta inmune contra *B. bovis*.

Los anticuerpos actuarían como opsoninas incrementando la fagocitosis de los parásitos. Asimismo, los anticuerpos parecerían ser importantes efectores durante una segunda infección (**Mahoney, 1986**). Como consecuencia de la infección con *B. bovis*, se forman complejos inmunes con antígenos del parásito, inmunoglobulinas y la proteína C3 del sistema del complemento bovino. Las inmunoglobulinas principales de los complejos pertenecen al tipo IgM y a los isotipos IgG₁ e IgG₂, estos últimos en bajas concentraciones. Los isotipos IgG₁ e IgG₂ son capaces de fijar el complemento y el isotipo IgG₂ tiene además mayor capacidad opsonizante (**McGuire et al., 1979**).

Como se mencionó al comienzo, *B. bovis* es un protozooario estrictamente intraeritrocítico y como los glóbulos rojos carecen de antígenos de histocompatibilidad, la respuesta inmune celular dependerá exclusivamente de la presentación de antígenos del parásito a linfocitos CD4⁺ por parte de células que expresen el CMH II como son los macrófagos (**Brown & Palmer, 1999; Brown et al., 2006**).

Se han realizado experimentos *in vitro* con líneas celulares de linfocitos T aislados de sangre periférica de animales infectados para dilucidar el tipo de respuesta T *helper*, pudiéndose observar que estos clones eran capaces de proliferar frente a antígenos de *B. bovis*. La respuesta de citoquinas en presencia de estos re-estímulos, resultó ser de un perfil tipo *Th1* con la consecuente producción de INF γ , TNF α e IL-2 (**Brown et al., 1991**). Por otro lado, no han sido detectados clones del perfil *Th2* (**Brown et al., 1993**). Asimismo, se han aislado clones de células T *helper* de un bovino inmunizado con la proteína RAP-1, demostrando *in vitro* que estos clones producen un perfil de citoquinas *Th1* con abundante INF γ (**Rodriguez et al., 1996**).

En síntesis, en los animales persistentemente infectados que han controlado la parasitemia, o en animales inmunizados satisfactoriamente, las células *Th1* CD4⁺ antígeno específicas son centrales para la respuesta adaptativa a través de la producción de INF γ . Además de la activación de los macrófagos para un *clearance* eficiente del organismo, el INF γ potencia la producción de anticuerpos IgG2 con una fuerte actividad opsonizante y capacidad neutralizante los cuales junto con las IgG1, se vió que protegen pasivamente al ganado contra el desafío con cepas homólogas (**Mahoney, 1986**).

De esta forma, la infección aguda con *B. bovis* en animales *naive* esta mayoritariamente lograda por la activación de la respuesta inmune innata en el bazo, mientras que la protección contra la enfermedad clínica en animales persistentemente infectados o vacunados depende de la rápida activación de la memoria y las células *Th1* CD4⁺ efectoras que secretan INF γ y proveen colaboración para la producción de anticuerpos protectivos.

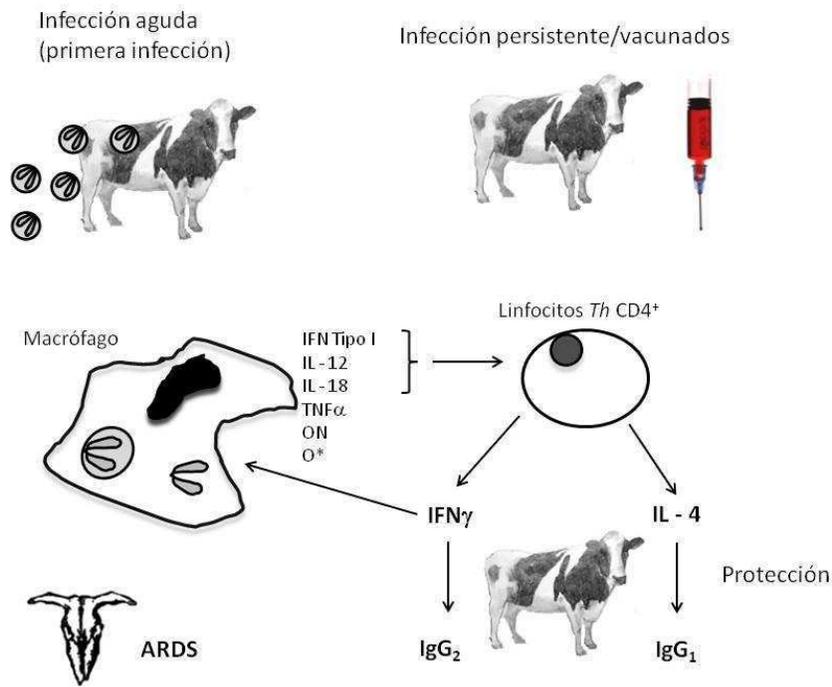


Figura 2.1. Mecanismos de respuesta inmune innata y adaptativa propuestos contra *B. bovis*. Durante la infección aguda, los macrófagos activados producen citoquinas proinflamatorias e intermediarios reactivos del oxígeno y el nitrógeno. Por otro lado, la sobreproducción de $TNF\alpha$ causaría una patología caracterizada por babesiosis cerebral y distrés respiratorio en bovinos adultos (ARDS). En animales inmunizados o que han resuelto la infección, la respuesta se caracteriza por la activación de un perfil Th1 $CD4^+$ con producción de $IFN\gamma$, IL- 12 y 18. El $IFN\gamma$ promueve la producción de anticuerpos opsonizantes como IgG_2 . Además, la polarización hacia el perfil Th2 produce IL - 4 que lleva a la generación de IgG_1 . Ambas respuestas, tanto humoral como celular, son necesarias para la protección contra *B. bovis*. Adaptado de **Brown et al., 1999**.

1.12 Vacunación.

Como se mencionó anteriormente, los terneros menores a 9 meses poseen una resistencia natural a la infección por *B. bovis*. Pero pasado este período, la resistencia natural decrece. Entonces, para prevenir la aparición de casos de babesiosis, se recurre a una infección natural controlada mediante la vacunación con cepas vivas atenuadas.

La atenuación de las cepas se obtiene por pasajes sucesivos en terneros esplenectomizados, ya que se ha comprobado que el pasaje rápido por terneros con estas características induce un proceso de atenuación en el parásito (**Callow, 1979**). Un estudio realizado en el año 1984 por Cowman y colaboradores sugirió que varios aislamientos de *B. bovis* estarían conformados por una mezcla heterogénea de subpoblaciones. En este mismo trabajo se identificó un patrón de expresión de proteínas diferencial entre las cepas atenuadas y las virulentas. En el año 1990 Carson y colaboradores, reportaron que el pasaje seriado de *B. bovis* por terneros esplenectomizados en el proceso tradicional de atenuación induciría un crecimiento rápido de determinadas subpoblaciones (**Carson et al., 1990**). La población de parásitos resultante, presentó un patrón génico similar al de las cepas atenuadas. La reversión de este patrón hacia un perfil similar al de las cepas virulentas ocurriría luego del pasaje por garrapatas como resultado de un proceso de selección de subpoblaciones (**Cowman et al., 1994**).

En nuestro país, las vacunas contra la babesiosis bovina se producen en las - EEA - del INTA de Mercedes (Corrientes) y de Rafaela (Santa Fe). Estas vacunas – aprobadas por el SENASA – resultan en un formulado de eritrocitos infectados con cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* (10^7 eritrocitos infectados) al que se le suma 10^7 eritrocitos infectados con *Anaplasma centrale* (subespecie que confiere inmunidad cruzada contra *Anaplasma marginale*) y solución salina balanceada en cantidad suficiente para 3 mL, administrándose 3 mL/animal en forma subcutánea o intramuscular. Este formulado – conocido como vacuna trivalente contra la Tristeza - contiene entonces la dosis necesaria para la protección contra la anaplasmosis y babesiosis bovina.

Mientras que en el INTA de Rafaela, las cepas atenuadas de *Babesia* se propagan en forma *in vitro* a través de cultivo de eritrocitos de bovino, en el INTA de Mercedes, la propagación ocurre por pasajes *in vivo* en terneros esplenectomizados.

Al igual que lo que frecuentemente ocurre con otras vacunas basadas en organismos vivos, la multiplicación parasitaria de *Babesia sp.* produce en los bovinos jóvenes una reacción post - vacunal leve que generalmente cursa sin manifestaciones clínicas. La vacuna viva está indicada para uso exclusivo en bovinos de 4 a 10 meses de edad clínicamente sanos y en buen estado nutricional, ya que en animales adultos pueden llegar a producirse reacciones post-vacunación graves e incluso la muerte si no se controlan adecuadamente (Grupo de Parasitología de la EEA - INTA Rafaela, 2003).

Es por eso que su uso en adultos no está recomendado y en caso de necesitarse, se recomienda mantener a los animales vacunados en observación debido al riesgo de reacciones post-vacunales severas (**Shkap et al., 2005**) La reacción por *B. bovis* y *B. bigemina* ocurre entre los días 7 al 20 post-inoculación y la de *A. centrale* entre los días 40 y 60 post-inoculación.

1.13 Limitaciones de las vacunas vivas atenuadas.

La vacunación con cepas vivas atenuadas son altamente efectivas para inducir una respuesta inmune que confiera protección al bovino durante toda su vida útil (**Bock et al., 2004**). La vacunación le propicia al animal una inmunidad contra la babesiosis que perdura como mínimo 4 años (máximo período evaluado) y contra la anaplasmosis, toda la vida. Sin embargo, se presentan una serie de dificultades y desventajas que limitan su uso.

Un inconveniente serio es el riesgo de que estas vacunas transmitan otros microorganismos patógenos originados en los bovinos dadores (**Bock et al., 1992; de Vos et al., 1995**). También existe el riesgo de reversión de las cepas atenuadas a cepas patógenas (**Timms et al., 1990**) aunque en Argentina no se han reportado hasta la fecha estos eventos. Otra limitación no menor es la necesidad de mantener la cadena de frío y aún así, la vacuna debe administrarse en un lapso no menor a 7 días desde la fecha de formulación.

La otra vacuna disponible, que utiliza los mismos microorganismos atenuados de la vacuna de INTA Rafaela, es producida por la empresa privada “Litoral Biológicos S.R.L” bajo la marca comercial “BioJaJa”.

Dicha empresa tomó la vacuna trivalente producida por el INTA y la formuló de manera tal que pudo ser congelada en pajuelas y almacenada en termos de nitrógeno líquido. La producción de esta vacuna en forma ultra congelada permite extender los plazos de vencimiento del antígeno, acumular *stock* y facilitar su distribución y conservación en zonas remotas. Si bien se logra extender los plazos de vida media, sigue siendo fundamental el mantenimiento de una cadena de frío y su consecuente logística. Otra desventaja que se suma a esta producción es la necesidad de formular estas vacunas con el triple de eritrocitos infectados, dado que el congelado y descongelado de las pajuelas provoca la disminución de la viabilidad de los parásitos.

Existe por tanto una necesidad creciente de producir una vacuna que confiera protección como las vacunas atenuadas pero sin las desventajas de éstas. Una solución podría ser el diseño racional de una nueva plataforma vacunal capaz de despertar una respuesta inmune tanto efectora como de memoria, acorde al modelo actualmente propuesto de inmunidad adquirida contra estos parásitos, esto es, la producción de IFN γ por linfocitos *Th1/CD4⁺*, estimulando por un lado la producción de IgG₂ que tienen fuerte actividad opsonizante, y por otro, la activación de macrófagos que fagociten a los parásitos (Homer, 2000).

1.14 La búsqueda de candidatos vacunales contra *B. bovis*.

Las vacunas basadas en cepas vivas atenuadas están diseñadas para “emular” una infección sin que ocurran signos clínicos en los hospedadores vacunados. Esto quiere decir, que se busca generar la misma respuesta inmune que cuando ocurre una infección natural pero sin provocar la enfermedad. La inmunidad asociada a estas vacunas vivas provee una continua fuente de estimulación antigénica, que por otro lado es requerida para el mantenimiento de una respuesta inmune efectora y de memoria (**Sallusto *et al.*, 2010**).

La capacidad de conferir algún nivel de protección seguida a la inmunización con parásitos muertos o extractos de parásitos después del desafío con cepas homólogas o heterólogas, ha provisto la razón para el desarrollo de vacunas a subunidades (**Edelhofer *et al.*, 1998**; **Wright *et al.*, 1992**). Los antígenos parasitarios que se han investigado, son aquellos señalados como blanco del sistema inmune y/o aquellos implicados en funciones esenciales para la supervivencia del parásito, tales como la invasión al eritrocito o la variación antigénica, la cual es un factor esencial notable del parásito para escapar del sistema inmune del hospedero bovino (**Allred *et al.*, 1993**). El cultivo *in vitro* de *Babesia* y las herramientas de ingeniería genética, han facilitado considerablemente el estudio de las interacciones hospedero - parásito y permitido la caracterización de tales antígenos.

Cuatro grupos de antígenos han sido particularmente estudiados con el fin de probar su potencial inmunoprotector mediante la inoculación de proteínas recombinantes: 1) los presentes en la superficie de eritrocitos infectados; 2) los presentes en la superficie de los merozoítos 3) los presentes en las organelas del complejo apical; y 4) los excretados-secretados en el sobrenadante de cultivo *in vitro*.

Entre los antígenos descritos en la superficie de los eritrocitos parasitados con los mencionados parásitos, se encuentran aquellos que son polimórficos entre distintos aislamientos y los cuales estarían involucrados en el fenómeno de variación antigénica y señalados como implicados en un mecanismo de escape inmune. Se trata de dos proteínas designadas como VESA - 1 la cual está compuesta por una proteína de 128 kDa (VESA-1a) y de una proteína de 113 kDa (VESA-1b). VESA-1a se localiza sobre la fase extracelular de la membrana plasmática del eritrocito parasitado, a nivel de las protuberancias denominadas "*knobs*" y existe una hipótesis que afirma que VESA-1a permitiría a *B. bovis* escapar al sistema inmune del hospedero según un proceso hasta ahora desconocido, en el que intervendría sobre el DNA del parásito, permitiendo una variación antigénica rápida de la proteína dentro de las poblaciones clonales (**O'connor et al., 1997**). No obstante su localización, la cual la hace un blanco de elección, VESA-1a no ha sido estudiada en ensayos de vacunación debido a su alto grado de polimorfismo. No obstante esto, los genes que codifican estas proteínas han sido extensamente estudiados para comprender los mecanismos básicos de generación de variabilidad antigénica en *Babesia sp.*

El segundo grupo de antígenos son los ubicados en la superficie del merozoíto y que están expuestos al sistema inmune del hospedero durante el breve período extracelular precedente a la invasión del eritrocito por el merozoíto.

Sin embargo, esta fase donde el merozoíto es libre, es suficiente para inducir una respuesta inmune ya que los sueros inmunes de bovinos infectados por *B. bovis*, reconocen los antígenos de superficie de 42 kDa (MSA-1) y de 44 kDa (MSA-2) (**Goff et al., 1988; Hines et al., 1992; 1995**) Estas dos moléculas, que presentan un cierto grado de polimorfismo antigénico entre los distintos aislados geográficos (**Palmer et al., 1991**) han sido reagrupadas dentro de una familia de antígenos variables de superficie del merozoíto designada VMSA. La capacidad de los anticuerpos provenientes de animales vacunados y dirigidos contra la proteína recombinante rMSA-1 para neutralizar la infectividad de los *in vitro*, sugieren un importante papel de la proteína MSA-1 en la protección inmune contra *B. bovis* (**Hines et al., 1992; 1995**). MSA-1 es altamente inmunodominante y reconocida como una banda proteica mayor en *WBs* por suero de bovinos que se recuperaron de la infección (**Brown et al., 1991**). MSA-1 fue inicialmente un candidato vacunal atractivo porque está codificada por un gen de copia única, está expuesta en la superficie del merozoíto, es altamente inmunogénica en su estado nativo, y los anticuerpos contra la forma nativa o recombinante de MSA-1 neutralizaron la infectividad de los merozoitos *in vitro*, sugiriendo su importancia en la invasión de los mismos (**Hines et al., 1992; Mosqueda et al., 2002; Suarez et al., 2000**). Sin embargo, cuando MSA-1 fue probada como inmunógeno formulada en adyuvante Montanide 75, no fue efectivo ya que los

animales vacunados a pesar de que produjeron una elevada cantidad de anticuerpos, no fueron protegidos contra un desafío con cepa homóloga virulenta (**Hines et al., 1995; Hines et al., 1992**).

Otro antígeno que reviste particular interés es la proteína de choque térmico HSP20, co-localizada tanto en la superficie del merozoíto como en el citoplasma del parásito. Esta proteína se encuentra altamente conservada entre cepas de *B. bovis* y *B. bigemina* (**Brown et al., 2001**). En este trabajo, Brown y colaboradores logran caracterizar a HSP20 de *B. bovis* pudiendo además mapear epitopes de tipo B y Th1 CD4⁺. Estos estudios permiten seleccionar a este antígeno como candidato en el diseño de una vacuna contra la babesiosis.

El tercer grupo de antígenos estudiados como posibles candidatos vacunales debido a sus implicaciones dentro del proceso de invasión del eritrocito por el merozoíto y de la disolución de la vacuola parasitófora son los antígenos del complejo apical de *Babesia sp.* contenidos dentro de organelas como las roptrias, micronemas o cuerpos esferoidales (**McElwain et al., 1991; McGuire et al., 1991; Ushe et al., 1994**). Los antígenos de las roptrias pertenecen a una familia multigénica que han sido identificada en las especies *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens* (**Suarez et al., 1991; Dalrymple et al., 1993; Skuce et al., 1996**). RAP-1 es un antígeno de 60 kDa que es reconocido por anticuerpos y células T de bovinos naturalmente inmunes a la babesiosis (**Norimine et al., 2003**). Aún cuando la función de las proteínas RAP no ha sido dilucidada perfectamente, el hecho de que anticuerpos monoclonales anti-RAP-1 inhiban el crecimiento de *B. bigemina in vitro*

(**Figueroa et al., 1991**), sugiere la implicación de las moléculas RAP-1 en el mecanismo de invasión y la importancia de estas moléculas a nivel inmunológico. Además, las moléculas RAP-1 de *B. bovis* y de *B. bigemina* poseen epitopes de células T *helper*, los cuales se encuentran conservados entre cepas de las diferentes especies. Siendo altamente inmunogénicos, estos epitopes tienen la capacidad de inducir a los linfocitos T cooperadores, que al expresar IFN γ activarán a los linfocitos B secretores de anticuerpos IgG2 opsonizantes (**Brown et al., 1998**). Se han realizado ensayos de inmunización y posterior desafío con la proteína RAP-1 recombinante (**Norimine et al., 2003**). Esta proteína fue seleccionada dado la evidencia de que es capaz de generar anticuerpos neutralizantes que bloquean la invasión de esporozitos y merozoitos al eritrocito bovino (**Mosqueda et al., 2002; Yokoyama et al., 2002**).

En otros ensayos de inmunización en donde RAP-1 recombinante administrada con IL-12 y adyuvante RIBI, se observó una fuerte proliferación de linfocitos T CD4⁺ con producción de IFN γ . Este ensayo de inmunización despertó una fuerte respuesta mediada por células B productoras de IgG1 e IgG2, pero ninguno de los bovinos fue protegido, luego del desafío con la cepa virulenta T2Bo. Además, el alto título de suero inmune obtenido después de la inmunización falló en neutralizar la infectividad *in vitro* esta cepa T2Bo de *B. bovis*, en contraste a lo observado con suero bovino inmune anti-MSA-1 (**Norimine et al., 2003**).

Dentro de las proteínas del complejo apical, las proteínas del cuerpo esférico estarían igualmente involucradas en el proceso de invasión y de la modificación de la membrana del eritrocito infectado. Se han identificado tres proteínas que se localizan en los cuerpos

esferoidales: una molécula de 77-80 kDa (Bb-I/Bv80) (**Dalrymple et al., 1993**); una de 225 kDa (BvVAI) (**Dalrymple, et al., 1993; Jasmer et al., 1991**) respectivamente redesignadas como SBP-1 y SBP-2 (**Jasmer et al., 1991**) y una de 135 kDa denominada SBP-3. Las moléculas SBP1 y SBP2 se encuentran asociadas con la fase citoplásmica de la membrana del eritrocito infectado durante o justamente después de la invasión (**Dowling et al., 1996; Hines et al., 1995; Jasmer et al., 1991; Ruff et al., 2000**). Las proteínas SBP1 y SBP2 son los principales componentes de la fracción DSP (fracción proteica de los antígenos parasitarios solubles) a la cual se le atribuye capacidad inmunoprotectora en los bovinos (**Goodger et al., 1992**).

Estas dos moléculas han sido clonadas y expresadas en forma de proteína de fusión. La molécula SBP1 presenta en la región N-terminal epitopes T capaces de inducir una respuesta inmune celular (**Brown et al., 1993**) los cuales muestran polimorfismo entre los distintos aislamientos (**Hines et al., 1995a**).

La capacidad para inducir una respuesta inmune protectora ha sido evaluada en dos antígenos de los denominados excretados/secretados (antígenos parasitarios liberados ya sea naturalmente *in vivo* en el plasma de los animales infectados, o *in vitro* en el sobrenadante de cultivo) de *B. bovis*, el cuarto grupo de los estudiados como posibles candidatos para el desarrollo de vacunas recombinantes. Así, se evaluó la inoculación en bovinos de los antígenos 12D3 y 11C5 localizados en el extremo apical de los merozoítos y en el citoplasma de eritrocitos infectados, expresados como proteínas recombinantes en *Escherichia coli* y formulados en adyuvante Montanide ISA 50V, Quil A y DEAE dextrano.

Los animales fueron luego desafiados con el aislamiento heterólogo australiano W, altamente virulento. Aunque los grupos de bovinos vacunados con 12D3, 11C5 o una combinación de ambas redujeron la parasitemia aproximadamente 4 veces y algunos animales individuales parecieron controlar la infección del parásito, todos los animales mostraron síntomas de la enfermedad y la mayoría requirió tratamiento. Es importante mencionar que hubo una variación significativa entre los animales dentro de cada grupo. Los resultados confirman el uso potencial de ambos antígenos pero también demuestran las limitaciones de las formulaciones utilizadas (**Brown et al., 2006; Hope et al., 2005**).

A pesar de los grandes avances realizados en la última década, especialmente en lo que respecta a la caracterización de epitopes de tipo B y T de los antígenos candidatos a vacuna aquí mencionados, a la fecha no se ha producido en forma comercial ningún biológico recombinante contra la babesiosis bovina que posea características adecuadas de eficacia, potencia, seguridad y costo. Permanece el reto de involucrarse más profundamente en el descubrimiento de los antígenos esenciales para el desarrollo de una vacuna ideal (**Figuroa Millán et al., 2003**).

A pesar de que el desarrollo de vacunas recombinantes para *B. bovis* no ha tenido hasta ahora el resultado esperado, este tipo de vacunas han sido exitosas en dos hemoparásitos transmitidos por garrapatas, los piroplásmidos *Theileria parva* y *Babesia divergens*. En el caso de *Theileria parva* la vacunación del ganado en Kenya con una forma recombinante del antígeno de la superficie del esporozoíto denominado p67, redujo significativamente la Fiebre de la Costa Este después del desafío natural (**Musoke et al., 2005**).

Por otro lado, la inmunización de gerbos con la forma recombinante de Bd37, una proteína anclada a la membrana por GPI de *B. divergens*, indujo protección contra el desafío con una cepa virulenta del parásito (**Hadj-Kaddour *et al.*, 2007**). Estos dos antecedentes demuestran la factibilidad de lograr vacunas efectivas de nueva generación utilizando antígenos proteicos recombinantes de parásitos protozoarios apicomplejos como los descritos aquí.

1.15 Los vectores virales en el desarrollo de vacunas de nueva generación.

1.16 Los poxvirus

La familia *Poxviridae* agrupa una serie de virus envueltos con un genoma de ADN doble cadena con replicación en el citoplasma de las células infectadas. Poseen un tamaño de su genoma que varía entre 180 a 300 kilopares de bases. La **Figura 3.1** muestra fotografías de poxvirus tomadas mediante microscopía electrónica en frío.

El virus Vaccinia (VV), prototipo del género *Ortopoxviridae*, fue el primer virus animal en ser visto al microscopio, en ser multiplicado en tejido vivo, en ser titulado, en ser purificado y caracterizado químicamente. Recien en el año 1990 se logró secuenciar el genoma de forma completa de la cepa VV - Copenhagen (**Goebel *et al.*, 1990**).

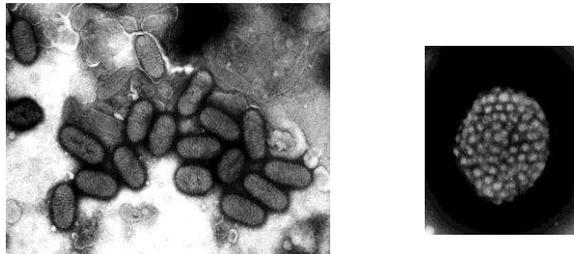


Figura 3.1 Microscopía electrónica en frío de partículas virales de poxvirus.

Fuente: Biblioteca virtual, Universidad Complutense de Madrid.

El ciclo de vida del VV se esquematiza en la **Figura 3.2**. Comienza con la entrada viral de los *cores* y el desnudamiento primario del virus que da paso a la transcripción de los genes tempranos. Las proteínas que aparecen durante este tiempo son generalmente requeridas para pasos posteriores del ciclo de vida. Horas después el virus comienza a replicarse y se silencia la transcripción de los genes tempranos, entonces comienza la transcripción de los genes tardíos que, en su mayoría, codifican para proteínas estructurales. Entre las 8 y las 12 h ya empiezan a aparecer los primeros viriones que permanecen intracelularmente o emergen de la membrana, para dar lugar a las formas extracelulares.

Los mecanismos que regulan el paso de la transcripción de los genes tempranos a los genes tardíos, todavía no han sido dilucidados. Del estudio de estos genes, se han definido secuencias consenso para promotores tempranos y tardíos, lo cual ha permitido el diseño de promotores sintéticos capaces de provocar altos niveles de transcripción (**Davinson & Moss, 1989**).

1.17 Los poxvirus como vectores de expresión.

En un sentido amplio, un vector se define como un vehículo que se usa para movilizar la información genética entre células. Algunos vectores virales son virus modificados que llevan genes foráneos o secuencias integradas en posiciones que no son esenciales para la replicación viral ni para la infectividad.

Estos vectores virales han sido desarrollados utilizando sistemas tales como adenovirus (Berkner & Sharp, 1992) herpesvirus (Post *et al.*, 1982), retrovirus (Wei *et al.*, 1981) o poxvirus (Mackett, *et al.*, 1982; Panicali & Paoletti, 1992) entre otros.

En general, los virus pueden clasificarse según la interacción virus-célula en: a) virus replicativos, si se produce una infección productiva; o b) virus no replicativos, cuando no hay producción de una progenie viral. Esta característica es de suma importancia a fin de seleccionar el tipo de virus adecuado para cada estudio.

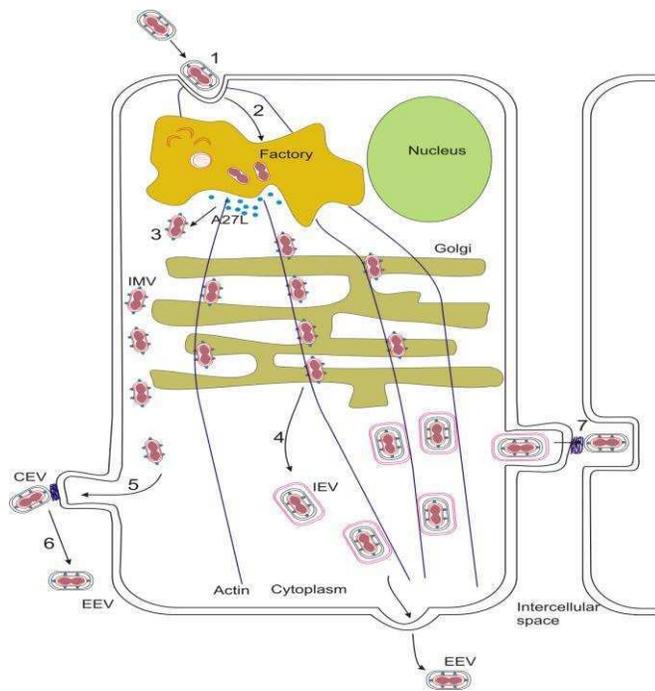


Figura 3.2. Ciclo de replicación del virus vaccinia. Los viriones se adsorben a la célula (1) y se fusionan a la membrana plasmática, liberando los *cores* dentro del citoplasma. La transcripción de los genes tempranos (2) incluye factores de crecimiento, moléculas involucradas en la evasión de la respuesta inmune, enzimas y factores para la replicación del ADN y la transcripción intermedia y tardía. Los viriones maduran y se convierten en IMV (viriones intracelulares maduros) (3), los cuales se liberan únicamente mediante lisis celular en forma de CEV (5) (cell-associated enveloped virion). Sin embargo, los IMV pueden adquirir una envoltura en su paso por las membranas del Golgi (4) y luego ser transportados a la periferia de la célula como IEV (immature enveloped virion). La fusión de los viriones envueltos con la membrana plasmática resulta en la liberación de los viriones extracelulares envueltos (EEV) (6) que infectan células adyacentes (7). A27L: proteína de membrana del VV requerida para lograr la forma infectiva EEV (Adaptado de Flint *et al.*, 2003).

Los virus recombinantes se utilizan frecuentemente como vectores de expresión para estudios sobre la biología molecular de los virus, producción y caracterización funcional de proteínas *in vitro*, estudios inmunológicos, y producción de vacunas de nueva generación (Bennink, 1990; Paoletti, 1996; Pastoret *et al.*, 2003; Schliephake, 1994; Tatsis *et al.*, 2004).

Los poxvirus poseen varias ventajas que los posicionan como excelentes candidatos para ser considerados en el diseño de vacunas (Pastoret *et al.*, 2003). Algunas de estas ventajas consisten en:

- La vacuna obtenida es extremadamente estable y no requiere cadena de frío para su almacenamiento, lo cual podría disminuir los costos de campañas de vacunación masivas;
- La posibilidad de inserción de 2 genes en 1 ó 2 *loci* no esenciales, permitiendo su uso como vacuna bivalente;
- La ausencia de restricción para el tamaño de los insertos: la flexibilidad en el empaquetamiento del genoma permite delecionar regiones considerables para la inserción de genes foráneos (se pueden insertar hasta 25 kpb);
- La posibilidad de utilización de los promotores del virus vaccinia. Hay tres clases de promotores: de expresión temprana, intermedia y tardía. Se han desarrollado algunos plásmidos que combinan promotores sintéticos de expresión temprana y tardía que permiten una expresión fuerte y temprana del antígeno de interés.

- La presentación antigénica desencadena respuestas inmunes protectoras de tipo celular y humoral por tratarse de un inmunógeno vivo (**Whitton & Oldstone, 1996**).

- La protección obtenida es generalmente dependiente de la dosis (**Wyatt et al., 2004**);

- La vacuna puede ser administrada por diferentes vías: muchas investigaciones demostraron que la vacuna es efectiva por vía parenteral u oral;

- Permitir la discriminación entre animales naturalmente infectados y animales vacunados (DIVA: del inglés, *differentiation of infected from vaccinated animals*). Esto es posible ya que la vacuna recombinante expresa un determinado conjunto de antígenos del patógeno

Por lo mencionado, es fácil comprender las razones por las cuales los poxvirus han sido ampliamente utilizados como vectores de expresión. En la producción de vacunas de nueva generación basadas en poxvirus, inicialmente la mayor atención se enfocó en el VV ya que presenta un amplio rango de hospedadores y su biología molecular fue ampliamente estudiada (**Broyles, 2003; Moss, 2006**). En este virus se expresaron una gran variedad de genes foráneos derivados de diferentes agentes infecciosos (**Belsham et al., 1990; Elango et al., 1986; Goebel et al., 1990; Mackett et al., 1984; Paoletti et al., 1984**).

Sin embargo, ciertos efectos secundarios asociados con la inoculación, sumados al amplio rango de hospedadores, desalentaron la utilización del VV como sistema de expresión para vacunas a virus vivo. Con el objetivo de incrementar la seguridad del uso del VV como sistema de expresión de inmunógenos se abordaron distintas estrategias.

Una de ellas consistió en el uso de cepas vacunales de otros poxvirus que poseen un rango de hospedador más restringido (avipoxvirus, swinepoxvirus, capripoxvirus). Otras, en la selección de variantes atenuadas del VV. Esto se llevó a cabo mediante la delección de genes virales relacionados con virulencia e involucrados en el metabolismo de ácidos nucleicos, en la interacción con el hospedador y en la formación de virus extracelular. Este es el caso de la variante viral altamente atenuada denominada NYVAC. Ésta se desarrolló a partir de la cepa Copenhagen del VV y posee 18 marcos abiertos de lectura (ORF) delecionados respecto del genoma viral parental. La cepa NYVAC es incapaz de producir partículas virales infecciosas en humanos y posee una limitada capacidad de replicación en células humanas en cultivo. Numerosos ensayos en animales y humanos han demostrado la seguridad de los vectores virales basados en esta cepa (**Brockmeier *et al.*, 1993; Paoletti *et al.*, 1995; Tartaglia *et al.*, 1992; Welter *et al.*, 2000**).

Otra estrategia utilizada consistió en el pasaje sucesivo del VV en un hospedador no natural o en cultivo de tejidos y, en consecuencia, en el aislamiento de nuevas variantes virales como, por ejemplo, el virus vaccinia Ankara modificado (MVA). Este virus fue utilizado como vacuna segura contra la viruela siendo administrado a más de 100.000 personas (**Mahnel *et al.*, 1994; Stickl *et al.*, 1974**). Es importante destacar que ambos tipos de estrategias empleadas condujeron a la obtención de variantes del VV altamente atenuadas que poseían un rango de hospedadores más restringido pero que como vectores retenían la capacidad de inducir respuestas inmunes potentes contra antígenos foráneos.

En resumen, existe a la fecha un gran número de poxvirus que se han desarrollado contra diversas enfermedades infecciosas humanas, animales e incluso el cáncer. Un reporte publicado en el año 2015 da cuenta de una gran cantidad de poxvirus recombinantes, entre los que se destaca el MVA (**Sánchez-Sampedro *et al.*, 2015**). En ese extenso reporte se menciona el virus recombinante que se desarrolló en este presente trabajo.

1.18 El virus vaccinia Ankara modificado y su uso como vector de expresión.

El virus vaccinia Ankara modificado (MVA) es un poxvirus perteneciente al género *Orthopoxviridae*. El genoma viral está totalmente secuenciado y posee un tamaño de 178 kpb (**Antoine *et al.*, 1998**). El virus MVA es un virus altamente atenuado obtenido a partir de la cepa corioalantoidea del virus Vaccinia Ankara (CVA), una cepa vacunal utilizada para combatir la viruela en Turquía (**Sutter, 2003**). El virus MVA se obtuvo luego de la realización de más de 570 pasajes en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEP). La utilización de esta metodología condujo a la delección de grandes porciones del genoma. En el año 1998, se reportó la secuencia completa del genoma del virus MVA y se identificaron los genes perdidos durante el proceso de atenuación. El fenotipo atenuado de MVA es el resultado de numerosas mutaciones que afectaron particularmente a las proteínas que interactúan con el hospedador, a los genes con motivos tipo anquirina y a algunas proteínas estructurales (**Antoine *et al.*, 1998; Blanchard *et al.*, 1998**).

En un extenso trabajo de análisis sobre la capacidad replicativa del virus MVA comparada con su antecesor, la cepa Copenhagen VV, (**Carroll y Moss, 1997**) evaluaron la diseminación viral y clasificaron a los tipos celulares como permisivos, semipermisivos o no permisivos para la replicación de MVA, dependiendo del aumento del título viral observado (más de 25 veces, entre 1 y 25 veces, menos de 1 vez, respectivamente). En este extenso estudio se evaluaron más 10 líneas celulares de mamíferos, pudiéndose determinar *in vitro* que la replicación ocurría eficientemente en las células BHK-21. Solo en esta línea celular, se obtuvieron resultados comparables a la replicación del MVA en fibroblastos de embrión de pollo (FEPs).

La metodología más común utilizada en la generación de poxvirus recombinantes es la recombinación homóloga entre el genoma viral y un ADN plasmídico que porta el gen de interés bajo regulación de un promotor temprano del virus vaccinia, un gen marcador o un gen de resistencia a un antibiótico, flanqueados por regiones virales no esenciales para la replicación viral *in vitro* (en la **Figura 3.3** se muestra un esquema de como ocurre la recombinación homóloga). En la bibliografía sobre MVA, se reporta que los genes *MVA086R* y *MVA165R* resultan sitios útiles para la inserción de secuencias foráneas dado que su ausencia es compatible con la replicación del genoma viral en condiciones de laboratorio (**Antoine et al., 1996; Scheiflinger et al., 1996**). El gen *MVA086R* codifica para la proteína viral timidina quinasa (TK) mientras que el gen *MVA165R* codifica para la proteína viral hemoaglutinina.

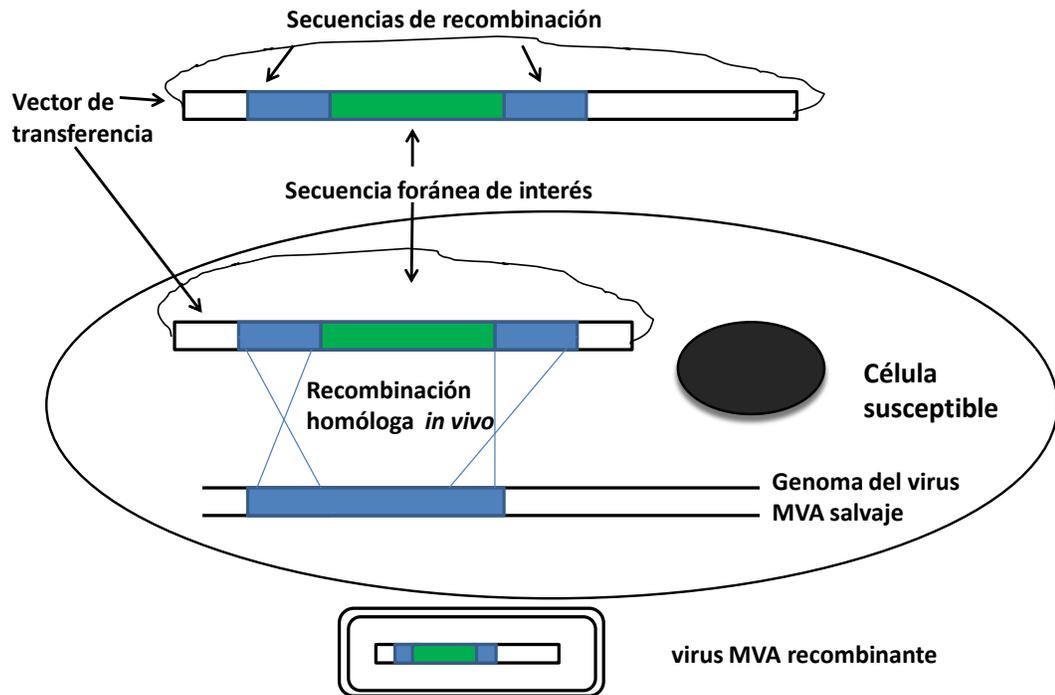


Figura 3.3. Obtención de MVA recombinantes. El esquema muestra el proceso de recombinación homóloga *in vivo* que ocurre, en una célula susceptible, entre el genoma del virus MVA wild type y un vector plasmídico de transferencia que lleva el gen heterólogo de interés flanqueado por secuencias génicas poxvirales no esenciales. De esta manera, se genera un virus MVA recombinante que porta el gen foráneo deseado. Adaptado de (Rocha *et al.*, 2004).

1.19 La respuesta inmune inducida por el virus MVA.

Cuando el virus MVA es inoculado en un hospedador, la respuesta inmune inducida incluye tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa. Pero además, se ha visto el efecto adyuvante que tiene este virus. En un reporte publicado por Hutchings y colaboradores (2005), los autores observan que cuando co - administran el virus MVA recombinante que expresa el antígeno de superficie S del virus de la Hepatitis B (MVA – HBs), junto con este antígeno recombinante purificado de un sistema de expresión eucariota (rHBAG), se induce una mayor producción de anticuerpos específicos en comparación con el grupo que solo recibe dos dosis de rHBAG, indicando el efecto adyuvante del virus. (**Hutchings *et al.*, 2005**).

En cuanto a la respuesta innata, se ha visto que el virus MVA es capaz de activar la vía de los receptores *Toll-like* como TLR-2-TLR-6-MyD88, de activar la vía de los receptores de la familia RIG – 1 (que reconocen patrones asociados a patógenos) como el MDA-5-IPS-1 y la vía de los inflamosomas como NALP3 en macrófagos, induciendo la producción de las quemoquinas IFN β e IL- 1 β (**Delaloye *et al.*, 2009**). Más recientemente, en un estudio realizado con voluntarios adultos sanos a *Mycobacterium tuberculosis* (voluntarios que habían sido vacunados con la vacuna BCG), los investigadores observaron que cuando a estos voluntarios se los inmuniza con el virus MVA que porta la secuencia del antígeno 85A de *M. tuberculosis*, mostraron al día 2 post-vacunación un aumento en la expresión de los genes de los receptores de la respuesta innata correspondientes a los receptores

TLR-1, TLR-6, a las quemoquinas CCL2, CXCL10, y a las interleuquinas IL-1A, IL-6, y TNF α entre otros (**Matsumiya *et al.*, 2013**).

La respuesta inmune adaptativa desencadenada por el virus MVA implica fundamentalmente la respuesta celular. Ya a mediados de la década del 70, Mayr y colaboradores habían realizado ensayos de inmunización con el virus MVA por vía intraperitoneal en ratones observando una importante actividad fagocítica en esos animales vacunados (**Mayr *et al.*, 1975**). Luego, pudo demostrarse que los interferones de Tipo I y Tipo II son críticos en la respuesta antiviral contra el virus Vaccinia (**Alcami A, 1995; Symons *et al.*, 1995**).

Otro aspecto interesante de la respuesta inmune es el rol que juegan los linfocitos T CD8⁺ en la inmunidad antiviral, encargada de reconocer las células infectadas por los virus vía CMH I y posterior destrucción de las mismas desencadenando los mecanismos clásicos de citotoxicidad evitando así la propagación de la infección viral (**Smith and Kotwal, 2002**). Se han realizado ensayos de citotoxicidad en ratones infectados con el virus vaccinia a los que luego se les extrajeron los esplenocitos para re-estimularlos *in vitro* y evaluar la respuesta CTL. Estos ensayos mostraron un fuerte aumento en la respuesta citotóxica específica contra el virus a los 6 días de la infección. Cuando estos animales fueron re – infectados, la respuesta CTL medida a los 4 días de dicha re – infección resultó ser hasta ocho veces más elevada que la desencadenada inicialmente (**Andrew et al., 1989**). Estos estudios muestran el rol fundamental que tienen los CD8⁺ en la infección por este virus.

Posteriormente, la respuesta inducida por estos virus pudo ser caracterizada en los numerosos ensayos de inmunización con virus MVA recombinantes que expresan antígenos heterólogos contra una gran variedad de enfermedades infecciosas incluso el cáncer y que ahora están siendo evaluadas en diferentes fase clínicas (**Draper et al., 2010**). Otras investigaciones se han orientado en dilucidar que interacción existe entre el MVA y las células dendríticas. Ensayos de infección *in vitro* de células dendríticas maduras e inmaduras mostraron la capacidad de estas células de presentar antígenos específicos en el contexto de clase I (**Di Nicola et al., 1998; Drexler et al., 1999; Kastenmuller et al., 2006**). Estudios posteriores permitieron observar que, estas células también son capaces de presentar antígenos específicos del virus MVA en el contexto de clase II.

La vía clásica de presentación de los antígenos intracelulares ocurre en el contexto de clase I mientras que los antígenos extracelulares fagocitados son cargados a las moléculas de clase II para estimular linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (**Trombetta et al., 2005**). Además, de este mecanismo clásico de presentación antigénica, se sabe que los antígenos extracelulares también pueden ser presentados en el contexto de clase I, por el mecanismo de *cross – presentation* (**Joffre et al., 2012**).

Otros estudios llevados a cabo en los últimos años han mostrado evidencias de que también los antígenos intracelulares pueden ser procesados para la presentación en el contexto de clase II (**Nedjic et al., 2008; Zwickey et al., 2006**). En un trabajo publicado recientemente, Thiele y colaboradores (2015) investigaron en detalle las vías de presentación antigénica posiblemente involucradas tras la vacunación con el virus MVA.

Utilizaron virus MVA *wild type* y un virus recombinante que expresa la proteína Ovoalbúmina (OVA) y cuyos epitopes T CD4⁺ habían sido previamente caracterizados. En sus experimentos, estos investigadores demuestran que las células dendríticas infectadas tanto con el MVA *wild type* como con el MVA – OVA son capaces de activar eficientemente linfocitos CD4⁺ por la vía endógena de presentación. Además, mediante la experimentación con ratones *knock out* para las proteínas TAP y LAMP-2 e inhibidores químicos, pudieron establecer que la presentación antigénica *de novo* en células dendríticas infectadas por el virus MVA involucra los mecanismos de procesamiento por autofagia y/o la degradación proteasómica.

En su conjunto, estos trabajos realizan un aporte interesante que permiten no solo comprender el tipo de respuesta que provocan los poxvirus sino que además contribuyen al diseño racional en la optimización de estrategias de vacunación en virtud del tipo de respuesta inmune que se desea obtener.

1.20 Los adenovirus

La familia *Adenoviridae* comprende los géneros *Mastadenovirus* (que infectan a mamíferos), *Aviadenovirus* (que infectan a las aves) y *Atadenovirus* (que infectan a los reptiles) y todos estos virus están ampliamente extendidos en la naturaleza. Hasta la fecha, se han descrito más de 100 serotipos distintos, de los cuales 51 son capaces de infectar humanos.

Los adenovirus son los virus sin envoltura más grandes y tienen el tamaño máximo factible para ser transportados a través del endosoma, por lo que no precisan la fusión de la envoltura con la membrana celular.

El genoma adenoviral es un ADN de doble cadena de aproximadamente 35 kb de tamaño, flanqueado por repeticiones terminales invertidas (*ITR*) de 100-140 nucleótidos y una señal de empaquetamiento (*psi*) cerca del *ITR* izquierdo. El genoma contiene gran cantidad de genes, que se agrupan en regiones tempranas y tardías, según el momento en que se transcriben después de la infección (**Figura 3.4**). Así, las regiones tardías se transcriben tras la replicación del genoma viral, y contienen los genes que codifican las proteínas estructurales del virus. En cambio, las regiones tempranas se transcriben antes de la síntesis del ADN viral, y cumplen varias funciones: las proteínas codificadas en E1 incluyen, por ejemplo, E1A (proteína necesaria para transactivar la transcripción de los demás genes virales) y E1B 55kd (que se une a E4). Además, estas proteínas interfieren con las funciones de la célula huésped: E1A es una oncoproteína, E1B 19kd inhibe la apoptosis mediada por p53 y E1B 55kd promueve la degradación de p53.

La región E2 codifica proteínas necesarias para la replicación viral: ADN polimerasa, y proteína terminal.

La región E3 codifica algunas proteínas que ayudan al adenovirus a escapar al sistema immune, como la proteína gp19kd que inhibe la presentación de fragmentos antigénicos con moléculas de clase II del CMH.

La region E4 codifica diversas proteínas que silencian genes endógenos, regulando el transporte de ARN mensajeros fuera del núcleo

Los Adenovirus se asocian a las células *target* por unión a su receptor Cocksackie/Adenovirus (CAR) (Bergelson *et al.*, 1997). Luego de la unión al CAR, los adenovirus son internalizados vía endocitosis mediada por integrinas (Russell, 2000) seguido por un activo transporte al núcleo celular.

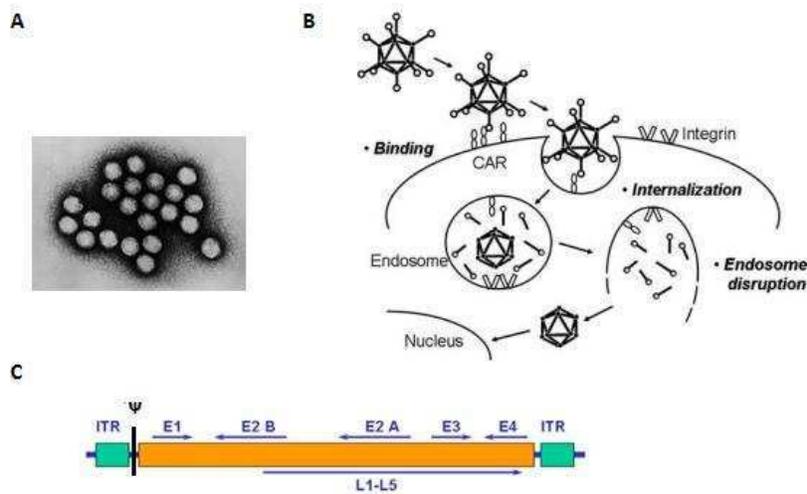


Figura 3.4. A. Microscopía electrónica en frío de partículas adenovirales. B. Esquema de entrada de la partícula adenoviral a la célula huésped. C. Esquema de la organización del genoma de un adenovirus, flanqueado por las regiones ITR y la señal de empaquetamiento Ψ . Tomado de http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/08101998/00042/B82-0142_lores.jpg

Una vez en el núcleo, los eventos tempranos de replicación son iniciados, entre ellos la transcripción y traducción de la proteína E1. Seguido de la expresión de los genes tardíos y replicación viral. La expresión de los genes tardíos es dependiente de la proteína E1.

1.21 Respuesta inmune inducida por los adenovirus

La respuesta inmune inducida por los adenovirus incluye tanto la respuesta innata como la adaptativa. Estudios tanto en ratones como en primates, en los que se administraron partículas adenovirales por vía intravenosa, mostraron una fuerte respuesta proinflamatoria caracterizada por la liberación de IL-6 e IL-8 y el reclutamiento de neutrófilos en el hígado (**Douglas, 2007**). También se ha reportado que los macrófagos y las células *natural killers* tendrían un rol preponderante en la inmunidad innata antiviral (**Worgall et al., 1997**). Por otro lado, el reconocimiento del ADN viral por parte del TLR9-MyD88 induce la activación del factor de transcripción NF- κ B siendo este un regulador clave de la respuesta antiviral innata (**Ferreira et al., 1999**), ya que puede activar la transcripción de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión (**Clesham et al., 1998; Lieber et al., 1998**).

En la respuesta inmune adaptativa, la respuesta celular mediada por linfocitos CD8⁺ cumple un rol fundamental. Estas células reconocen los antígenos virales cargados en el contexto de Clase I en la superficie de las células presentadoras de antígenos que luego desencadena el mecanismo de lisis celular por liberación de perforinas (**Russell, 2000**). La respuesta mediada por linfocitos T *helper* CD4⁺ también está presente al estimular linfocitos B productores de anticuerpos contra varias proteínas de la cápside viral.

En este sentido, los anticuerpos neutralizantes parecen ser un factor importante en la resolución de la infección (**Gahery-Segard *et al.*, 1998; Gahery-Segard *et al.*, 1997; Willcox & Mautner, 1976**).

1.22 Sistema de expresión derivado de Adenovirus

La posibilidad de utilizar a los Adenovirus como vectores virales no replicativos para la expresión de proteínas de interés ha llevado a la disponibilidad de sistemas comerciales de obtención de adenovirus recombinantes¹.

Uno de estos sistemas es el *ViraPower™ Adenoviral Expression System* de la empresa Invitrogen, el cual permite la creación de partículas de adenovirus deficientes en su replicación, que pueden ser usadas para el *delivery* y expresión transitoria de genes de interés en células de mamíferos en división o quiescentes.

El sistema ViraPower utilizado en esta tesis está formado por dos componentes principales. El primero es el vector de expresión pA/CMV/V5/DEST™, el cual contiene todo el genoma del Adenovirus humano – serotipo 5 - exceptuando la región codificante de los genes E1 y E3 mencionados anteriormente.

¹http://www.clontech.com/US/Products/Viral_Transduction/Adenoviral_Vector_Systems/Adenoviral_Expression_System_3

La expresión de los genes de interés está controlada por el promotor de citomegalovirus (CMV) humano y además contiene los elementos requeridos para permitir el empaquetamiento de los genes heterólogos dentro de los viriones (5' y 3' ITR, la señal Ψ de encapsidación y los genes adenovirales tardíos). El otro componente fundamental del sistema es la línea celular optimizada HEK 293A. Estas células tienen integrado en su genoma una copia del gen E1 de adenovirus por lo tanto, suplementan en *trans* las proteínas E1a y E1b requeridas para la generación, amplificación y titulación de los adenovirus recombinantes (Graham *et al.*, 1977; Figura 3.5). El uso de este sistema de expresión adenoviral *Virapower*[™], presenta las siguientes ventajas:

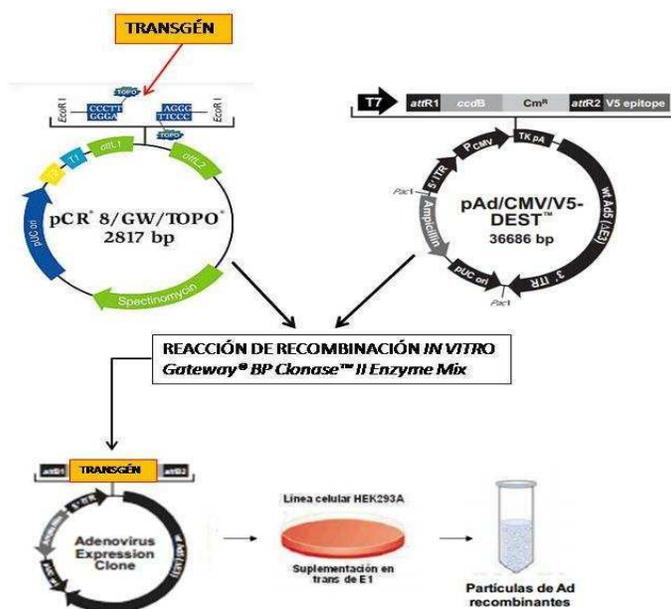


Figura 3.5. Sistema de expresión de Adenovirus recombinante. El transgén de interés se liga al vector de entrada tipo T (en este trabajo se usó el pCR8/GW/TOPO[™]). Posteriormente se hace una reacción de recombinación in vitro entre éste y el vector de destino (pAd-CMV/V5-DEST[™]), el cual contiene todo el genoma de adenovirus excepto la región codificante para las proteínas E1 y E3. Posteriormente, con el vector de expresión generado, se transfectan células HEK293A, que suplementan en *trans* la proteína E1 al vector defectivo, posibilitando la formación de las partículas de Adenovirus recombinantes. Imágenes tomadas del manual del vector pCR® 8/GW/TOPO y del manual *Virapower*® Adenoviral Expression System, ambos disponibles en: www.invitrogen.com.

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

1.23 El uso de vectores virales en vacunas de nueva generación

En un sentido amplio, un vector viral atenuado es considerado como un vehículo que transporta genes foráneos o secuencias integradas en posiciones que no son esenciales para la replicación viral ni para la infectividad. De esta manera, los antígenos foráneos pueden ser sintetizados por los vectores virales, expresados como proteínas heterólogas y presentados en la superficie celular desencadenando una respuesta inmune humoral y celular sin riesgo de que se genere progenie viral infecciosa. En particular, numerosa evidencia demuestra que tanto los poxvirus como los adenovirus son capaces de generar una respuesta inmune específica mediada por linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (**García-Arriaza and Esteban, 2014**).

Por lo mencionado anteriormente en cuanto a sus ventajas desde el punto de vista de su bioseguridad y efectividad, los vectores virales se presentan como excelentes candidatos para ser considerados en el desarrollo de vacunas de nueva generación. No obstante, un aspecto importante a tener en cuenta al momento de elegir estos vectores virales como candidatos vacunales, es la pre – existencia de inmunidad frente a virus similares. Para el caso del virus MVA, la inmunidad pre-existente dada por la enfermedad del *smallpox* (antes de su erradicación en la década del 70') significa una limitación en la inmunogenicidad de este vector. Sin embargo, se han realizado experimentos de inmunización con un virus MVA que expresa el antígeno 5T4 (Trovax [™], vacuna en fase clínica II) contra el cáncer de colon en pacientes previamente inmunizados con *smallpox* y los autores reportaron que esta última inmunización no disminuye la respuesta inmune inducida con el antígeno tumorigénico (**Harrop et al., 2006**).

En el caso de los adenovirus, la infección con algún serotipo adenoviral es altamente prevalente en la población y la primo - infección ocurre a temprana edad - (**Majhen et al., 2014**) de manera que es muy común la presencia de anticuerpos neutralizantes (mayormente IgGs contra las proteínas de la cápside viral). Sin embargo, se ha visto que la presencia de estos anticuerpos neutralizantes es serotipo – específica con muy poca o ninguna reacción cruzada con adenovirus de otras especies (**McCoy et al., 2007; Sharma et al., 2010**).

Este dato es de suma importancia para el desarrollo de candidatos vacunales basados en adenovirus de otras especies, como es el caso del adenovirus de chimpancé AdCh63 desarrollado contra malaria (ver luego **Tabla 2**).

Actualmente, existe una amplia variedad de virus que se encuentran en fase de desarrollo o en ensayos clínicos tanto para su uso en vacunas humanas como en sanidad animal. Estos desarrollos incluyen virus tanto replicativos como atenuados. La **Tabla 1** resume los principales desarrollos que han sido reportados hasta el momento (**Draper et al., 2010**).

Tabla 1 Vacunas basadas en vectores virales recombinantes en desarrollo para uso veterinario y humano		
Vector viral	Uso veterinario contra:	Uso humano contra:
Adenovirus	Virus de la Influenza aviar <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Virus de la Fiebre Aftosa	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>M. tuberculosis</i> , virus de la influenza, HIV-1 y virus de la Hepatitis C
Bacteriófago en Shigella	Ninguno	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Virus Canaripox atenuado	Virus de la influenza equina Virus de la rabia, virus del Nilo Occidental Virus de la leucemia felina Virus distemper canino	HIV - 1 y cáncer
Virus Fowpox (FPV)	Virus de la Influenza aviar Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)	Cáncer
Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)	Virus de la Influenza aviar y NDV	Ninguno
Herpes virus de Pavo	Virus de la bursitis infecciosa y virus de la enfermedad de Marek	Ninguno
Virus de la fiebre Amarilla, cepa 17D	Virus del Nilo Occidental	Virus del Nilo Occidental, virus del dengue Virus de la encefalitis japonesa
Lentivirus	Ninguno	Melanoma y HIV-1
Virus del Sarampión	Ninguno	<i>Plasmodium falciparum</i> Virus del papiloma humano
Virus vaccinia Ankara modificado (MVA)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>M. tuberculosis</i> Virus de la influenza A, HIV - 1 y cáncer de próstata, renal, colon y pulmón
Virus vaccina New York modificado (NYVAC)	Ninguno	<i>Plasmodium falciparum</i> y HIV - 1
Virus Sendai	Ninguno	HIV - 1

1.24 Estrategias de inmunización “prime – boost”

A mediados de la década del '90, el desarrollo de vacunas a ADN impulsó un entusiasmo particular que posteriormente se vio aplacado al observarse que esta nueva plataforma de inmunización no era capaz de generar una respuesta celular protectora contra algunas enfermedades en humanos (**McConkey et al., 2003**).

Con el avance de ciertas técnicas cuantitativas para la medición de la respuesta T como el ELISPOT (del inglés, *enzyme-linked immunoadsorbent spot*) y la citometría de flujo, los vectores virales tomaron un protagonismo principal al demostrar, en diversos experimentos de inmunización, que son capaces de potenciar la respuesta inmune celular en comparación con otras plataformas vacunales (**Mooij et al., 2009; Vuola et al., 2005**). Sin embargo, a diferencia de las vacunas a ADN, algunos vectores virales mostraron ciertas limitaciones en cuanto a despertar una respuesta celular luego de una o dos inmunizaciones debido a la existencia de inmunidad previa contra proteínas estructurales de los mismos virus, como el caso de los adenovirus mencionados anteriormente.

No obstante en los últimos años, esta limitación se vio superada por el desarrollo y evaluación de nuevos vectores virales y de esquemas de inmunización llamados “*prime – boost*” heterólogos. Esta estrategia ha emergido como una herramienta poderosa para establecer inmunidad efectora y de memoria tanto nivel humoral como celular (**Ramshaw & Ramsay, 2000; Woodland, 2004**).

Cabe destacar que la estrategia involucra la administración de una dosis o “*prime*” de antígenos blanco en un vector para inducir la respuesta inmune específica y re-administrar los mismos antígenos en una segunda dosis refuerzo o “*boost*” pero utilizando como inmunógeno otro vector.

Las estrategias de “*prime – boost*” heterólogas resultaron ser más efectivas que las homólogas en términos de intensidad y durabilidad de la respuesta inmune permitiendo sortear además la limitación de la inmunidad generada en la primera dosis contra el vector o la preexistencia de la inmunidad contra los vectores virales (Lu, 2013).

En particular, este tipo de estrategias heterólogas ha cobrado un impulso significativo en el desarrollo de vacunas dirigidas contra infecciones parasitarias causadas por protozoarios. Existen a la fecha varios reportes del uso de vacunas a ADN y MVA contra parásitos protozoarios intracelulares del género *Leishmania* (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2012). En estos reportes se evaluó la inmunogenicidad y eficacia de estas vacunas frente al desafío con resultados promisorios. Por otro lado, en un trabajo publicado en el año 2012, los autores muestran que la inmunización en ratones de un adenovirus recombinante que expresa la proteína SAG₁ del parásito *Toxoplasma gondii*, seguida por un “*boost*” con un virus MVA que expresa el mismo antígeno, era capaz de inducir una respuesta celular T a largo plazo, controlando la formación de quistes en cerebro durante la fase crónica de la infección (Mendes *et al.*, 2013).

El avance más notorio es contra el agente etiológico de la Malaria, *Plasmodium falciparum* debido a que la malaria es la enfermedad parasitaria causante de mayor mortalidad especialmente en niños a nivel mundial. En un trabajo publicado en el año 2013, los autores demuestran que el “*prime*” con un adenovirus de simio que expresa un antígeno multiepitópico contra *P. falciparum*, seguido de un “*boost*” con un MVA que expresa el mismo multiantígeno era capaz de inducir una respuesta T CD8⁺ específica y duradera y que esta respuesta confería un 21% de protección esterilizante en los pacientes vacunados (**Ewer et al., 2013**). Los niveles de respuesta CD8⁺ obtenidos en estos pacientes correlacionaba positivamente con los niveles alcanzados en ensayos pre – clínicos de macacos vacunados con este esquema y posteriormente desafiados (**Capone et al., 2010**).

Este trabajo es el resultado de varios años de investigación y de ensayos de inmunización y desafío en el modelo murino (**Hill et al., 2010; Sebastian and Gilbert, 2016**). En el caso del *Plasmodium sp.*, la respuesta T CD8⁺ es importante ya que este parásito presenta una fase hepática en su ciclo de vida y los hepatocitos son capaces de procesar antígenos del patógeno y presentarlo al sistema inmune en el contexto del CMH I. Este mecanismo de presentación antigénica está ausente en *Babesia sp.*, dado que los eritrocitos son anucleados y no pueden presentar antígenos del patógeno por ninguna vía.

A modo de resumen, la Tabla 2 muestra los esquemas de inmunización “*prime –boost*” para diferentes enfermedades infecciosas humanas y el cáncer que actualmente están en fases clínicas.

Tabla 2 Vacunas basadas en vectores virales y ADN con sus respectivos esquemas de inmunización contra enfermedades infecciosas humanas y cáncer					
Inmunógenos utilizados en los esquemas	Patógeno blanco	Antígeno utilizado	Detalle de los inmunógenos	Desarrollado por:	Fase Clínica
HAdV5 - HAdV-5	<i>P. falciparum</i> , agente causal de la Malaria	CSP y AMA1	Delección de genes <i>e1, e3, e4</i>	NMRC y GenVec	I/IIa
AdCh63 - MVA		ME - TRAP y AMA -1	Vectores monoclonales	Univ. Oxford y Okairos	
HAdV - 35		CSP	-	Cruce	
MVA	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	85 A	BCG - MVA conteniendo 85A	Univ. Oxford y BioSolution	IIb (Sudáfrica)
HAdV - 35		85 A, 85 B y 10.4	Antígenos de fusión; Prime con BCG	Aereas y Cruce	
MVA	Virus de la Influenza A	NP y M1	Antígenos de fusión	Univ. Oxford	I
HAdV - 5	Virus de la Influenza	NP	Administración intranasal	GenVec	I
Flavivirus YFV - 17	NVD	preM - env	Cepa NY99	Sanofi Pasteur (SP)	II
	Virus del Dengue 1 y 4		Cepas PULO - 359 y 218; PaH188 y 1228		
	Virus de la encefalitis japonesa		Cepa SA - 14 - 14-2		
DNA - NYVAC	HIV - 1	Gag - Pol - Env y Nef	Clado C	EuroVacc	I
DNA - HAdV - 5		Gag - Pol - Env	Delección de genes <i>e1, e3, e4</i>	VRC, NIAID (NIH) y GenVec	II
DNA - MVA		gp 160 y gp120	Clado B	GeoVAX	IIa
ALVAC conteniendo el gen gp-160 y gp 120 del virus de HIV -1	Cáncer	Gag - Pol - Nef	ALVAC - HIV prime; AIDS-VAC-gp120 boost	SP y Global Solutions	III
HAdV - 5 y HAdV - 6		CEA (pncarcinoma)	MRKAd5 y MRAd6, ambas multigénicas	Merck	I
VACV y ALVAC con y sin FPV		5T4 (tumores sólidos)	Vector que co-expresa B7.1, ICAM1 y LFA3	NHI	I/III
MVA	Cáncer de próstata, renal y colorectal	MUC -1	TroVax	Oxford Biomedica	I - III
MVA	Cáncer de pulmón	MART1	Vector TG4010 que co-expresa IL - 2	Transgene S.A	IIb
Lentivirus	Melanoma	NS3, NS4 y NS5	Inmunoterapia TCR	Caltech y UCLA	I
HAdV - 6 y AdCh3	Virus de la Hepatitis C		Antígeno de fusión	Univ. Oxford y Okairos	I

En esta tabla se resumen las vacunas basadas en vectores virales que han sido desarrolladas hasta el momento contra varias enfermedades infecciosas y el cáncer. Esta información ha sido tomada de **Draper et al., 2010** y la traducida al castellano para este trabajo.

En cuanto al desarrollo de candidatos vacunales basados en vectores virales para enfermedades que afectan el ganado bovino, se han realizado ensayos de inmunización en bovinos con el adenovirus HAdV-5 que expresa la proteína mayoritaria de la cápside del Virus de la Fiebre Aftosa observándose inmunidad protectora a los 7 días de la inmunización con este vector recombinante (**Pena et al., 2008**). Por otro lado, se han realizado ensayos de inmunización con los virus recombinantes MVA y HAdV5 contra *Mycobacterium bovis*, agente etiológico de la tuberculosis bovina. Ambos vectores expresan el antígeno 85A de *M. bovis* y resultaron ser efectivos cuando fueron administrados como “boost” luego de una primera inmunización con la vacuna BCG (*bacillus* Camette – Guérin) bovina (**Minassian et al., 2008; Vordermeier et al., 2009; Vordermeier et al., 2006**).

Los numerosos resultados obtenidos hasta el momento de vacunación con inmunógenos basados en vectores virales, dan cuenta de un creciente interés en el campo de la vacunología por el desarrollo y eventual uso para combatir enfermedades humanas y veterinarias. A la fecha, la babesiosis bovina continúa siendo un grave problema para la economía ganadera tanto en Argentina como a nivel mundial. El desarrollo de vacunas de nueva generación, que sustituyan las de actual uso, contribuiría favorablemente a tener un mejor control de esta enfermedad. El presente trabajo está orientado a la evaluación de candidatos vacunales contra *B. bovis* a fin de que se puedan generar nuevas herramientas para la prevención de la babesiosis bovina.

2 Hipótesis y objetivo general

La hipótesis de trabajo fue la siguiente:

“La estrategia de inmunización con distintas plataformas antigénicas que expresan un multiantígeno de Babesia bovis permitirá inducir una respuesta inmune específica y racionalmente direccionada a la producción de anticuerpos y citoquinas del perfil Th1 necesarias para conferir protección frente al parásito”.

Teniendo presente esta hipótesis de trabajo, el objetivo general fue:

Desarrollar una estrategia vacunal contra *Babesia bovis* de diseño racional utilizando diferentes plataformas antigénicas basadas en vectores virales y proteínas recombinantes que expresan un multiantígeno de este parásito.

2.1 Objetivos específicos

- Desarrollar candidatos vacunales basados en vectores virales no replicativos y proteínas recombinantes que codifiquen para un multiantígeno (MABbo) conteniendo epitopes B y T de las proteínas MSA-2c, RAP-1 y HSP20 de *B. bovis*.
- Caracterizar a nivel molecular los candidatos obtenidos.
- Evaluar la inmunogenicidad en el modelo murino de estos candidatos vacunales en esquemas de inmunización “*prime-boost*”.

3 Materiales y métodos.

3.1 Cepas utilizadas y medios de cultivo bacterianos.

En el presente trabajo se utilizaron las cepas competentes químicas de *Escherichia coli* Top10' y DH5 α para la producción de ADN plasmídico y las cepas BL21 (DE3) y BL Ai para la expresión de proteínas recombinantes. Todos los cultivos bacterianos se realizaron en medio LB. En el caso de los medios LB líquidos, la agitación fue de 200 rpm a una temperatura controlada de crecimiento de 37°C. Los cultivos se agitaron en tubos de ensayo o en *erlenmeyers* de 100, 500, 1000 y 2000 mL cuidando que el volumen total de cultivo no supere el 15% de la capacidad total del recipiente. En el caso de los medios de cultivo semisólido se agregó 1,5 grs de Bacto - agar (BD, Biosciences) por cada 100 mL de LB líquido. Cuando fue necesario seleccionar las bacterias transformadas, se utilizaron las siguientes concentraciones de antibiótico: Ampicilina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Estreptomicina 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los clones bacterianos se conservaron tomando un volumen del cultivo en fase estacionaria, se les agregó glicerol estéril al 50% y se los almacenó en *freezer* a -80°C.

3.2 Líneas celulares, cultivos primarios y medios de cultivo celular.

Se emplearon las líneas celulares HEK 293A, BHK-21 y PK-15 (todas provenientes de la *American Type Culture Collection*, ATCC[®]). Estas líneas fueron provistas por la Sección de Cultivos Celulares del Instituto de Virología del INTA – Castelar.

El medio de crecimiento utilizado fue D – MEM (Invitrogen) suplementado con 10% de SFB (Natocor, Argentina), L-glutamina 100 mM (Sigma – Aldrich), A/A 100 mM (Difco) y aminoácidos no esenciales 100 mM. El medio de mantenimiento utilizado fue E – MEM, suplementado con 2% de SFB y A/A 100 mM.

En este trabajo también se utilizaron Fibroblastos de Embrión de Pollo (FEP) preparados a partir de huevos embrionados de 10 – 11 días provistos por el Instituto Rosenbusch bajo certificación de libres de patógenos específicos. Este cultivo primario se mantuvo en medio Earle 199 1X (Gibco) suplementado con 2,95 mg/mL de caldo triptosa fosfato (Difco), 2,2 mg/ml de bicarbonato de sodio, 0,3 mg/mL de L-glutamina (Gibco), 10% de SFB, 50 µg/ml de gentamicina, 66 µg/mL de estreptomina y 100 U/ml de penicilina. Como medio de mantenimiento se utilizó medio 199 1 X (Gibco) suplementado con 2% de SFB, A/A 1X (Gibco), Hepes (ácido 4-(2-hidroximetil)1-piperazin-etán-sulfónico, Sigma) 25 mM pH: 7,5.

3.3 Cultivos primarios de Fibroblastos de Embrión de Pollo, FEPs.

Para la obtención de los FEPs, se partió de huevos embrionados. Primeramente, los huevos son desinfectados con etanol 70% y los embriones se extrajeron con pinzas y se depositaron, decapitados, en un vaso de precipitado estéril con solución de PBS'a' (sin agregado de Ca^{+2} ni Mg^{+2}).

Luego, se envisceraron y para lavar el tejido remanente se depositaron en un vaso de precipitado con PBS'a'. Los embriones se disgregaron con una jeringa de 20 mL en un *erlenmeyer* cruz de malta conteniendo 100 ml de PBS'a' y se colocó en agitación durante 2 min.

Se descartó el sobrenadante y se agregó al *pellet* el doble de volumen de Tripsina 0,05% (Gibco) precalentada en solución PBS'a'. Nuevamente, se agitó durante 2 min, se dejó sedimentar y se descartó el sobrenadante. Se repitió la tripsinización y se agitó durante 4 min. Posteriormente, el sobrenadante se filtró a través de una gasa y se neutralizó la tripsina por el agregado de suero fetal bovino. Se repitió la tripsinización del sedimento restante hasta que sólo un residuo gelatinoso fue visible en el fondo del frasco. Los sobrenadantes recolectados se centrifugaron durante 5 min a 366 g. El *pellet* se resuspendió con 100 mL medio de crecimiento precalentado y se agitó durante 15 min. La suspensión celular se filtró a través de un colador de acero inoxidable de malla fina. Para contar las células en la cámara de *Neubauer* se tomó una alícuota y se diluyó (1/100) con solución de azul tripán 0,5%. Finalmente, los FEPS se sembraron en placas de petri de 60 mm, p60, (GBO) o en botellas de cultivo T – *Flasks* de 25, 75 o 175 cm² (GBO) y se incubaron durante 24 h a 37°C en estufa gaseada conteniendo 5% de CO₂.

3.4 Animales

Se utilizaron ratones machos *Mus musculus* de la cepa BALB/c AnN de 6 a 8 semanas de edad libre de patógenos específicos. Los animales fueron adquiridos en el Bioterio de la Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

En todos los experimentos en los que se usó esta cepa, el cuidado y mantenimiento de los animales se realizó en el Bioterio del Instituto de Biotecnología del CICVyA – INTA, Castelar.

Para la obtención de suero policlonal α – HSP20 se utilizaron conejos machos, raza neozelandesa de 8 semanas de edad, adquiridos en el criadero “La pureza” situada en el municipio de Morón, Buenos Aires.

El cuidado y la manipulación así como también los protocolos de inmunización y sacrificio de estos animales se realizaron respetando las normas internacionales vigentes bajo la supervisión del CICUAE – CICVyA (protocolo N° 22/2011 con sucesivos pedidos de repetición del mismo aclarando los cambios realizados).

3.5 Virus

En este trabajo se utilizó el virus vaccinia Ankara modificado *wild type* (wtMVA) para la construcción de un virus recombinante que expresa el multiantígeno (MABbo) de *B. bovis* (rMVA). El wtMVA fue cedido por el laboratorio de Virus Animales del Instituto de Biotecnología del CICVyA, INTA – Castelar.

La obtención y propagación tanto del wtMVA como del rMVA se realizaron en monocapas de cultivos primarios de FEPs y en células BHK-21.

En algunos experimentos se utilizó el adenovirus humano atenuado, serotipo 5, que expresa el MABbo de *B. bovis* (rAd). Además, se utilizó el adenovirus que expresa la proteína heteróloga *GFP* (denominado aquí como wtAd).

Este virus fue cedido por la Dra. Alejandra D'antuono del Instituto Milstein – CONICET. La obtención y propagación de los adenovirus se realizaron en monocapas de células HEK 293A.

3.6 Plásmidos y clonado de fragmentos génicos.

Para obtener los fragmentos génicos codificantes de las proteínas de *B. bovis* seleccionadas, se realizaron tres *PCRs* por separado. Para ello se diseñaron cebadores específicos basados en regiones flanqueantes a las secuencias previamente identificadas que contienen epítopes B y/o T CD4⁺ de cada antígeno en cuestión y que además incluían sitios de restricción específicos para cada fragmento (**Tabla 1**). Para la selección de los sitios de restricción se verificó previamente su ausencia dentro del fragmento génico correspondiente.

Como templado de *msa-2c* (nucleótidos del 19 al 675; número de acceso en *GeneBank* AY052542.1) y *rap-1* (nucleótido 64 al 708; número de acceso en *GenBank* AF030062.1) se partió de ADN genómico de cultivo de la cepa R1A de *B. bovis*, obtenido según (**Wilkowsky et al., 2003**), mientras que para la secuencia de *hsp20* (nucleótido 1250 al 1318 y de 1471 al 1917; número de acceso en *GenBank* AF331455.1) se utilizó como templado ADNc obtenido a partir de ARN total y posterior amplificación por RT – PCR, según (**Norimine et al., 2004**) ya que *hsp20* es un gen que contiene intrones. Los productos de amplificación se clonaron por separado en el plásmido pCR2.1-TOPO-TA™ (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la obtención del gen quimérico MABbo se fusionaron las secuencias de *msa-2c*, *rap-1* y *hsp20* por sucesivos sub-clonados utilizando los sitios de restricción de manera de lograr una secuencia en un único marco de lectura. Así, primero se ligaron *msa-2c* a *rap-1* y luego se le agregó a esta fusión, el fragmento de *hsp20*. La correcta orientación en cada etapa del subclonado se confirmó por PCR. Finalmente, el plásmido conteniendo los 3 fragmentos denominado TOPO - MABbo se secuenció para confirmar la identidad del gen quimérico. La **Figura M.1** muestra un esquema de la construcción final del MABbo.



Figura M.1. Representación esquemática de la fusión de los tres antígenos de *B. bovis*. Esta construcción es el multiantígeno, MABbo.

- El MABbo también fue posteriormente subclonado en el vector Topo TA Cloning Gateway, pCR®8/GW/TOPO® (Invitrogen).
- Para la expresión de las proteínas recombinantes, se utilizaron los vectores de expresión pRSET® en sus versiones A, B o C según correspondiera al marco de lectura de cada una de las 3 proteínas y el plásmido pDEST17® para el MABbo completo (ambos de Invitrogen).
- Para la generación del virus MVA recombinante se utilizó el vector de transferencia denominado VTM-TKGUS (**Figura M.2**).

El gen quimérico que codifica para el MABbo fue primeramente amplificado por *PCR* con nuevos cebadores (llamados *MABbo F* y *MABbo R*) utilizando como templado el vector TOPO – MABbo, previamente obtenido. Luego, el amplicón fue clonado nuevamente en otro vector de clonado de tipo TOPO. Finalmente se escindió el fragmento del MABbo con la enzima de restricción *NheI* (Promega) para luego ligarlo al vector linealizado con la misma enzima presente en el sitio de clonado múltiple del VTM-TKGUS. Este vector es un plásmido desarrollado previamente en nuestro Instituto (**Ferrer *et al.*, 2007**) y cedido por el Laboratorio de Virus Animales dirigido por la Dra. Gabriela Calamante. El vector porta las secuencias homólogas al gen que codifica para la timidina quinasa viral (TK), un gen no esencial que será el blanco de inserción del gen heterólogo en el genoma de MVA. Esta secuencia se encuentra interrumpida por un “*cassette* de clonado” y el *cassette* de expresión del gen marcador *uid A* (codifica para la enzima β - glucuronidasa bacteriana, GUS).

El *cassette* de clonado comprende el promotor temprano tardío sintético pE/L de poxvirus, un sitio de clonado múltiple y regiones terminadoras de la transcripción de poxvirus, donde se clonarán los genes que codifican para el multiantígeno.

- Para la generación del Adenovirus recombinante se utilizó el vector pAd/CMV/V5-DEST™ (Invitrogen).

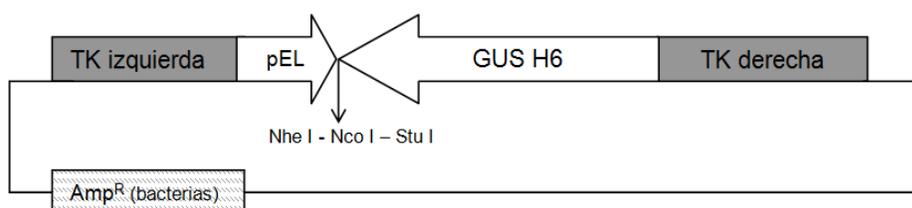


Figura M.2. Vector de transferencia VT-MTK-GUS. A izquierda y derecha se muestran las secuencias flancos del gen que expresa la Timidina Kinasa viral (TK). Las flechas indican el sentido de la transcripción desde los promotores. El esqueleto del plásmido corresponde al vector pBluescript.

3.7 Oligonucleótidos iniciadores o cebadores.

En la Tabla 1 se muestra la lista de cebadores utilizados para este trabajo.

Cebador	Enzima	Secuencia nucleotídica	Tf (°C)	Fuente
<i>msa-2c</i> F	<i>Bam</i> H1	TTC <u>GGA TCC</u> ATG GTG TCT TTT AAC ATA	49.3	Wilkwo et al., 2003
<i>msa-2c</i> R	<i>Pst</i> I	<u>GGG GCT</u> CAA ATG CAG GAG AAC GAA GTA G	52.5	
<i>rap-1</i> F	<i>Pst</i> I	<u>CTC TAG</u> GGG ATG CTT CGC ACA ATC AGA GAG TA	62.8	Este trabajo
<i>rap-1</i> R	<i>Eco</i> RI	<u>CTA TAG</u> GGG GAT GCT TTC GCC ACA ATC AGA	65.3	
<i>hsp20</i> F	<i>Eco</i> RI	<u>CCG ATA</u> <u>TCC</u> TCG ATG CAA CAA CGC CGA	64.2	
<i>hsp20</i> R	<i>Pst</i> I	<u>CTA TAG</u> CTG CAG AAT CTG AAC GCG GCG CAT C	64.4	
<i>MABbo</i> F	<i>Nhe</i> I	GGG <u>GCG</u> <u>CTA</u> <u>GCA</u> TGA TAA CCG TTG CA	65.0	
<i>MABbo</i> R	<i>Nhe</i> I	GGG <u>CGA</u> <u>TCG</u> TTA GAC TTG CGC CGT	69.3	
<i>TK</i> 1	<i>Sac</i> II	TCC <u>CCG</u> <u>CGG</u> TGA ACG GCG GAC ATA TTC	67.6	Ferrer et al., 2007
<i>TK</i> 4	<i>Kpn</i> I	GGG <u>GTA</u> <u>CCT</u> TAT GAG CCG ACG TAA CA	61.7	

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación, escritos en sentido 5'→3'. En negrita se señalan los codones de iniciación ATG. Los nucleótidos subrayados corresponden al sitio de restricción de la enzima de restricción correspondiente. En los cebadores *reverse*, el sitio marcado es la secuencia de restricción complementaria. Tf: Temperatura de fusión.

3.8 Antisueros y anticuerpos

En este trabajo se usaron los siguientes antisueros y anticuerpos:

Suero α - MSA-2c. Es un antisuero policlonal bovino contra la proteína recombinante y fue descrito previamente (**Wilkowsky *et al.*, 2003**).

Anticuerpo α - RAP-1. Es un anticuerpo monoclonal contra el péptido PTKEFFREA, cedido por el Dr. Carlos Suárez y previamente descrito (**Suarez *et al.*, 1993**).

Suero α - HSP20. Es un antisuero policlonal hecho en conejo y obtenido para este trabajo. Para ello, se inmunizaron dos conejos al día 0 con una dosis de 50 μ g/conejo de la proteína HSP20 purificada en adyuvante completo de Freund (Sigma – Aldrich), por vía subcutánea y 15 días después se le administró la misma dosis en adyuvante incompleto de Freund. Quince días después de la última inmunización, los animales fueron sangrados por anestesiados y luego sangrados por punción cardíaca para la obtención de sangre. El suero colectado se guardó a -20°C hasta su uso.

Los sueros de bovinos natural y experimentalmente infectados con *B. bovis* fueron cedidos gentilmente por el laboratorio de Inmunología de la EEA – INTA Rafaela y previamente analizados por ELISA indirecto.

3.9 Técnicas de biología molecular para la obtención del ADN recombinante

Las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo se realizaron según lo descrito en el libro *Molecular Cloning* de (Sambrook *et al.*, 1989). Estas técnicas incluyen minipreparaciones de ADN plasmídico, digestión con enzimas, desfosforilación de los vectores linealizados, ligación, transformación de bacterias competentes y *PCR/ Colony PCR*.

Las enzimas de restricción, la enzima ligasa correspondiente al fago T4 y la *Taq* ADN polimerasa lo mismo que sus correspondientes *buffers*, fueron utilizadas según especificaciones del fabricante (Promega).

3.9.1 Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*)

Para la amplificación de los fragmentos génicos correspondientes, las reacciones de *PCR* se realizaron en un volumen final de 50 μ l. La mezcla de reacción y los perfiles de ciclados se detallan a continuación. La temperatura de fusión (T_f) para la hibridización de los ácidos nucleicos se detalla en la **Tabla 1**.

ADN molde	200 ng	Desnaturalización inicial	95° C, 10'	1 ciclo
Primer F	1 μ l	Desnaturalización	94° C 1'	35 ciclos
Primer R	1 μ l	Alineamiento	55 - 65° C, 45''	
dNTPs (200 μ M)	4 μ l	Extensión	72° C, 1' 30''	
<i>Taq</i> Pol. (5 U)	0,5 μ l	Extensión final	72° C, 10'	1 ciclo
Buffer 5X	10 μ l			
Agua dd csp	50 μ l			

El producto de *PCR* se analizó en un gel de agarosa al 0,8% en *buffer* TAE 1X (Tris acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a 5 – 10 V/cm. Luego, el gel se tiñó con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio y se expuso en un transiluminador de luz UV. Otra alícuota de la *PCR* de 5 µL se utilizó para realizar las respectivas ligaciones en los vectores Topo – TA Cloning™ (Invitrogen). El total de la ligación se utilizó finalmente para transformar bacterias competentes *E. coli*.

El análisis de los clones recombinantes mediante *Colony PCR* se realizó según las siguientes condiciones: para 25 µL finales de mezcla de reacción se utilizó como templado 5 uL de la suspensión bacteriana del clon que fue retirado de la placa de transformación y previamente hervido a 100°C durante 5 min. La mezcla de reacción final contenía *buffer* de la *Taq* polimerasa 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 200 µM, 5 U de la enzima *Taq* ADN polimerasa y agua estéril en c.s.p 25 µL. En el control negativo de cada *PCR* no se incluyó el templado para asegurar la ausencia de contaminación y en su lugar se adicionó agua ultra pura.

3.9.2 Electroforesis en geles de agarosa.

Se utilizaron geles de agarosa en concentración 0,8% - 1 %. La electroforesis se realizó en *buffer* TAE 1X (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a temperatura ambiente y a un voltaje 5 – 8 V/cm. Para visualizar las bandas de ADN, se adicionó 0,5 µg/mL de Bromuro de Etidio a la preparación del gel. Para sembrar las muestras, se utilizó el *buffer* de siembra en concentración 10X (glicerol 50%, TAE 5X, azul de bromofenol 1%).

Los geles se fotografiaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta y se digitalizaron utilizando el equipo GelDoc (BioRad) y el software *Quantity One 1-D Analysis Software* (versión 4.6.3) provisto por el fabricante.

3.9.3 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Las bandas de ADN resueltas mediante geles de agarosa se escindieron del gel y se purificaron utilizando el kit "*Qiaex II purification system*" (QIAGEN). El ADN obtenido se resuspendió en buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.9.4 Reacciones de ligado molecular

Para el ligado molecular de los diferentes insertos a los plásmidos correspondientes, considerando en todos los casos 50 ng de vector como masa final, se utilizaron dos relaciones molares vector: inserto (1:1 y 1:3). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl, adicionando los volúmenes correspondientes a 50 ng de vector y su correspondiente masa de inserto según corresponda, 1ul de *buffer* de ligado en concentración 10X, 10 U de la enzima T4 ADN ligasa (Promega) y agua hasta llegar a volumen final. La reacción se incubó a 16 °C toda la noche, incluyendo un control de vector sin inserto.

3.9.5 Transformación de bacterias *E. coli*

Las bacterias *E. coli* cepa Top10' y DH5 α para la producción de ADN plasmídico y las cepas BL21 (DE3) y BL Ai para la expresión de proteínas recombinantes se hicieron químicamente competentes para la transformación mediante el método de Hanahan, 1985 y se mantuvieron congeladas en alícuotas a -80 °C hasta su uso. Al momento de la transformación, se descongelaron en hielo y a 50 μ l de bacterias se les agregaron todo el producto de ligación, se mezcló suavemente y se incubó en hielo 45 minutos. A continuación, se realizó un choque térmico a 42 °C por 90 y se dejó en hielo por 2 min adicionales. Luego, se agregaron 200 μ l de medio LB, se incubó a 37 °C con agitación suave durante 45 min y finalmente se sembró en placas conteniendo medio LB - Agar con el antibiótico correspondiente al gen de resistencia de cada vector utilizado.

Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche, luego de lo cual se picaron las colonias crecidas que se usaron posteriormente para inocular cultivos de 3 mL de LB con antibiótico.

3.9.6 Minipreparaciones de ADN

Se utilizó el método de **Birnboim & Doly, 1979** con algunas modificaciones. Se partió de 3 ml de cultivo de bacterias en medio LB con antibiótico, cultivadas toda la noche a 37 °C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10.000 x g en una microcentrífuga de mesa (Eppendorf) y se resuspendieron en 300 μ l de Solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM).

Luego, se agregaron 300 μ l de Solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1 %), se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 400 μ l de Solución III (acetato de potasio 5 M) y se mezcló por inversión. El floculado se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min, se tomó el sobrenadante libre de floculado y se traspasó a un tubo de microcentrífuga limpio, donde se precipitó el ADN plasmídico por el agregado de 1 volúmen de isopropanol y centrifugación a 10.000 x g durante 10 min y a 4°C. Se lavó el precipitado con etanol 70 %, se secó a 37°C y finalmente se resuspendió en 50 μ L de agua con ARNasa (100 μ g/mL). Para verificar la presencia, integridad y orientación de los diferentes insertos en cada estrategia de clonado, se digirieron de 5 μ L de esta solución con las enzimas de restricción apropiadas. Para la preparación de ADN plasmídico de alta calidad que luego fueron utilizados para la secuenciación o para transfección de células, se usaron los kits comerciales *Wizard Minipreps* (Promega) y *Plasmid Mini* y *Plasmid Midi* (Qiagen). En general, el ADN se resuspendió en 100 μ l de agua bidestilada estéril con un rendimiento promedio de 200 - 300 ng/ μ L en el caso de las minipreparaciones y de 1 – 1,5 μ g/ μ L en el caso de las midi preparaciones. Si el plásmido poseía un tamaño mayor a 5 kpb la elución se realizó a 65°C en 500 μ L de agua bidestilada estéril. La concentración de ADN se determinó a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

3.9.7 Secuenciación de ADN

La secuenciación automática de las construcciones generadas en este trabajo se realizó en el Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación Automática (SIGYSA) del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar, mediante la utilización del equipo *Genetic Analyzer 3130x1* (Applied Biosystems).

3.9.8 Obtención de las proteínas recombinantes.

Cada proteína recombinante rMSA – 2c, rRAP-1 y rHSP20 fue obtenida por separado en el vector de expresión procariota pRSET™ (Invitrogen). Este vector contiene la secuencia de 6 histidinas en el extremo N- terminal, lo que permite la purificación de las proteínas recombinantes mediante columna de afinidad de Níquel-agarosa.

Para la expresión del rMABbo, se amplificó su secuencia completa por *PCR* utilizando los cebadores *MABbo F* y *MABbo R* y como templado el TOPO – MABbo descrito anteriormente. El producto de *PCR* fue ligado en el vector Topo TA Cloning Gateway, pCR®8/GW/TOPO® (Invitrogen) y posteriormente se transformaron bacterias *E. coli* DH5α para luego realizar el correspondientes *screening* de los clones positivos.

Una vez confirmada la identidad del MABbo por secuenciación utilizando cebadores tanto del vector como internos del mismo multiantígeno, el mismo fue clonado por recombinación en el vector procariota de expresión Gateway® pDEST™17 Vector (Invitrogen).

3.9.9 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes en *E. coli*

Para la expresión de las proteínas recombinantes rMSA-2c, rRAP-1 y r HSP20 de *B. bovis*, se utilizó el sistema pRSET(A, B o C)[™]/*E. coli* BL21 (DE3)[™] de Invitrogen. En este sistema, la expresión del gen de interés se encuentra regulada por el promotor procariota fuerte del bacteriófago T7. La cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) porta el bacteriófago lisogénico λ DE3 que contiene el gen *lacl*, el gen que codifica para la ARN polimerasa del bacteriófago T7 bajo regulación del promotor *lacUV5* y una porción del gen *lacZ*. El represor *lac* reprime la expresión de la ARN polimerasa T7 pero ante el agregado de IPTG se induce la expresión de la ARN polimerasa, la cual se une al promotor y se transcribe el gen de interés.

El otro sistema de expresión utilizado para la obtención del multiantígeno recombinante rMABbo fue el Gateway® pDEST[™]17 Vector/ *E. coli* BL21 AI[™] (Invitrogen). La cepa bacteriana *E. coli* BL21 AI posee el gen que codifica para la T7 RNA polimerasa ubicado río arriba del promotor *araBAD* inducible por Arabinosa.

Con una colonia aislada de cada pRSETA[™]/*E. coli*[™] BL21 – rMSA-2c, pRSETC[™]/*E. coli*[™] BL21 – rRAP-1, pRSETC[™]/*E. coli* BL21[™] – rHSP20 o pDEST[™]17/ *E. coli* BL21 AI[™] - rMABbo se realizó un cultivo en 5 mL de LB – Ampicilina 50 µg/ml, a 37°C ON, que sirvió como cultivo *starter*.

Al día siguiente, con los 5 mL de cultivo *starter* se inocularon por separado para la inducción de cada proteína un volumen de 250 mL de medio LB – Ampicilina 50 µg/ml (dilución 1/50).

Cuando la DO_{600nm} del cultivo llegó a 0,4 – 0,5 se le agregó 100mM de IPTG o 0,2% de Arabinosa (Sigma – Aldrich) estéril según correspondiera, para inducir la expresión de la proteína recombinante y se mantuvo en agitación durante 4 hs más. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 17210 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 4 mL de buffer de extracción (Tris HCl 100 mM, NaCl 1M, Glicerol 20%, Tween 20 1%, Imidazol 20 mM) durante 2 horas a 4°C y en agitación suave. Posteriormente se centrifugó a 11952 g durante 30 minutos a 4°C. Tanto el pellet como el sobrenadante se guardaron a -20°C para determinar la localización de las proteínas en cuestión ya sea que estuvieran la fracción soluble o en cuerpos de inclusión mediante análisis de SDS-PAGE.

La proteína rMSA-2c se localizó en la fracción soluble del sobrenadante de la extracción mientras que rRAP-1, rHSP20 y rMABbo debieron ser solubilizadas de los cuerpos de inclusión con Urea 8 M en buffer de extracción, durante 2 hs a 37°C.

Los sobrenadantes de cada proteína se incubaron por separado con 2 mL de la resina Ni-Agarosa (Probond, Invitrogen) en agitación suave y a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación, se volcó la suspensión en una columna de vidrio. Seguidamente, el percolado se descartó y la resina se lavó con 10 volúmenes de buffer de lavado (Tris HCl 100 mM, NaCl 500 mM, Glicerol 20%, Tween 20 1%). Finalmente la proteínas se eluyeron con *buffer* de elución (Tris HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Glicerol 20%, Tween 20 1%) agregando concentraciones crecientes de Imizadol (250mM, 500mM y 1M respectivamente).

La concentración de la proteína en las fracciones eluídas se cuantificó por medio de una curva estándar de seroalbúmina bovina utilizando el kit *Micro BCA Protein Assay Reagent* (Pierce). Las fracciones eluídas se guardaron a -20°C hasta su uso como antígenos en ensayos de inmunización con ratones y para titulación de anticuerpos en ELISA indirecto.

3.9.10 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, SDS – PAGE

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida de concentraciones 10, 12 y 15 %, dependiendo del tamaño de la proteína de interés a ser visualizada. El grado de entrecruzamiento acrilamida:bisacrilamida utilizado fue 29:1. Se utilizaron minigeles de 6 x 9 cm (Miniprotean III, Biorad), los cuales fueron sometidos a una corriente constante de 100 V en *buffer* Laemmli 1X (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 %).

3.9.11 Tinción de proteínas en SDS- PAGE con colorante *Coomassie blue*

Los geles de poliacrilamida se incubaron en una solución del colorante azul *Coomassie blue* 0,05 % [*Coomassie Brilliant Blue* R250 0,05% (Sigma – Aldrich), metanol 21 %, ácido acético 7 %] por 1 a 2 h con agitación suave.

Se retiró la solución de tinción y se decoloró el exceso de colorante por incubación, con agitación suave, con solución de lavado (metanol 21 %, ácido acético 7 %).

3.9.12 Electrotransferencia de las membranas de nitrocelulosa

Luego de la electroforesis, los geles de poliacrilamida fueron electrotransferidos en el *buffer* apropiado (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, metanol 20 %). Para ello, se cortaron rectángulos de nitrocelulosa (GE Healthcare) de tamaño algo mayor que el de los geles y se hidrataron durante 5 min. Se dispuso sobre la cara del *cassette* de transferencia correspondiente al electrodo negativo (Bio-Rad): una esponja de tipo *Scotch Brite* (Bio-Rad), un papel de filtro *Whatmann* 3 mm, el gel de poliacrilamida, el filtro de Nitrocelulosa, un papel de filtro *Whatmann* 3 mm y una esponja del tipo *Scotch Brite*. Los *cassettes* se montaron dentro de la cuba de transferencia (Bio-Rad), se llenó con *buffer* de transferencia y se transfirieron las proteínas de los geles a los filtros de nitrocelulosa aplicando una corriente constante de 200 mA durante 2 horas.

3.9.13 Detección inmunológica de las proteínas por WB

Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo (PBS 1X, Tween - 20 0,05 %, leche descremada 5 %). Luego, se lavaron con PBS - Tween y se incubaron con diluciones apropiadas de los anticuerpos específicos en PBS 1X-Tween-leche 3 % [1:3000 para el anticuerpo monoclonal anti – his (Amersham), 1:3000 para el anticuerpo monoclonal de ratón α – RAP-1, 1:2000 para el suero de conejo α – HSP20, 1:2000 para el suero de bovino α – MSA-2c]. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se lavaron las membranas tres veces con solución de lavado PBS 1X -Tween por 10 min y se incubaron con el segundo anticuerpo en PBS 1X –Tween - leche 3 % [1:10000 para el anticuerpo de cabra anti-ratón

conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Sigma - Aldrich), 1:10000 para el anticuerpo de cabra anti- conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Sigma - Aldrich), 1:10000 para el anticuerpo de cabra anti – bovino conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Sigma – Aldrich)]. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se lavaron las membranas tres veces con solución de lavado por 10 min, una vez con el buffer de revelado de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM) por 10 min y se agregaron 5 ml de solución de revelado [10 ml de buffer de revelado, 66 µl de *Nitro blue tetrazolium* (NBT, 50 mg/ml en dimetilformamida 70 %, Promega) y 33 µl de bromo-cloro-indoil-fosfato (BCIP, 50 mg/ml en dimetilformamida 100 %, Promega)].

Se incubó con agitación suave por 10 min en oscuridad, hasta visualizar las bandas. La reacción de revelado se detuvo por lavados con agua y las membranas se secaron y se resguardaron de la luz.

3.10 Técnicas para la obtención de los virus recombinantes

3.10.1 Obtención del virus recombinante MVA (rMVA) que expresa el multiantígeno MABbo de *Babesia bovis*.

3.10.1.1 Transfección/infección de FEPs.

Con el fin de obtener el virus recombinante que expresa el MABbo de *B. bovis*, se infectó una monocapa de cultivo primario de FEPs, crecidas en botellas tipo *flask* – T 25 cm² con una confluencia del 80%, con 200 μ l de virus MVA a una multiplicidad de infección de 0.05. Para permitir la adsorción del virus a las células, se incubaron durante 2 hs a 37°C y CO₂ 5% (con agitación suave durante 15 min). Posteriormente se agregaron 300 μ l de medio 199 – 2% SFB y se mantuvieron en las mismas condiciones.

Mientras tanto, en un tubo de microcentrífuga se incubaron 30 μ l de Lipofectina (Invitrogen) con 170 μ l de medio 199 durante 30 min a temperatura ambiente. En otro tubo de microcentrífuga se diluyó el vector VT-MTKGUS-MABbo de manera de obtener 10 μ g finales en 50 μ l de medio 199. Para favorecer la formación del complejo ADN – Lipofectina, se incubó el tubo durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó un volumen más de medio hasta llegar a los 500 μ l totales.

Se retiró el medio de infección en las FEPs, se lavaron 2 veces con medio 199 y se agregó la mezcla de ADN-Lipofectina a la botella, se incubó a 37°C, CO₂ 5% durante 2 hs y se agregaron 0,3 mL de medio 199 conteniendo 2% de SFB por botella.

Transcurrido ese tiempo, se descartó el medio de transfección, se agregaron 2 mL de medio 199 – 2%SFB y se incubó durante 4 – 5 días post-infección. Pasado este tiempo, se cosechó la monocapa junto con el sobrenadante para realizar el *screening* de los recombinantes.

Para realizar el *screening* de los virus recombinantes que expresan la enzima GUS, se realizaron infecciones del sobrenadante anterior en placas de 60 mm de diámetro (p60) considerando diluciones de 1/5 – 1/10 durante 4 -5 días. Pasado este tiempo, se retiró el medio líquido y se agregó el sustrato X-Gluc (Invitrogen) 1X en medio semisólido que se preparó mezclando volúmenes iguales de medio D - MEM 2X conteniendo SFB 4%, Hepes 50 mM y A/A 2X precalentado a 37°C y de agarosa de bajo punto de fusión 1,4%, fundida y precalentada a 42°C (*overlay*). Las placas se incubaron 48 - 72 hs más hasta la visualización de placas de lisis azules (**Figura M.3**).

Utilizando *tips* con filtro se picaron algunas placas de lisis azules en 500 µl de medio 199 y se realizaron 3 ciclos de congelado (-70°C) y posterior descongelado (37°C). Con la finalidad de aislar los virus recombinantes, se repitió el clonado viral (se volvió a infectar monocapas de FEPs en placas de p60 con el clon resuspendido en 500 µl de medio 199) nueve veces hasta obtener un *stock* homogéneo, es decir, 100% de placas de lisis azules. Finalmente, se tituló el *stock* homogéneo y se amplificó para su posterior caracterización.

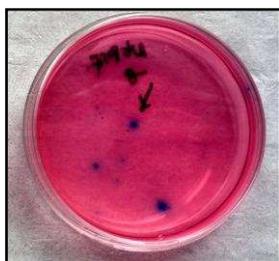


Figura M.3. El *screening* de los MVA recombinantes se realizó por clonado de las partículas infectivas bajo agar y análisis de la expresión del gen marcador *uidA*. Se muestran 1 placa P60 infectada con un stock de rMVA. Cada punto azul corresponde a una placa de lisis de un virus recombinante, teñida con X-gluc.

3.10.1.2 Amplificación del *stock* viral del rMVA.

Monocapas de FEPs en una confluencia del 80% cultivadas en T- *flask* de 25, 75 y 175 cm² se lavaron con medio 199 y se infectaron con 0,5-1,5 mL de virus rMVA a una multiplicidad de infección [unidad formadora de placa (UFP)/célula] de 0,1. Se incubó durante 45 min a 37°C, CO₂ 5% y posteriormente se agregaron 5-35 mL de medio de mantenimiento. Las células se incubaron durante 3-4 días hasta la observación del efecto citopático. Finalmente las células y los sobrenadantes de infección se juntaron y se congelaron a –80°C. Con el propósito de lisar las células y favorecer la liberación del virus, se realizaron 3 ciclos de congelado (-80°C) y descongelado (37°C).

Para la obtención de grandes cantidades de virus, los *stocks* virales se amplificaron en botellas tipo *rollers* de poliestireno de 860 cm² (CellMaster, Greiner Bio-One) conteniendo monocapas de células BHK-21. La infección con virus se realizó a una moi de 0,1. Para ello, se incubó el inóculo viral en durante 30 min a 37°C, 5% CO₂ para facilitar su adsorción y posteriormente se agregó un volumen de medio D-MEM suplementado con 2% de SFB hasta llegar a los 120 - 150 mL respectivamente. El cultivo se mantuvo en rotación constante a bajas rpm durante 72 hs post-infección o hasta observar un efecto citopático típico (monocapa levantada). Finalmente el sobrenadante de cosechó y se realizaron 3 ciclos de congelado (-70°C) y descongelado (37°C).

3.10.1.3 Titulación de los *stocks* virales.

Se realizaron diluciones seriadas al décimo de la suspensión viral. Las monocapas de FEPs 100% confluentes, crecidas en placas p60 se lavaron con medio 199 y se infectaron con 540 μ l de las diluciones virales (rango de dilución: 10^{-1} – 10^{-7}). Luego de 30 - 45 min de adsorción a 37°C, con agitación cada 15 min, los inóculos se descartaron y las monocapas se lavaron nuevamente. Posteriormente, se agregaron 3 mL de medio semisólido. Finalmente se incubó en estufa hasta la visualización de las placas de lisis azules (5 días aproximadamente). El título viral se estimó contando el número de unidades formadoras de placa (UFP) en la dilución viral que permitiera contabilizar entre 30-100 placas de lisis azules / p60 según:

$$\text{UFP/ml} = \text{promedio de placas} / (\text{vol. inóculo} \times \text{dilución}).$$

Dónde UFP: Unidades Formadoras de Placas

3.10.2 Obtención del adenovirus recombinante (rAd) que expresa el multiantígeno MABbo de *Babesia bovis*.

3.10.2.1 Generación del Adenovirus recombinante.

Para la construcción del Adenovirus recombinante se utilizó el sistema *Virapower™ Adenoviral Gateway Expression kit™* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El esquema se muestra en la Figura 3.5 de la Introducción. Brevemente, el sistema se basa en clonar la secuencia de interés en un vector denominado “vector de entrada” para luego sub-clonarlo en el “vector destino”. Este sub-clonado ocurre por recombinación homóloga *in vitro* entre las regiones *Rtt* y *Ltt* de ambos plásmidos de “entrada” y “destino”, flanqueantes a la secuencia de interés.

3.10.2.2 Generación del vector de entrada conteniendo el multiantígeno.

La secuencia del multiantígeno quimérico fue previamente obtenida para la construcción del virus MVA que expresa el MABbo. Para clonar el MABbo en el vector de entrada del sistema adenovirus (Topo TA Cloning Gateway, pCR®8/GW/TOPO®, Invitrogen) se amplificó por *PCR* la secuencia del MABbo utilizando los cebadores MABbo F y MABbo R y como templado el plásmido VT-MTKGUS - MABbo previamente obtenido para el virus rMVA. Las condiciones de la reacción y del ciclado fueron las siguientes:

ADN molde	200 ng
Primer MABbo F	1 µl
Primer MABbo R	1 µl
dNTPs (200µM)	4 µl
Go Taq (2/µl)	0,5 µl
Buffer 5X	10 µl
Agua dd csp	50 µl

Desnaturalización inicial	95° C, 10'	1 ciclo
Desnaturalización	94° C 1'	35 ciclos
Alineamiento	60° C, 45"	
Extensión	72° C, 1' 30"	
Extensión final	72° C, 10'	1 ciclo

El producto de *PCR* se analizó en un gel de agarosa al 0,8% en *buffer* TAE 1X (Tris acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a 5 – 10 V/cm. Luego, el gel se tiñó con 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio y se expuso en un transiluminador de luz UV.

Una vez confirmada la presencia de una única banda reactiva del tamaño esperado, 5 µl del producto de *PCR* se incubaron con 0,7 µl del vector de entrada y 4,3 µl de solución salina a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se transformaron bacterias competentes *E. coli* Top10' (Invitrogen) con los 5 µl de la mezcla de ligación de acuerdo al protocolo estándar de (**Sambrook et al., 1989**). El total de la transformación (55µl) se sembró en placas de Petri conteniendo medio Luria Bertani (LB) - Ampicilina 50 µg/ml.

Al día siguiente de la transformación, se tomaron algunos clones, se cultivaron en 5 mL de LB – Ampicilina y se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico y posterior digestión con la enzima *EcoRI* (Promega) durante 1 h a 37°C. Para verificar la orientación del inserto, se realizó el *screening* de los clones por *Colony PCR* (**Sambrook et al., 1989**) utilizando los cebadores M13 Fw (Invitrogen) y *MABbo R*.

Finalmente, para confirmar la identidad de la secuencia, se secuenciaron dos de los clones positivos en el servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA – Castelar.

3.10.2.3 Generación del vector de expresión para adenovirus.

Para obtener el vector de expresión del MABbo en adenovirus, se llevó a cabo la reacción de recombinación entre el vector de entrada pCR[®]8/GW/TOPO[®] - MABbo y el vector destino pAd/CMV/V5-DEST[™] (Invitrogen). La reacción de recombinación se realizó en un volumen final de 10 µl durante 2 hs a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido dicho tiempo se agregó Proteinasa K (2 µg/µl, Promega) 10 min a 37°C y seguidamente se transformaron bacterias competentes DH5α con el total de la mezcla de recombinación. El producto de transformación se distribuyó en placas de Petri conteniendo LB – Ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se picaron algunas colonias de esta placa y se transfirieron a otras placas conteniendo los antibióticos Cloranfenicol y Ampicilicina.

Aquellos clones que crecieron solamente en placa conteniendo Cloranfenicol (resultando positivos para la recombinación) se analizaron por *Colony PCR*, utilizando cebadores específicos del inserto (**Tabla 1**) y del vector destino.

3.10.2.4 Preparación del plásmido destino para la transfección

Previo a la transfección, el pAd/CMV/V5-DEST[®] – MABbo fue digerido 4hs a 37°C con la enzima *PacI* (NEB) a fin de linealizar el plásmido y favorecer la exposición de las secuencias repetitivas *ITRs* flanqueantes al inserto de interés que constituyen los orígenes de replicación del ADN viral.

Luego de la digestión se sembró el total del volumen en un gel de agarosa al 0,6 % para realizar la electroforesis. Luego de visualizar al UV, la banda correspondiente al plásmido linealizado se purificó a partir del gel con el kit comercial Qiaex II (Qiagen) y el ADN purificado se cuantificó por espectrofotometría con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

3.10.2.5 Obtención del Adenovirus recombinante, rAd.

Para la obtención del adenovirus recombinante se transfectaron células HEK 293A (del inglés *Human Embryonic Kidney 293 cells*) con el vector destino pAd/CMV/V5-DEST™ – MABbo linealizado. Las células se cultivaron previamente en placa *Cellstar* de 6 pocillos (Geiner Bio – one, Alemania) a una confluencia de la monocapa del 70 – 80 % (aproximadamente 8×10^5 células/pocillo). Se transfectaron 20 µg por pocillo de pAd/CMV/V5-DEST™ – MABbo purificado utilizando el reactivo de transfección Lipofectamine™ 2000 en medio Opti-MEM (ambos reactivos de Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se ensayaron tres tiempos de transfección: 4, 9 y 16 hs respectivamente, a 37°C y 5% CO₂. Pasado estos tiempos, se cambió el medio de transfección por D - MEM suplementado con SFB 2%. A las 48 hs se cambió el medio de cultivo por D - MEM completo fresco y las células se incubaron durante 10 – 12 días en estufa con observación diaria al microscopio. La cosecha viral del sobrenadante del cultivo celular se realizó cuando se observó el efecto citopático característico en cual las células, redondeadas, se agrupan en forma de racimos para luego levantarse la monocapa.

Esto constituyó el pasaje 1, P1. Para clarificar la suspensión viral y eliminar los restos celulares, se realizaron 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento a -80°C alternando con incubaciones a 37°C. Luego la suspensión del P1 se centrifugó en microcentrífuga a 1677 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se conservó en alícuotas a -80°C.

3.10.2.6 Amplificación del *stock* del rAd.

Para la amplificación del *stock* adenoviral, se infectaron células HEK 293 A crecidas en monocapa (2 botellas T – *flasks* 75 cm²) con una alícuota de 500 µl de P1. A las 48 hs se cosechó el sobrenadante y se realizaron nuevamente 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento a -80°C. Esto constituyó el *stock* P2. Finalmente, se infectaron con el P2 5 botellas de T – *flasks* 225 cm² de células HEK 293 A y se repitió el proceso de cosecha y clarificado. El clarificado obtenido se concentró por ultracentrifugación en ultracentrífuga a 60494 g durante 3 hs a 4°C mediante un colchón de sacarosa 25% p/v en buffer NET (Tris – HCl 10 mM, pH: 8, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM). El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de buffer NET luego de lo cual se alícuotó y conservó a -80°C hasta realizar los ensayos de inmunización en animales. Una alícuota se utilizó para la titulación viral.

3.10.2.7 Titulación del stock del adenovirus recombinante, rAd.

Se cultivaron células HEK 293A en placa de 24 pocillos de manera que al momento de la infección se encuentren en un 90% de confluencia. Se realizaron diluciones seriadas al décimo del *stock* de virus recombinante amplificado, por duplicado, partiendo de la dilución 10^{-2} hasta la dilución 10^{-10} . Se inocularon 500 μ l sobre las células y luego de un período de adsorción de 45 min a 37°C, 5% CO₂, se retiró el inóculo y se agregó medio semisólido D - MEM 2X suplementado con 4% de SFB y 2% de agarosa.

La placa se incubó durante 10 – 12 días adicionales a 37°C, 5% CO₂ y pasado ese tiempo se agregó una solución de 20 mg/ml de 3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenazina clorhidrato (Sigma – Aldrich) para teñir las células vivas.

Finalmente se contabilizó el número de unidades formadoras de placa (UFP) en la dilución 10^{-9} y se estimó el título como:

$$\text{UFP/ml} = \text{promedio de placas} / (\text{vol. inóculo} \times \text{dilución}).$$

Ha sido documentado que los adenovirus recombinantes depletados de la región E1 pueden revertir a la cepa *wild type* en los sucesivos pasajes. Esta reversión ocurre por recombinación homóloga con el gen *e1* presente en las células HEK 293A (Goldsmith *et al.*, 1994; Löchmuller *et al.*, 1994).

Para descartar que nuestro *stock* de adenovirus recombinante no estuviera contaminado con adenovirus *wild type*, se infectaron células no permisivas BHK-21 (del inglés, *Baby Hamster Kidney cells*) con una alícuota del rAd a una MOI alta de 30. Las células se incubaron durante 6 – 8 días con cambio de medio completo cada dos días. Durante este tiempo, no se observó efecto citopático típico.

3.10.3 Técnicas para la caracterización molecular de los virus.

3.10.3.1 Análisis de los virus recombinantes por PCR.

3.10.3.1.1 Infección y extracción de ADN viral.

Se infectaron células HEK 293 A (rAd) o FEPs (rMVA) en placas p60 con una alícuota de 300 μ l de virus rAd o rMVA respectivamente y a una MOI de 0,5. Para permitir la adsorción y entrada de los virus se incubaron durante 45 min a 37°C y, posteriormente, se agregaron 3 ml de medio de mantenimiento. Se incubó en estufa a 37°C y a los 4 días post infección se descartó el medio de cultivo. Las monocapas se cosecharon en 1 ml de PBS 1X y se realizaron 3 ciclos de congelado (-70°C) y descongelado (37°C).

Para la extracción del ADN viral se utilizaron 350 μ l de los extractos celulares, a los cuales se les agregaron 350 μ l de buffer de extracción 2X (Tris 200 mM pH 8, EDTA 20 mM, SDS 2%, β -mercaptoetanol 4%, Proteinasa K 1 mg/ml).

Se incubaron las alícuotas a 55°C por 2 hs. Luego se realizaron dos extracciones con un volumen de fenol equilibrado a pH=8, mezclando por inversión durante 20-30 min y se centrifugó por 5 min a 1677 g en microcentrífuga. La fase acuosa se recuperó en un tubo de microcentrífuga limpio. Se realizó una extracción con un volumen de cloroformo, mezclando por inversión durante 3-5 min y se centrifugó en microcentrífuga a 1677 g durante 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa y los ácidos nucleicos se precipitaron por el agregado de 0,1 vol de acetato de sodio 5 M pH 5,2 y 0,7 volúmenes de isopropanol.

Se mezcló por inversión y se centrifugó durante 30 min a 10000 x g en microcentrífuga, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó con 500 µl de etanol 70% y se centrifugó durante 5 minutos de igual manera a la descrita anteriormente. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* final, previamente secado a 37°C, se resuspendió en 100 µl de agua bidestilada incubando a 60°C durante 10-20 min. Como control se utilizó el ADN viral extraído de una infección de células HEK 293A con wtAd o wtMVA en el caso de las FEPs.

3.10.3.1.2 PCR

En la caracterización genética de los virus recombinantes se realizó la amplificación por *PCR* de la secuencia genómica insertada en el genoma viral. Para ambos virus recombinantes se amplificó la secuencia correspondiente al MABbo. También se procedió al análisis de la pureza de los distintos virus. En el caso del rMVA, se utilizó una reacción de *PCR* con los cebadores específicos para el fragmento MVA086R correspondiente al gen completo de la timidina kinasa viral que permitió detectar la ausencia de virus *wild type* y solamente la presencia de las partículas recombinantes mediante la presencia del MABbo con cebadores específicos para su secuencia. Esta última reacción de amplificación de MABbo permitió detectar las partículas de rAd.

Para una reacción de amplificación por *PCR* de 50 µl finales se utilizó como templado 1,5 µl de la extracción de ADN total de células infectadas con virus recombinantes o no recombinante (como control).

3.10.4 Análisis de los virus recombinantes por WB e inmunofluorescencia.

Se infectaron FEPs o células HEK 293A crecidos en placas p60 con 300 μ l del virus rMVA o rAd respectivamente a una multiplicidad de infección de 1. Para permitir la adsorción y entrada del virus se incubó durante 45 min a 37°C y, posteriormente, se agregaron 3 ml de medio de mantenimiento. Se incubó en estufa a 37°C durante 48 hs. Pasado ese tiempo, se cosecharon las monocapas con 1 ml de PBS 1X. Se centrifugaron 5 min a 1677 g, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 μ l de cracking buffer 5X (60 mM Tris-Cl, pH 6.8, 2% SDS, 10% Glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0.01% Azul de Bromofenol). Las muestras se hirvieron durante 5 min y los extractos se sembraron en geles de SDS – PAGE y posterior electrotransferencia para el análisis por WBs

Además, se evaluó la expresión del MABbo por inmunofluorescencia. Para el rMVA, se infectaron células PK-15 no permisivas, mientras que para el rAd, se infectaron células HEK 293A. Ambas monocapas se cultivaron en placa de 24 pocillos (GBO) sobre cubreobjetos y a una MOI de 0,05. A las cuarenta y ocho horas post-infección, se lavaron las monocapas 2 veces con PBS 1X y posteriormente se fijaron con metanol 20% frío durante 20 minutos.

Seguidamente, se bloqueó durante 1 h con PBS 1X – 5% SFB y se incubó con el suero policlonal α – HSP20, en una dilución 1:100 durante 1 h a 37°C. Luego de transcurrido ese tiempo, se lavó 2 veces con PBS 1X y se incubó con el segundo anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa 488 (Invitrogen), durante 1 h a 37°C. Los núcleos se tiñeron con solución TO-PRO®3-Iodide – 1mM DMSO (Invitrogen).

Las imágenes fluorescentes se obtuvieron con el microscopio Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) a 488 nm y un aumento de 63X (1.2 AN) o 40X (1.25 AN) optimizando los ajustes de potencia para obtener la mejor resolución y contraste posible.

3.11 Protocolos de inmunización en ratones.

Se ensayaron diferentes protocolos de inmunización, los cuales se detallan a continuación. Cada protocolo implicó la repetición de dos ensayos independientes. Para cada grupo, se emplearon un total de 5 animales.

En los primeros protocolos de inmunización que se realizaron, los inmunógenos fueron administrados con una diferencia de 14 días. Así, un grupo (**rMVA – P**) recibió un “*prime*” de 1×10^7 UFP/ratón del virus rMVA por vía intraperitoneal (i.p) y 14 días después un “*boost*” de 50 µg/ratón de una mezcla equimolar de las tres proteínas recombinantes rMSA-2c, rRAP-1 y rHSP20 en adyuvante incompleto de Freund (Sigma - Aldrich), por vía subcutánea (s.c). Otro grupo recibió el esquema inverso de inmunización con igual distancia de tiempo entre el “*prime*” y el “*boost*” (**P – rMVA**). Un tercer grupo recibió dos dosis, (al día 0 y día 14) de 50 µg/ratón de una mezcla equimolar de las tres proteínas, en adyuvante completo de Freund (“*prime*”) o incompleto (“*boost*”), por vía s.c (**P – P**).

Un cuarto grupo fue inmunizado con dos dosis de 1×10^7 UFP/ratón del virus rMVA, por vía i.p (**rMVA – rMVA**).

Además, se inmunizaron ratones dos veces (al día 0 y día 14) con una dosis de 1×10^7 UFP/ratón del virus rMVA por vía i.p, previamente inactivado por calor a 56°C durante 40 minutos. Como grupos control, se inmunizaron ratones con dos dosis de 1×10^7 UFP/ratón del virus wtMVA, por vía i.p (**wtMVA – wtMVA**) o con dos dosis de 1mL/ ratón de medio RPMI incompleto (Invitrogen), por vía i.p (**RPMI – RPMI**).

Se tomaron muestras de sangre al día 0 (suero pre-inmune), al día 14 y al día 28. El suero colectado se mantuvo a -20°C hasta su uso. A los 28 días luego de la segunda inmunización, todos los animales se sacrificaron y se obtuvieron las células del bazo para ensayos de respuesta inmune celular. La **Figura M.4** resume este protocolo de inmunización.

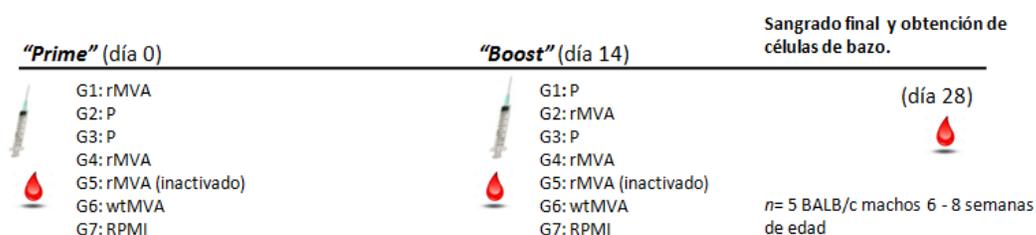


Figura M.4. Esquema de los protocolos de inmunización para todos los grupos.

Para los protocolos en donde los inmunógenos se administraron con 30 días de diferencia, se inmunizaron grupos de ratones de la siguiente manera: un grupo de ratones (**rAd – rMVA**) fue inmunizado con 1×10^9 UFP/ratón del rAd, por vía intramuscular (i.m) y 30 días después recibió una dosis de 1×10^7 UFP/ratón del virus rMVA, por vía i.p.

Como control, se inmunizó un grupo con un “prime” de 1×10^9 UFP/ratón del virus wtAd, vía i.m, y 30 días después un “boost” 1×10^7 UFP/ratón del virus wtMVA, vía i.p (**wtAd – wtMVA**). Otro grupo de animales fue inmunizado con un “prime” de 20 μg /ratón de rMABbo en adyuvante completo de Freund por vía s.c y 30 días después con un “boost” de 1×10^7 UFP/ratón del virus rMVA por vía i.p. (**rMABbo – rMVA**). Un grupo control recibió una dosis de 20 μg /ratón de la proteína heteróloga SAG₁ de *Neospora caninum*, purificada en las mismas condiciones que el rMABbo, por vía s.c y 30 días después un “boost” de 1×10^7 UFP/ratón del virus wtMVA, vía i.p (**SAG₁ – wtMVA**). Un grupo control recibió dos dosis de 1mL/ratón medio RPMI incompleto, vía i.p (**RPMI – RPMI**). Se tomaron muestras de sangre al día 0 (suero pre-inmune) y al día 60.

El suero colectado se mantuvo a -20°C hasta su uso. A los 60 días luego de la primera inmunización todos los animales se sacrificaron y se obtuvieron células del bazo para ensayos de respuesta inmune celular. La **Figura M.5** resume este protocolo de inmunización.

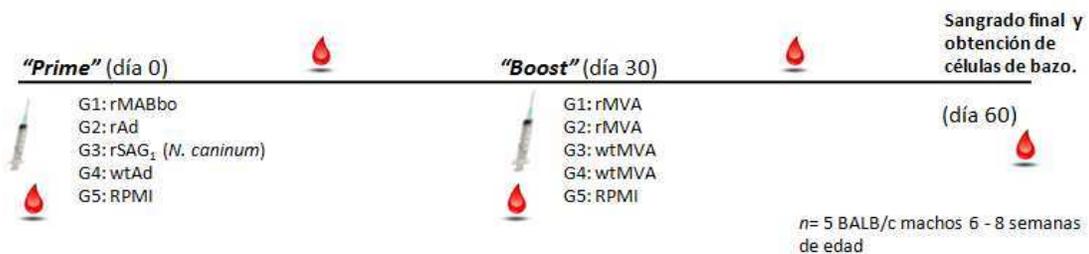


Figura M.5. Esquema del protocolo de inmunización con un “prime” al día 0 y un “boost” al día 30. En este protocolo, los animales fueron sangrados cada 15 días y una sangría final al día 60.

También se inmunizaron ratones con este mismo protocolo pero las dosis de los inmunógenos se aplicaron con un intervalo de 60 días, esto es, el “*prime*” al día 0 y el “*boost*” al día 60 y, 120 días después de la primer inmunización, los animales fueron sangrados para la obtención de suero y luego sacrificados para la obtención de sus respectivos bazos.

3.12 Técnicas para la determinación de la respuesta inmune inducida por los inmunógenos.

3.12.1 Cultivo *in vitro* de esplenocitos de ratón.

Se extrajeron los bazos de ratones y se disgregaron mecánicamente, utilizando portaobjetos esmerilados, en medio de cultivo RPMI (Invitrogen) suplementado con L-glutamina 2 mM (Sigma – Aldrich) , penicilina 100 U/mL (GIBCO), estreptomycin 100 mg/mL (GIBCO), HEPES 10 mM (GIBCO), 2 - mercaptoetanol 50 mM (Sigma – aldrich), y 10% SFB. Se lavaron los esplenocitos, se removieron los glóbulos rojos por lisis osmótica con *buffer* de lisis de NH₄Cl 0,5M y se realizó el recuento al microscopio en cámara de *Neubauer* de las células viables teñidas con azul de *Trypan* 0,4 % (GIBCO). Luego, se cultivaron 1 x 10⁶ esplenocitos por pocillo de placas de 96 pocillos con fondo en U (GBO) y se realizó la estimulación de los linfocitos con el antígeno específico según el experimento: 10 µg/mL de un lisado crudo de de *B. bovis*, 10µg/mL del rMABbo, 1 µg/mL de Concanavalina A (Sigma – Aldrich) como mitógeno y control positivo de la linfoproliferación o 100 µL de medio RPMI completo como control negativo.

3.12.2 Cuantificación de IFN γ en sobrenadantes de esplenocitos

Los niveles de IFN γ secretados se determinaron por ELISA de captura, utilizando el kit comercial OptEIA (Beckton Dickinson Labware, Oxnard, CA, EEUU). Para ello, las placas se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ durante 72 hs. Luego de pasado ese tiempo se recogieron los sobrenadantes y se preservaron a -80°C hasta su uso.

Se sensibilizaron placas Maxisorp de 96 pocillos (NUNC) con 100 μ l por pocillo de una dilución 1:500 del anticuerpo monoclonal de captura (clon AN-18) en *buffer* carbonato/bicarbonato, 100 mM, pH: 9.6 y se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente se lavaron las placas tres veces con 100 μ l de *buffer* de lavado PBS 1X – Tween 0,05% (PBS-T) y se bloquearon durante 1 h con 100 μ l de PBS 1X - 10 % SFB a temperatura ambiente. Luego de realizar cinco lavados, se colocaron los sobrenadantes en una dilución 1/10 y los puntos de la curva estándar realizados en PBS 1X - 10 % SFB y se incubaron las placas a temperatura ambiente por 2 hs (todas las determinaciones se realizaron por duplicado). Luego, se lavaron las placas tres veces y se agregaron 100 μ l/pocillo de la mezcla compuesta por el anticuerpo biotinilado en una dilución 1:250 (clon XMG2.1) y el anticuerpo secundario estreptavidina – HRP en una dilución 1:250 y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se lavaron las placas cinco veces y se agregó la solución de revelado TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine, en 30% de H₂O₂).

Finalmente, se detuvo la reacción con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2N y se leyó la DO_{450nm} en un espectrofotómetro (Multiskan, Labsystems). La cantidad de IFN γ secretado se calculó con la curva estándar del *kit* teniendo en cuenta la viabilidad total de las células luego de las 72 hs.

3.12.3 Marcación intracitoplasmática y citometría de flujo

Para la determinación de las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN γ , TNF α o ambas citoquinas, las placas conteniendo los esplenocitos cultivados (1x10⁶ esplenocitos/well) se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ durante 16 hs. Luego, para facilitar la acumulación intracitoplasmática de las citoquinas, se agregó 2 µg/mL del reactivo Brefeldina A (Sigma – Aldrich) a cada pocillo y se los incubó durante 6 hs más. A continuación, se centrifugó la placa a 1200 g durante 5 min a 4 °C, se re-suspendieron las células en 200 µl de *buffer staining* (BS: PBS 1X - 5 % SFB y NaN₃ 0,1 %) y se traspasaron a placas de fondo en V. Se realizó un segundo lavado y se resuspendió en 150 µl de BS con la dilución de anticuerpos dirigidos a moléculas ubicadas en la superficie celular: anti-ratón CD4⁺ - FITC™ (clon GK1.5, BD); anti-ratón CD8⁺ - PE™ (clon 53-6.7, BD). Luego de incubar 30 min a 4 °C en oscuridad, se lavaron las células dos veces con BS y se permeabilizaron con paraformaldehído 2 - 1 % durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron luego dos veces con 200 µl de BS y se conservaron a 4 °C.

Al día siguiente, se centrifugaron las células a 1200 g durante 5 min a 4°C y se resuspendieron en 200 µl de buffer de permeabilización (BP: BS y saponina 0,5 %).

Luego de realizar dos lavados con BP, las células se resuspendieron en 50 μ l de la dilución de anticuerpo anti – ratón IFN γ - APC™ (clon XMG1.2, BD) y/o anti ratón TNF α – PerCP – Cy™ 5.5 (clon MP6-XT22, BD) en BS y se incubó 30 min a 4 °C en oscuridad. Finalmente, se lavaron las células dos veces en BS y se resuspendieron en 500 μ l de *buffer* FACs. Finalmente, las células fueron analizadas en el citómetro FACS Calibur usando el software Cell Quest (BD).

Se analizaron un total de hasta 300.000 células/pocillo de las cuales solo se incluyeron las células viables para su análisis correspondiente. Se incluyeron controles de isotipo apropiados y de autofluorescencia.

3.12.4 Titulación de anticuerpos específicos IgG por ELISA indirecto.

Para determinar el título de anticuerpos inducido en los diferentes grupos de inmunización, se sensibilizaron placas placas Maxisorp de 96 pocillos (NUNC) en buffer carbonato/bicarbonato 100 mM, pH: 9,6.

Las placas fueron sensibilizadas por separado con la proteína recombinante rMSA-2c (3 ng/well), rRAP-1 (2 ng/well), rHSP20 (3 ng/wel) o rMABbo (20 ng/well). Luego de la sensibilización toda la noche y a 4°C, se lavaron los pocillos 2 veces con buffer PBS – T y se bloqueó la placa con PBS – T 5% leche descremada durante 1 h a 37°C.

Seguidamente, se descartó la solución de bloqueo, se lavó 3 veces con 150 µl de PBS – T y se agregaron diluciones seriadas de los sueros los ratones inmunizados según los diferentes esquemas en solución dilución (PBS – T 5% leche descremada, 100 µl/pocillo).

La placa se incubó durante 1h a 37°C y seguidamente se lavó 3 veces con PBS – T. Luego, se agregó el anticuerpo comercial anti IgG ratón conjugado a peroxidasa (Promega) en una dilución 1/3000 y se incubó la placa a 1h a 37°C. Luego de 3 lavados, se reveló la reacción con 100 µl del sustrato ABTS, [2-2'-azino-bis (3-etilbentiazolina-6-sulfónico)] (0,01g/0,06 ml de H₂O₂ en *buffer* citrato pH: 5). La absorbancia fue medida a 405 nm en un lector de ELISA (Multiskan, Labsystems) a los 30 minutos. La concentración óptima de antígeno se estableció a partir de la absorbancia máxima medida a una determinada dilución. Una vez establecida la concentración óptima de antígeno, se procedió a analizar los sueros de igual manera a la descrita arriba realizando diluciones seriadas al medio. Cada suero se evaluó por duplicado y el punto de corte o *cut off* se calculó como el promedio de las absorbancias más dos desviaciones estándares de la dilución más concentrada del suero de los ratones pre-inmunes.

3.12.5 Determinación de las subclases IgG1 e IgG2a

Se siguió el mismo protocolo que en el punto anterior, pero luego de la incubación con los sueros muestra, las placas se incubaron con anticuerpos anti IgG1 o IgG2a de ratón biotinilados (0,5 mg/ml, BD Pharmingen™) diluidos 1/1000 por 1h a 37°C. Luego de los

lavados, se incubó con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a avidina- peroxidasa (BD Pharmingen [™]), diluido 1/1000 también 1h a 37°C y se reveló siguiendo el procedimiento anterior.

3.12.6 ELISA indirecto con sueros de bovinos infectados con *B. bovis*.

Se sensibilizaron placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) en buffer carbonato/bicarbonato 100 mM, pH: 9,6 con 20 ng/pocillo de la proteína rMABbo. Luego de la sensibilización toda la noche y a 4°C, se lavaron los pocillos 2 veces con buffer PBS 1X – Tween 20 0.05% (PBS-T) y se bloqueó la placa con PBS – T 5% leche descremada durante 2 h a 37°C y 10% de un extracto bacteriano como solución de pre-adsorción.

Seguidamente, se descartó la solución de bloqueo, se lavó 3 veces con 150 µl de PBS – T y se agregó por cada pocillo la dilución 1/50 del suero de un bovino infectado con *B. bovis*, en la solución dilución (PBS – T 5% leche descremada + 10% solución de extracto bacteriano, 100 µl/pocillo). La placa se incubó durante 1h a 37°C y seguidamente se lavó 3 veces con PBS – T.

Luego, se agregó el anticuerpo comercial anti IgG bovino conjugado a peroxidasa (Promega) en una dilución 1/3000 preparado en PBS T 5% leche descremada + 10% solución de extracto bacteriano y se incubó la placa a 1h a 37°C. Luego de 3 lavados, se reveló la reacción con 100 µl del sustrato TMB. Finalmente, se detuvo la reacción con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2N y se leyó la densidad óptica a 450 nm en un espectrofotómetro (Multiskan, Labsystems).

En total se utilizaron 75 sueros de animales post-vacunados que fueron considerados positivos para *B. bovis* para el ELISA indirecto de actual uso en la EEA – INTA Rafaela y 268 sueros de animales nacidos y criados en zona libre de *R. microplus* (Tandil) y por lo tanto considerados negativos para *B. bovis*.

Estos sueros fueron cedidos gentilmente por el Laboratorio de Virus de la Fiebre Aftosa, Instituto de Virología, INTA – Castelar. Las absorbancias se expresaron como porcentaje de positividad (%P) frente a un control positivo colocado en cada placa, al cual se le asignó el valor de 100 %. Este control positivo consistió en un pool de sueros proveniente de una infección experimental con parásitos de *B. bovis*. Para testear reacción cruzada, se utilizaron sueros de 22 animales positivos al ELISA de *B. bigenima* (EEA- INTA – Rafaela) y 6 animales infectados experimentalmente con *Anaplasma marginale*.

También se testearon sueros incógnitas provenientes de la región del NEA y de la Guyana Francesa. Un total de 89 sueros eran provenientes de la Provincia de Corrientes, mientras que 46 sueros provenían de Misiones.

Se analizaron también un total de 317 sueros bovinos provenientes de la Guyana Francesa que fueron cedidos gentilmente por la Dra. Nathalie Vachier (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA – Isla Guadalupe, Francia).

3.13 Alineamiento múltiple.

Para el análisis de alineamiento múltiple se utilizó el programa ClustalW2, que puede utilizarse *online* desde el sitio <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>.

3.14 Análisis de las secuencias.

El análisis de las secuencias clonadas se realizó con el programa Vector NTI™, versión 9.1 (Thermo Fischer Scientific).

3.15 Análisis estadístico.

Para la comparación de datos entre los diferentes grupos de vacunación, se realizó el *test* estadístico de ANOVA (Análisis de la Varianza) de una sola vía, considerando los supuestos de normalidad y homocedacia, con posterior aplicación a la corrección de Bonferroni. Para este análisis se empleó el programa *Graph Pad*® versión 6.0 para *Windows* (La Jolla, CA). Los valores de $p < 0.05$ fueron tomados como estadísticamente significativos.

La determinación del valor de corte del ELISA, la sensibilidad y especificidad diagnóstica fue realizada mediante el análisis estadístico de ROC (*Receiver Operating Characteristic Computer*) utilizando el programa *MedCalc* 9.62 (Bélgica).

Para el cálculo de la medida de concordancia entre el ELISA indirecto del rMABbo respecto del ELISA indirecto de merozoitos se utilizó el índice de concordancia kappa, k , descrito

previamente según (Altman, 1991) y cuyo cálculo puede realizarse *online* desde el sitio <http://faculty.vassar.edu/lowry/kappa.html>.

4 Resultados.

4.1 Obtención y caracterización del virus MVA que expresa el multiantígeno MABbo de *B. bovis*.

Con el objetivo de obtener las partículas del rMVA que codifica para el MABbo, se realizaron ensayos de transfección estable con el vector de transferencia VT-MTK-GUS-MABbo en cultivos primarios de FEPs, previamente infectados con el virus wtMVA. Luego de 4 días de incubación de los FEPs, se retiró el medio de cultivo y se sembró el *overlay* conteniendo el sustrato de la enzima GUS. Entre las 48 – 72 hs se identificaron dos focos azules, los cuales fueron levantados y re-suspendidos en 500 µl de medio 199 1X. Con uno de esos clones, se continuó el *screening* de las partículas recombinantes bajo agar y el análisis de la expresión de la enzima GUS. Entonces, las playas de lisis que presentaban color azul fueron sucesivamente aisladas y amplificadas en cultivos de FEPs. Este pasaje se realizó nueve veces hasta obtener un *stock* homogéneo (100% de playas de lisis azules).

Una vez concluido este proceso de selección, fue necesario corroborar la presencia del gen de interés en los rMVA pero además, la ausencia de virus *wild type* residual que pudiera haber quedado del proceso de aislamiento de las células FEP infectadas con el mismo. Entonces, a partir del pasaje 9 se seleccionaron 3 clones y se caracterizaron mediante *PCR*. Cabe destacar que también se realizó una extracción de ADN viral en el pasaje N° 5 y se detectó por *PCR* la presencia de virus *wild type* en los clones recombinantes, por lo que fue necesario avanzar en la ronda de purificación hasta el aislamiento total de virus recombinante (pasaje N°9).

Para cada clon por separado, se realizó la extracción del ADN viral y se evaluó la presencia del gen de interés por *PCR* utilizando los cebadores *MABbo F* y *MABbo R* que amplifican el fragmento específico correspondiente al gen del MABbo de 1802 pb (**Figura 1A**). Se corroboró la presencia de esta banda en el ADN viral de los tres clones analizados mientras que no se detectó la banda de 554 pb correspondiente a la presencia del gen MVA086R del virus *wild type* en dicho ADN. Este resultado confirma entonces, la ausencia de virus *wild type* en el pasaje 9 y la presencia de una población viral 100% recombinante en dicho pasaje. La Figura 1 B muestra los resultados correspondientes a uno de los 3 clones seleccionado posteriormente para su caracterización inmunológica, amplificación y purificación.

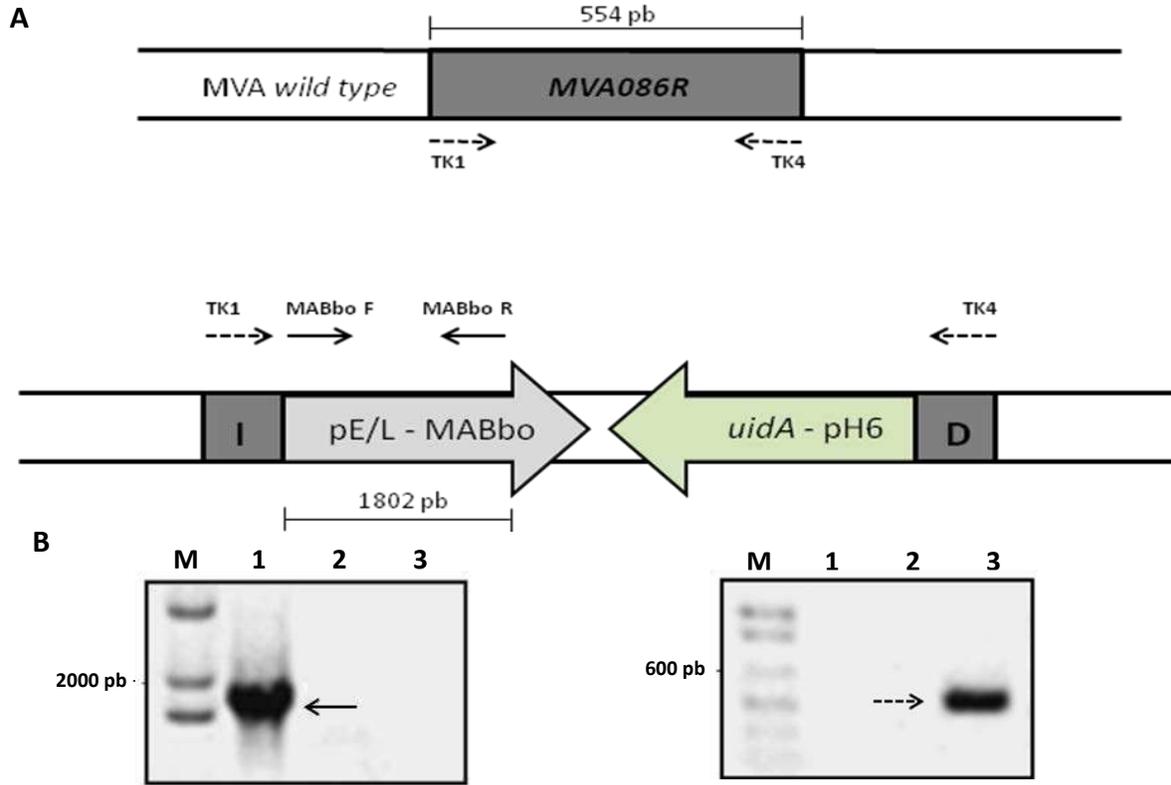


Figura 1. Caracterización del rMVA. A. Representación esquemática del gen MVA086R en el genoma del virus *wild type* (panel de arriba). El panel de abajo representa el genoma del virus con la inserción del MABbo, río abajo del promotor sintético temprano/tardío de poxvirus pE/L, el gen *iudA* que codifica para la enzima β - Glucoronidasa, río abajo del promotor pH6. Este *cassete* se encuentra flanqueado por las regiones D (a derecha) e I (a izquierda) del gen MVA086R. Las flechas indican la posición de los cebadores que amplifican a TK y MABbo. **B.** Producto de *PCR* utilizando los cebadores MABbo F y R para amplificar el inserto de interés (izquierda). Los cebadores TK1 y TK4 se utilizaron para verificar la pureza del *stock* viral (derecha). M: marcador de peso molecular. 1: producto de amplificación usando como templado ADN de FEPs infectados con el rMVA. 2: ADN de FEPs sin infectar. 3: ADN de FEPs infectados con el wtMVA.

Para continuar con la caracterización molecular y verificar la expresión del MABbo, se realizaron *WB* de extractos de FEPs infectados con solo uno de los clones o con el virus wtMVA (control negativo) y revelados con antiseros contras las tres proteínas que conforman el MABbo.

El resultado de los *WBs* reveló la presencia de una única banda reactiva de aproximadamente 72 kDa en el clon recombinante, correspondiente al tamaño teórico estimado del MABbo (**Figura 2A**). Asimismo, la expresión del MABbo se evidenció en la inmunofluorescencia indirecta de células PK - 15 infectadas con el rMVA y reveladas con anticuerpos contra HSP20, la cual se encuentra ubicada en el extremo C- terminal (ver esquema de la **Figura M.1** de la sección Materiales y Métodos; **Figura 2 B**).

Para verificar si la proteína quimérica rMABbo era capaz de ser reconocida por bovinos infectados con *B. bovis*, se realizaron *WBs* con sueros de animales natural o experimentalmente infectados con este parásito. Para ello se utilizaron 4 sueros de animales naturalmente infectados y 5 experimentalmente infectados. Todos los sueros evaluados fueron capaces de reconocer una banda reactiva de 72 kDa correspondiente al rMABbo (Figura R.2C).

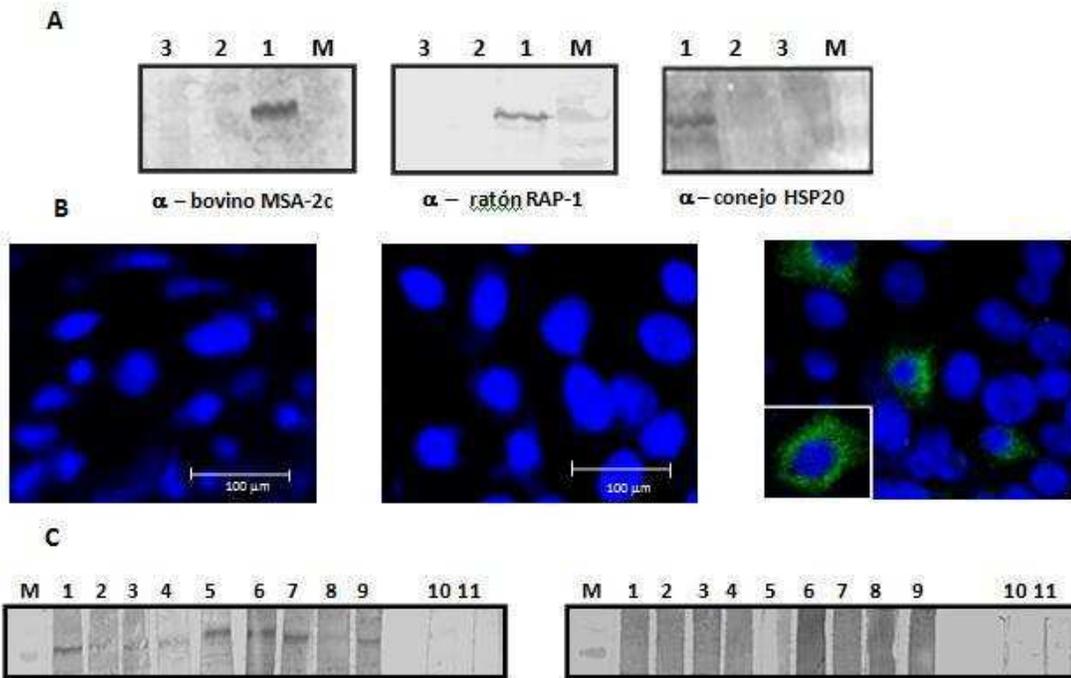


Figura 2. Análisis de la expresión del rMVA. **A.** *Western blots* de extractos de FEPs incubados con sueros contra las tres proteínas del MABbo. M: marcador de peso. 1: extracto de FEPs infectados con el rMVA. 2: extractos de FEPs infectados con el wtMVA. 3: control sin infectar. **B.** Inmunofluorescencia de células PK – 15 infectadas con el virus rMVA (derecha), con el virus wtMVA (medio) o control de células sin infectar (izquierda). **C.** *Western blots* de extractos de FEPs infectados con el virus rMVA (izquierda) o con el virus wtMVA (derecha) e incubados con sueros de bovinos infectados naturalmente (calles 1 – 4) o experimentalmente (calles 5 – 9) con *B. bovis*. Calles 10 y 11: suero de animales no infectados (control negativo).

4.2 Obtención y caracterización del Adenovirus que expresa el multiantígeno MABbo de *B. bovis*.

El primer paso en la obtención del Adenovirus recombinante es el clonado del producto de PCR correspondiente al gen MABbo en el vector de entrada pCR®8/GW/TOPO. Para confirmar la presencia del gen quimérico en dicho vector se realizó una digestión por restricción de 4 clones positivos a la transformación con dicho plásmido. La **Figura 3** muestra el patrón de restricción de la enzima *EcoRI* de dichos clones. En todos los casos se observa la presencia de una banda de aproximadamente 1800 bp correspondiente al tamaño del inserto del MABbo. Para confirmar la identidad de los clones, dos de ellos fueron secuenciados utilizando los cebadores *MABbo F* y *MABbo R*, y también los cebadores internos *rap-1 R* y *msa- 2c F*. La secuencia de los clones 1 y 2 y el análisis de alineamiento múltiple mostraron 100% de identidad nucleotídica entre dichos clones y la secuencia teórica predicha del MABbo.

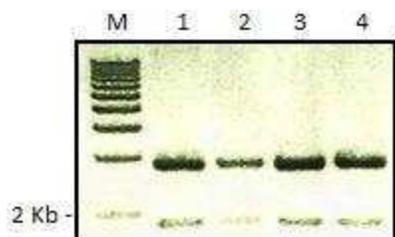


Figura 3. Análisis de restricción de los clones TOPO/GW – MABbo. Se digirieron con la enzima *EcoRI*. Las muestras se sembraron en del de agarosa al 1% y corridas en buffer TAE 1X a 5 – 7 V/cm. M: marcador de peso molecular; 1- 4: clones positivos.

Una vez confirmada la secuencia de 2 de los clones, se continuó solamente con el clon 1 para la reacción de recombinación entre este plásmido y el vector destino pAd/CMV/V5 – DEST™ que contiene el genoma adenoviral para la posterior transfección celular.

Luego de realizar la reacción de recombinación *in vitro* con el kit *Gateway*® *LR Clonase II Enzyme mix* (Invitrogen) y con el objetivo de identificar los clones recombinantes obtenidos y corroborar la correcta orientación del inserto MABbo en el vector destino, se realizó una *Colony PCR* con cebadores específicos. De los 9 clones analizados, 7 resultaron positivos y solo 2 resultaron negativos (clon 1 y 7, **Figura 4**).

Para realizar la transfección de las células HEK 293A con el vector pAd/CMV/V5-DEST™ – MABbo, se digirió el clon 1 con la enzima *PacI* (NEB). Luego, se analizó una alícuota de la reacción de digestión del vector en un gel de agarosa al 0,7 %.

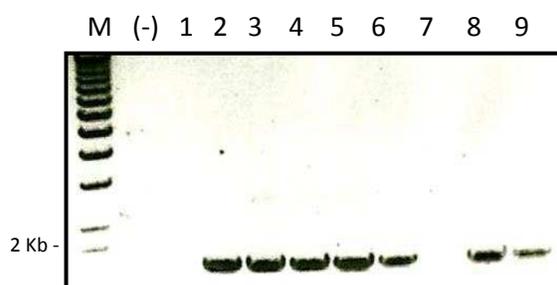


Figura 4. Screening por PCR de los clones positivos para el pAd/CMV/V5-DEST™ – MABbo. Se amplificó una porción del multiantígeno utilizando el cebador *Msa-2c Rv* y el *T7 promoter* (Tamaño adecuado: 1802 pb). M: marcador de peso molecular. (-): control negativo para la *Colony PCR*.

La Figura 5 muestra el vector linealizado por digestión (calle 1) respecto del mismo vector sin cortar (calle 2). Observándose una leve diferencia de migración entre ambos aunque no se llega a distinguir el fragmento de 2 kb que resulta de la digestión con *PacI*.

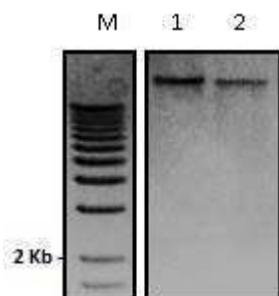


Figura 5. Análisis de digestión del pAd/CMV/V5-DEST™ – MAB. El clon 1 se digirió con la enzima *PacI*, durante 4 hs a 37°C. Las muestras se corrieron en gel de agarosa al 0,7% en buffer TAE 1X a 5 -7 V/cm. M: marcador de peso molecular 1: plásmido linealizado con la enzima *PacI*. 2: plásmido sin digerir.

Con el plásmido linealizado, se realizaron las transfecciones de células HEK 293A. Inicialmente se intentó probar tres concentraciones distintas del vector pAd/CMV/V5/DEST[®] - MABbo (clon 1): 1, 2 y 3 $\mu\text{g}/\text{well}$ en placas de p12, pero pasado el tiempo de 13 días, ninguno mostró signos de efecto citopático. Finalmente, luego de consultar la bibliografía, se intentó aumentar la cantidad a transfectar fijándola en 20 $\mu\text{g}/\text{well}$ y se probaron además tres tiempos de transfección descriptos previamente en Materiales y Métodos.

Luego de 12 - 13 días de la transfección con el vector, se observó al microscopio un efecto citopático en las células HEK 293A característico de la infección por Adenovirus en todos los tiempos evaluados. Las células comienzan a redondearse, se agrupan en forma de racimos y finalmente se levanta la monocapa. En la **Figura 6** se observa la imagen al microscopio óptico de este efecto generado como consecuencia de la replicación del vector dentro de la línea celular permisiva. En cambio, en el control de células sin transfectar no se observa el efecto citopático característico de la infección, luego de 12 días (panel B).

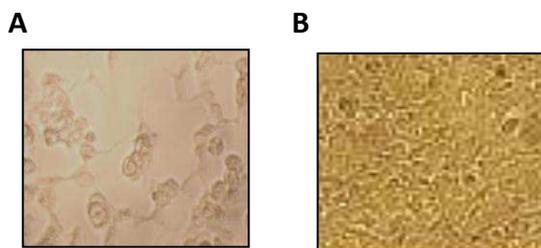
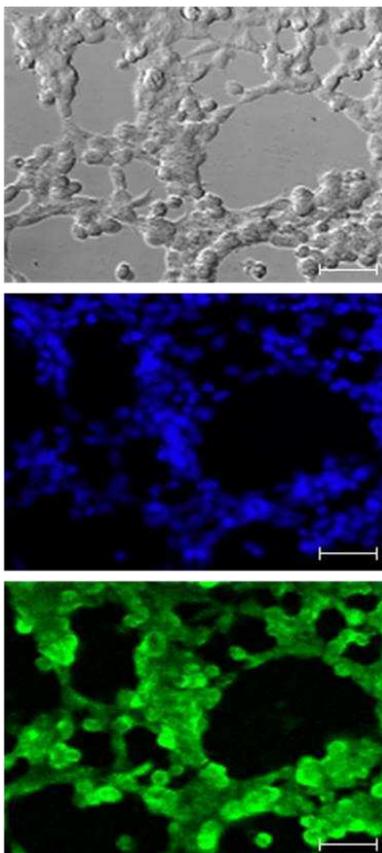


Figura 6. Efecto citopático en células HEK 293A.
A. Las células fueron transfectadas con el vector destino y a los 12 días pos- transfección se observó efecto citopático y se tomaron fotografías a campo claro. **B.** Control si transfectar. Aumento 400X.

La etapa final de obtención del rAd consistió en evaluar si estas partículas recombinantes obtenidas expresan la proteína quimérica MABbo. Para ello se analizó la expresión por *WB* e inmunofluorescencia en las células infectadas que mostraron el efecto citopático utilizando anticuerpos específicos del gen heterólogo. Como puede observarse en la Figura 7A, la expresión del rMABbo puede evidenciarse en el citoplasma de las células HEK 293A infectadas con el rAd, utilizando un anticuerpo contra la proteína HSP20 que se encuentra en la región C- terminal de la quimera.

A



B

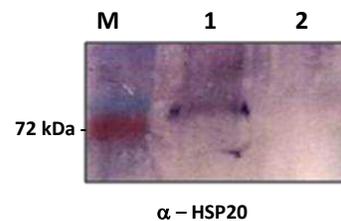


Figura 7. Análisis de expresión del rMABbo. **A.** Inmunofluorescencia de células permisivas HEK 293A infectadas con rAd e incubadas con anticuerpos anti – ratón conjugado a Alexa 488 y reveladas con suero α – HSP20 (abajo). Los núcleos fueron teñidos con To – PRO – Iodide[®] (medio). La barra blanca representa 100 μ m. **B.** Detección del rMABbo en *Western blot* de extractos celulares y revelados con una dilución 1:500 del anticuerpo α – HSP20. M: Marcador de peso molecular. 1: Extractos celulares infectado con rAd. 2. Extractos celulares infectados con wtAd.

Asimismo, en el *WB* se observa la presencia de una única banda reactiva de 72kDa correspondiente a la proteína MABbo, detectada en el lisado de células infectadas con el rAd con el anticuerpo anti - HSP20 mientras que, como es de esperar, en el control de células infectadas con el wtAd no se observa la banda correspondiente al rMABbo.

Para testear la ausencia de adenovirus que pudiera originarse por reversión del virus recombinante (**Goldsmith *et al.*, 1994**), se infectaron células no permisivas BHK-21 y PK - 15 con el rAd. No se observaron signos de efecto citopático durante la 72 hs post-infección, lo que muestra que no hay trazas de virus *wild type*.

Finalmente se realizó la titulación del stock de adenovirus recombinante amplificado en células HEK 293A, lo que determinó un título de aproximadamente 8×10^9 UFP totales. Finalmente se alicuotó el *stock* purificado en dosis de 1×10^9 UFP y se guardó a -80°C hasta su uso en los ensayos de inmunización.

4.3 Obtención y purificación de la proteínas recombinantes, rMSA-2c, rRAP-1, rHSP20 y rMABbo.

Los protocolos utilizados en la expresión de las proteínas recombinantes y los plásmidos elegidos para tal fin, resultaron útiles para la inducción de todas ellas. La síntesis de las tres proteínas rMSA-2c, rRAP-1 y rHSP20 fue inducida con IPTG, obteniendo muy buenos niveles de inducción. Este resultado se ve reflejado en la purificación de cada una de ellas (Figura 8A). En particular, las proteínas rRAP-1 y rHSP20 que formaron cuerpos de inclusión fueron disueltas sin inconvenientes en Urea 8M. La inducción del rMABbo con Arabinosa 0,2% también mostró muy buenos niveles de expresión (**Figura 8B**).

En cuanto a los protocolos de purificación utilizados, éstos permitieron obtener fracciones cromatográficas con alta pureza para cada una de las 3 proteínas recombinantes que conforman el MABbo. Asimismo, se logró purificar la proteína quimérica única rMABbo de la fracción soluble del lisado de bacterias *E. coli* Al recombinantes. La cuantificación por espectrofotometría de las fracciones eluidas con 250 mM de Imidazol determinó una concentración de 1 mg/mL para rMSA-2c, aproximadamente 600 µg/mL para rRAP-1 y rHSP20 y 1.2 mg/mL para rMABbo. Estas cantidades resultaron adecuadas para los ensayos de inmunización y de detección inmunológica realizados en esta tesis.

En el caso del rMABbo, se realizaron experimentos para determinar la conservación de los epitopes inmunodominantes de las tres proteínas que conforman esta quimera. Para ello se realizaron *WBs* utilizando anticuerpos contra cada una de ellas.

El resultado de este ensayo permitió confirmar que los epitopes de cada proteína se encuentran conservados en el contexto del rMABbo, dado que estos sueros reaccionaron positivamente al revelarse una banda reactiva del tamaño esperado del rMABbo (**Figura 8C**).

Asimismo, para verificar si esta proteína quimérica conservaba los epitopos B presentes en las 3 proteínas parasitarias, se evaluaron también por *WBs* sueros de bovinos infectados experimental y naturalmente con *B. bovis*. La Figura 8D muestra que los nueve sueros evaluados reaccionaron positivamente contra el rMABbo mostrando una banda reactiva del tamaño esperado.

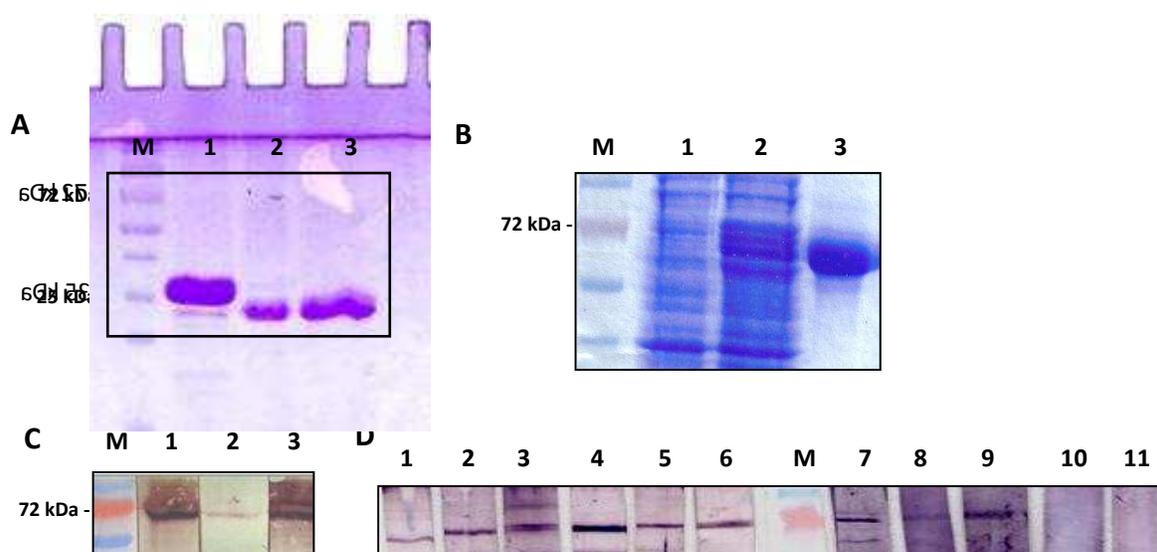


Figura 8. Análisis de la purificación de las proteínas recombinantes. A. SDS – PAGE 12% teñido con *Coomassie Blue* de las fracciones eluidas con 250 mM de Imidazol. M: marcador de peso molecular. 1: rMSA-2c, 2: rRAP-1, 3: rHSP20. B. SDS – PAGE 15% teñido con *Coomassie Blue* de la purificación de rMABbo. 1: extracto bacteriano sin inducir. 2: inducción 4 hs con Arabinosa 0,2%. 3: fracción eluída con 250 mM de Imidazol. C. *WB* del rMABbo revelado con 1: suero α – rMSA-2c; 2: Ac monoclonal BABB75 α – RAP-1; 3: suero α – HSP20. D. *WB* del rMABbo revelado contra sueros de animales experimental (1 – 6) o naturalmente (7 – 9) infectados con *B. bovis*. 10 y 11: sueros control de animales no infectados.

4.4 Evaluación de la respuesta inmune de los distintos candidatos vacunales.

4.4.1 Evaluación de la capacidad inmunogénica del rMVA solo o combinado con proteínas recombinantes.

En una primera etapa se evaluó en el modelo murino un esquema “*prime – boost*” homólogo tal como se describe en la **Figura M. 4** de la sección de Materiales y Métodos. En el grupo de ratones inmunizados dos veces con la mezcla de las tres proteínas recombinantes rMSA2-c, rRap-1 y rHSP20 (esquema P - P) con adyuvante completo de Freund en el “*prime*” e incompleto en el “*boost*”, se detectaron inmunoglobulinas IgG específicas al día 14 de la primera inmunización para los 3 antígenos utilizados (Figura 9A). Los títulos de anticuerpos continuaron incrementándose después del *boost* y hasta el día 28 (final del experimento). La proteína HSP20 resultó ser la más inmunogénica de las 3 con un título de 12.800, seguido por la proteína MSA-2c (6.400) y finalmente la RAP-1 (1.600). Para evaluar la respuesta celular inducida por este esquema, se determinó también la cantidad de IFN γ secretado en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratón re-estimulados durante 72 hs con un extracto de *B. bovis*. Al día 28 de la primera inmunización, se encontraron bajos niveles de esta citoquina (< 5 μ g/ml), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control (**Figura 9B**).

En la inmunización de ratones con dos dosis de rMVA a los mismos tiempos (esquema rMVA- rMVA), se observó una respuesta específica contra *B. bovis* tanto celular como humoral. Pero a diferencia del esquema P – P, se detectaron en este grupo títulos menores IgG contra las tres proteínas menores a 100 (Figura 9C). Se observó además una producción mayor de IFN γ secretado para este grupo rMVA – rMVA ($p < 0.001$) en comparación con el grupo que recibió dos dosis de la mezcla de antígenos (P - P) y en comparación con los grupos control (**Figura 9B**).

Ensayos previos de purificación de virus MVA recombinantes realizados en nuestro Instituto, habían demostrado la presencia de trazas de proteínas recombinantes heterólogas en el pellet final luego de la ultra centrifugación de los virus en colchón de sacarosa. Con el objetivo de averiguar si las trazas del rMABbo expresado en las células BHK-21 infectadas con el rMVA eran también responsables de la liberación de IFN γ celular, se cuantificaron los niveles de esta citoquina en los sobrenadantes de esplenocitos de cultivo del grupo de ratones inmunizados con dos dosis de virus rMVA inactivado. Como se observa en la **Figura 9D**, no se detectaron niveles de IFN γ estadísticamente significativos ($p < 0.001$) respecto del grupo control, lo que indica que la respuesta inducida es causada por la infección viral.

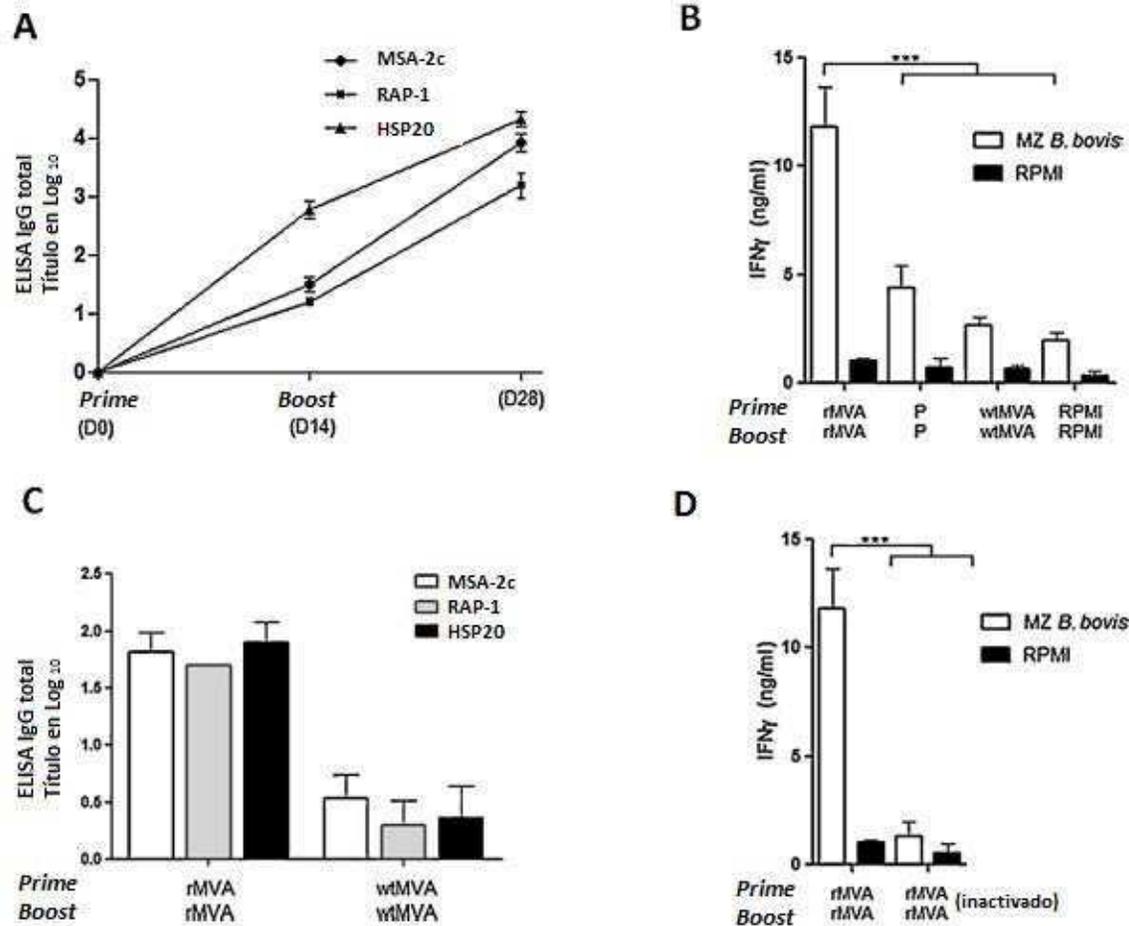


Figura 9. Inmunogenicidad de los esquemas de vacunación homólogos con cóctel de proteínas (P) y rMVA. En todos los casos los ratones BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente (i.p.) con 10^7 unidades formadoras de placas (PFU) de rMVA y 50 μg de la mezcla equimolar de las tres proteínas (P) en forma subcutánea (s.c.). Todos los ratones que recibieron dos dosis fueron inmunizados al día 0 (D0) con un *boost* al día 14 (D14). La sangre fue obtenida al día 28 y el suero fue analizado por ELISA indirecto. El suero pre-inmune fue empleado como control negativo. **(A)** Cinética temporal de los niveles de IgG total en respuesta a las inmunizaciones (P-P). **(B)** Niveles de IFN γ secretado en los sobrenadantes de cultivo re-estimulado con lisado de *B. bovis* (barras blancas) o RPMI (barras negras) determinado por ELISA *sandwich*. $**p < 0,05$ y $***p < 0,001$ comparado entre los grupos indicados **(C)**. Comparación de IgG total en ratones vacunados dos veces con rMVA o wtMVA por ELISA indirecto usando como antígeno de detección cada una de las tres proteínas comprendidas en el polipéptido quimérico. **(D)** Niveles de IFN γ secretado en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos inmunizados dos veces con el rMVA o dos veces con el mismo virus previamente inactivado durante 30 min a 56°C.

Para determinar si el esquema heterólogo presentaba alguna ventaja en comparación al esquema homólogo realizado anteriormente, se evaluó la inmunogenicidad inducida en un esquema de vacunación combinando el cóctel de proteínas (P) y el rMVA, alternando el orden de administración (esquema rMVA - P y P- rMVA).

Como se muestra en la Figura 10A, se observaron al día 28 altos títulos de IgG específica en ambos esquemas heterólogos contra rMSA-2c (12.800) y rHSP20 (>10.000), mientras que para RAP-1 se detectaron niveles inferiores (< 3.200). En particular, ambos esquemas heterólogos mostraron una mayor proporción del isotipo IgG2a contra cada una de las tres proteínas (**Figura 10B**), indicativo de una respuesta *Th1*, aunque el esquema P - rMVA fue el que mostró una mayor proporción del isotipo IgG2a para cada proteína por separado.

Hacia el final del experimento (día 28) se cuantificaron los niveles de IFN γ secretado en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos de ratón. Como se muestra en la **Figura 10C**, ambos regímenes heterólogos indujeron altos niveles de esta citoquina, alcanzando valores similares a los obtenidos cuando se empleó rMVA en el régimen homólogo.

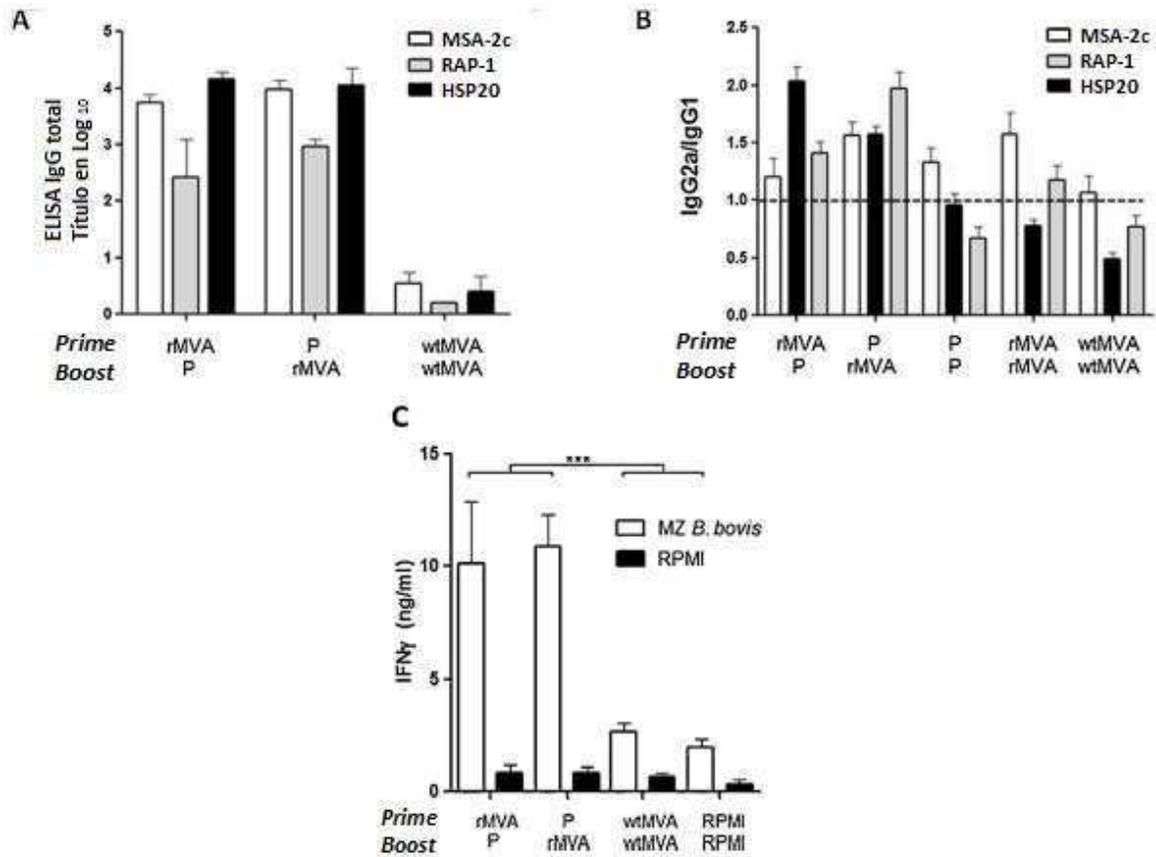


Figura 10. Inmunogenicidad de los esquemas “prime – boost” heterólogos combinando P y rMVA. (A) Determinación de IgG total producida por ELISA indirecto usando cada una de las tres proteínas contenidas en la quimera. **(B)** Comparación de la relación de las subclases IgG2a/IgG1 en los esquemas homólogo y heterólogo de primera inmunización y refuerzo al día 14 después del refuerzo. La línea punteada indica una proporción balanceada. **(C)** Niveles de IFN γ secretado en los sobrenadantes de cultivo re-estimulados *in vitro* durante 72 hs, determinado por ELISA *sandwich*. *** $p < 0,001$ comparado entre los grupos indicados.

Dado que la técnica utilizada para cuantificar el IFN γ secretado por los esplenocitos no permite discriminar el tipo celular responsable de dicha secreción, se decidió estudiar si las células T CD4⁺ y CD8⁺ eran la fuente de producción de esta citoquina. Para ello se realizó una re-estimulación específica *in vitro* de los esplenocitos de ratones con un lisado de *B. bovis*, el cual contiene las proteínas que conforman el rMABbo en forma nativa. Luego se trataron los esplenocitos con Brefeldina A para frenar el tránsito de proteínas de secreción y luego se marcaron las células con anticuerpos monoclonales contra los receptores CD4⁺ o CD8⁺ presentes en la membrana de los linfocitos. Posteriormente a fijar las células con para-formaldehído al 2%, se realizó una marcación intracitoplasmática con anticuerpos específicos para la citoquina IFN γ .

En el citómetro de flujo se establecieron los parámetros correspondientes a la morfología de las células que, según el tamaño relativo (*forward scatter* – FSC) y la granulosidad (*side scatter* - SSC) permite seleccionar la región de células viables al momento de la medición junto con la población de interés, que en este caso son todos los linfocitos T. Además, se fijaron los parámetros de fluorescencia de cada fluoróforo, con los controles correspondientes.

De los resultados de la citometría, se pudo observar que los ratones inmunizados con el esquema P - rMVA mostraron un mayor porcentaje de células T CD4⁺ y CD8⁺ antígeno específicas y productoras de IFN γ que los otros grupos inmunizados ($p < 0.01$, ANOVA de una vía con post-test de Bonferroni; **Figura 11 A y B**).

Un porcentaje inespecífico mínimo de células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN γ fueron detectados en todos los grupos experimentales re-estimulados con medio RPMI. Este resultado se grafica en todos los grupos para permitir la comparación entre el estímulo específico proporcionado por los antígenos nativos del parásito del que no lo es.

La magnitud de la respuesta de las células T también se puede visualizar calculando el número absoluto de CD4⁺ y CD8⁺ secretores de IFN γ por millón de esplenocitos (**Figura 11 C y D**). Este cálculo se obtiene teniendo en cuenta la frecuencia relativa y cantidad de células viables por cada muestra corrida, y la cantidad de células totales de cada bazo de ratón. De esta manera, se puede obtener un dato absoluto a razón de un millón de esplenocitos. Dado que este cálculo expresa la misma tendencia que los porcentajes mostrados en la **Figura 11 A y B**, únicamente en el grupo que recibió el esquema P - rMVA se pudo observar un aumento de casi el doble de ambas subpoblaciones de células T antígeno específicas (> 2800 CD4⁺ - IFN γ ⁺ y > 2100 CD8⁺ - IFN γ ⁺) en comparación con el resto de los grupos y con el grupo control. Esta cuantificación se realizó para poder comparar nuestros resultados con otras publicaciones que utilizan la metodología del ELISPOT que permite igualmente obtener un valor absoluto de células antígeno – específicas por millón de esplenocitos.

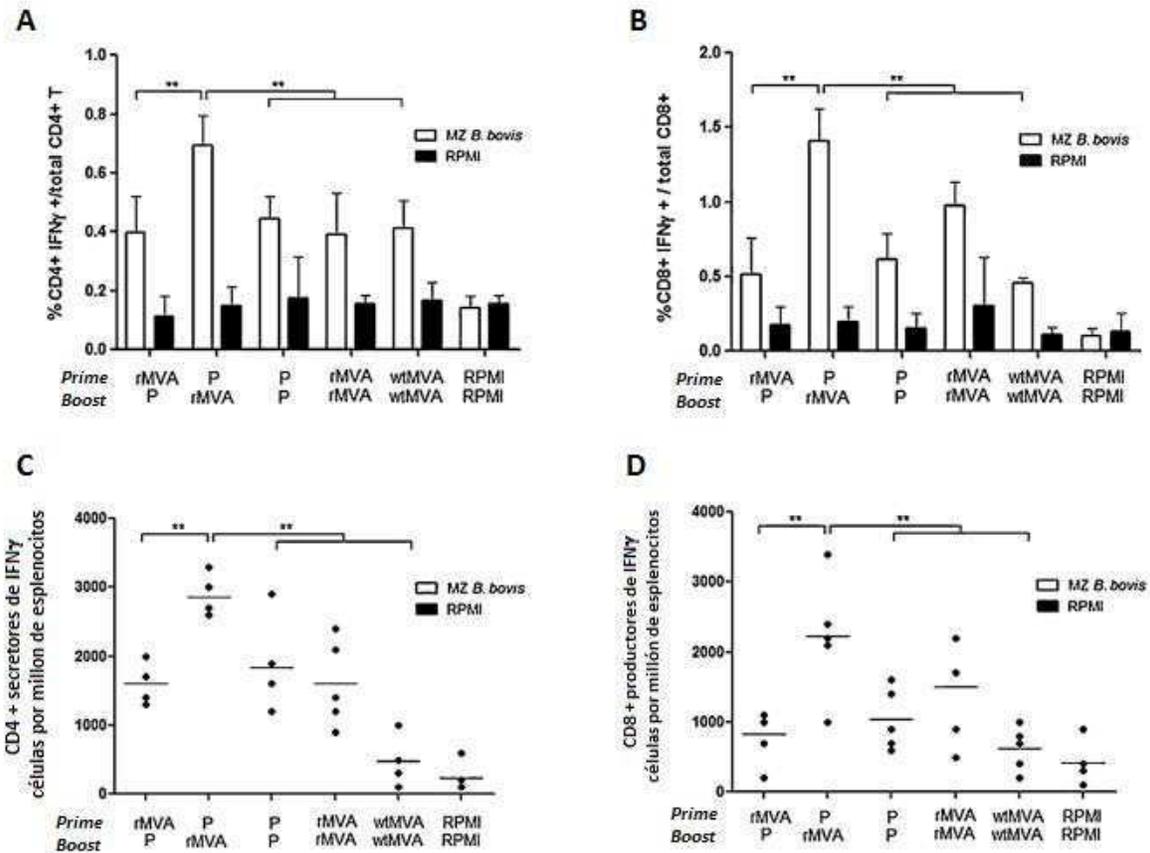


Figura 11. Respuesta celular de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ secretores de IFN γ , en ambos esquemas de inmunización “prime – boost” homólogos como heterólogos. A y B. Frecuencia de linfocitos T IFN γ ⁺, CD4⁺ o CD8⁺. Las células fueron marcadas con anticuerpos anti CD4-FITC o anti CD8-PE y luego intracelularmente con el anticuerpo anti IFN γ - APC. En todos los casos se adquirió un mínimo de 5x10⁴ eventos. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes y están representados como promedio \pm SD. Los resultados fueron estadísticamente significativos a ** $p < 0,05$ por ANOVA de una vía y post ensayo de Bonferroni. C y D. Los números de células T antígeno-específica, secretoras de IFN γ , CD4⁺ y CD8⁺ por millón de esplenocitos fueron calculados de los datos de las frecuencias tomadas de A y B. El número total de células viables/bazo fueron calculadas considerando el número de linfocitos viables obtenidos de los gráficos FSC y SSC. El número de células CD4⁺ o CD8⁺ - IFN γ ⁺ fue calculado de este valor y expresado por millón de esplenocitos.

4.4.2 Esquemas de inmunización “*prime – boost*” heterólogos de los vectores virales y el rMABbo.

Los primeros experimentos de candidatos vacunales contra enfermedades infecciosas, entre ellas causadas por parásitos intracelulares como *P. falciparum* o *L. infantum* tenían en cuenta estrategias de inmunización en ratones con proteínas recombinantes o vacunas a DNA. Más recientemente, ha habido un interés creciente en la experimentación con adenovirus recombinantes como candidatos vacunales, dado su capacidad de inducir una fuerte respuesta humoral. Además, de los numerosos ensayos realizados años atrás, se ha demostrado la capacidad de los virus MVA a inducir una buena respuesta celular, cuando estos son administrados como “*boost*” en esquemas heterólogos.

En virtud de estos antecedentes, es que decidimos realizar experimentos de inmunización con un adenovirus recombinante para poder comparar su inmunogenicidad con el rMABbo. Entonces, se evaluó la capacidad inmunogénica inducida por el “*prime*” con el virus rAd o con el rMABbo en combinación con un “*boost*” de virus rMVA. Este nuevo esquema incluyó un intervalo de tiempo del doble a los inicialmente evaluados, con el fin de poder estudiar la permanencia de la respuesta en tiempo, característica fundamental en el desarrollo de una vacuna.

A los 60 días de la primera inmunización, se observaron altos títulos de IgG total específicas contra el rMABbo (1:6400), para ambos grupos rAd – rMVA y rMABbo – rMVA (**Figura 12A**).

Si bien la cinética de anticuerpos IgG resulta más elevada para el grupo rMABbo – rMVA antes del “boost”, finalmente a los 60 días los niveles de anticuerpos detectados llegaron a ser iguales para ambos grupos heterólogos.

También se caracterizó la producción de los isotipos IgG1 e IgG2a para cada esquema. El grupo rAd – rMVA mostró una mayor proporción de IgG2a sobre IgG1, lo que sugiere una tendencia a la respuesta Th1. Es interesante notar que esta proporción se vio aumentada casi 3 veces esta relación con el grupo rMABbo – rMVA que mostró una relación de isotipos más balanceada (**Figura 12B**).

También se cuantificaron los niveles de IFN γ secretados en los sobrenadantes de esplenocitos de ratón. En estos experimentos ya se contaba con la proteína rMABbo purificada por lo tanto las células fueron re-estimuladas tanto con de *B. bovis* como con rMABbo purificado a fin de evaluar la utilidad de la proteína recombinante como estímulo específico. Los resultados mostraron niveles significativos de IFN γ para el grupo rAd – rMVA en comparación con el grupo rMABbo – rMVA y con los grupos control ($p < 0.001$; **Figura 12C**). Respecto de los estímulos específicos, en este ensayo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el rMABbo purificado y el extracto de .

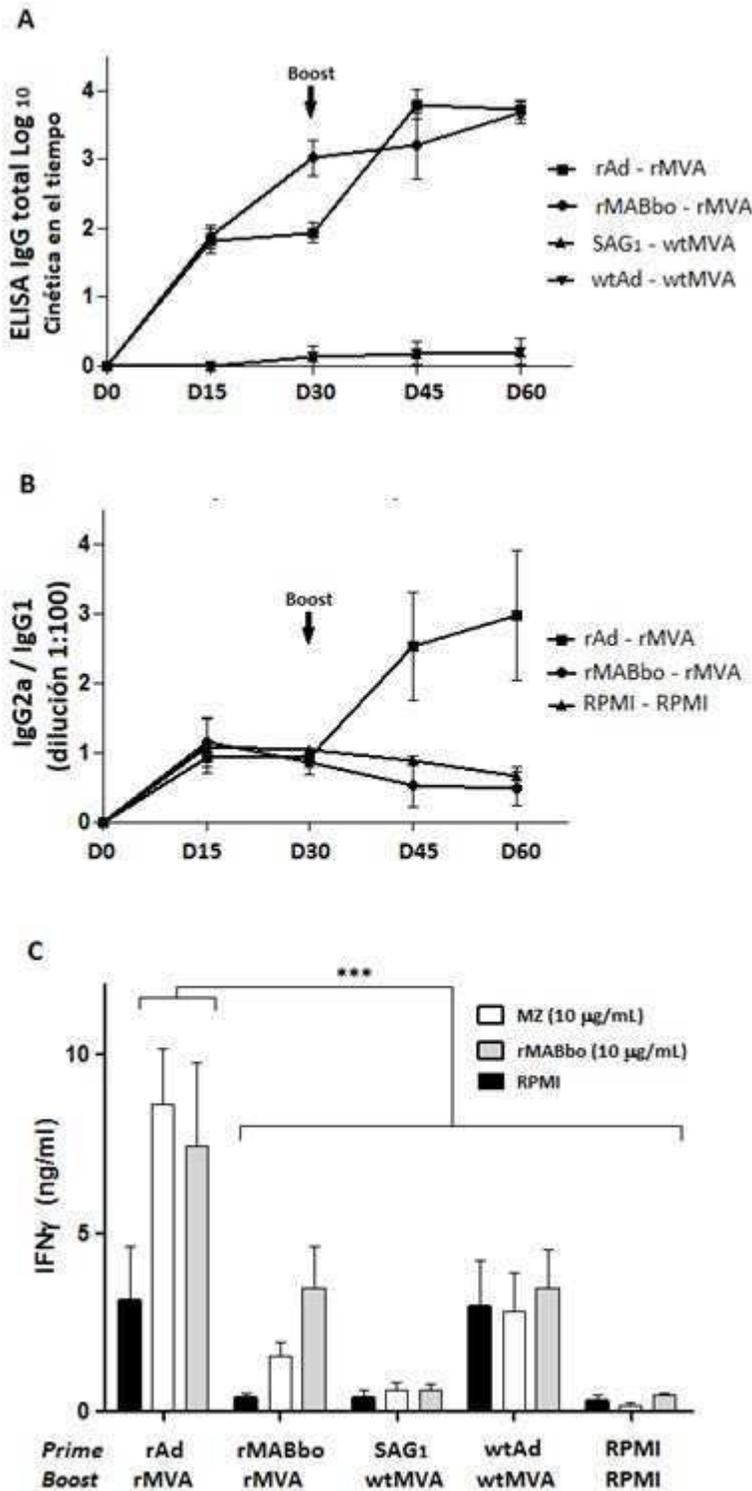


Figura 12. Evaluación de la respuesta inmune en los esquemas “prime – boost” heterólogos. En todos los casos los ratones BALB/c recibieron una primera dosis al día 0 y 30 días después, la segunda inmunización. El suero se colectó cada 15 días para la evaluación de anticuerpos por ELISA indirecto. **A.** Cinética del tiempo de IgG total usando el rMABbo como antígeno. **B.** Comparación de la relación de isotipos IgG2a/IgG1 para cada grupo de inmunización. **C.** Niveles de IFN γ secretados en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos re – estimulados 72 hs. *** $p < 0,001$ en comparación entre los grupos indicados.

Posteriormente, se caracterizaron por marcación intracitoplasmática los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de dos citoquinas características del perfil Th1: IFN γ y TNF α . La marcación se realizó para cada citoquina y también para ambas de manera de determinar la cantidad de linfocitos T polifuncionales.

El análisis de la citometría de flujo permitió observar que ambos esquemas mostraron frecuencias estadísticamente significativas de linfocitos T CD4⁺ productores tanto de IFN γ como de TNF α , en comparación con los grupos control ($p < 0.001$, **Figura 13 A y B**). Un porcentaje inespecífico mínimo de células T CD4⁺ productoras de estas dos citoquinas fueron detectados en los grupos experimentales re-estimulados con medio RPMI.

De manera análoga al análisis realizado para los gráficos de la **Figura 11 C y D**, se calculó el número absoluto de CD4⁺ secretores de IFN γ y de TNF α por millón de esplenocitos (**Figura 13 C y D**).

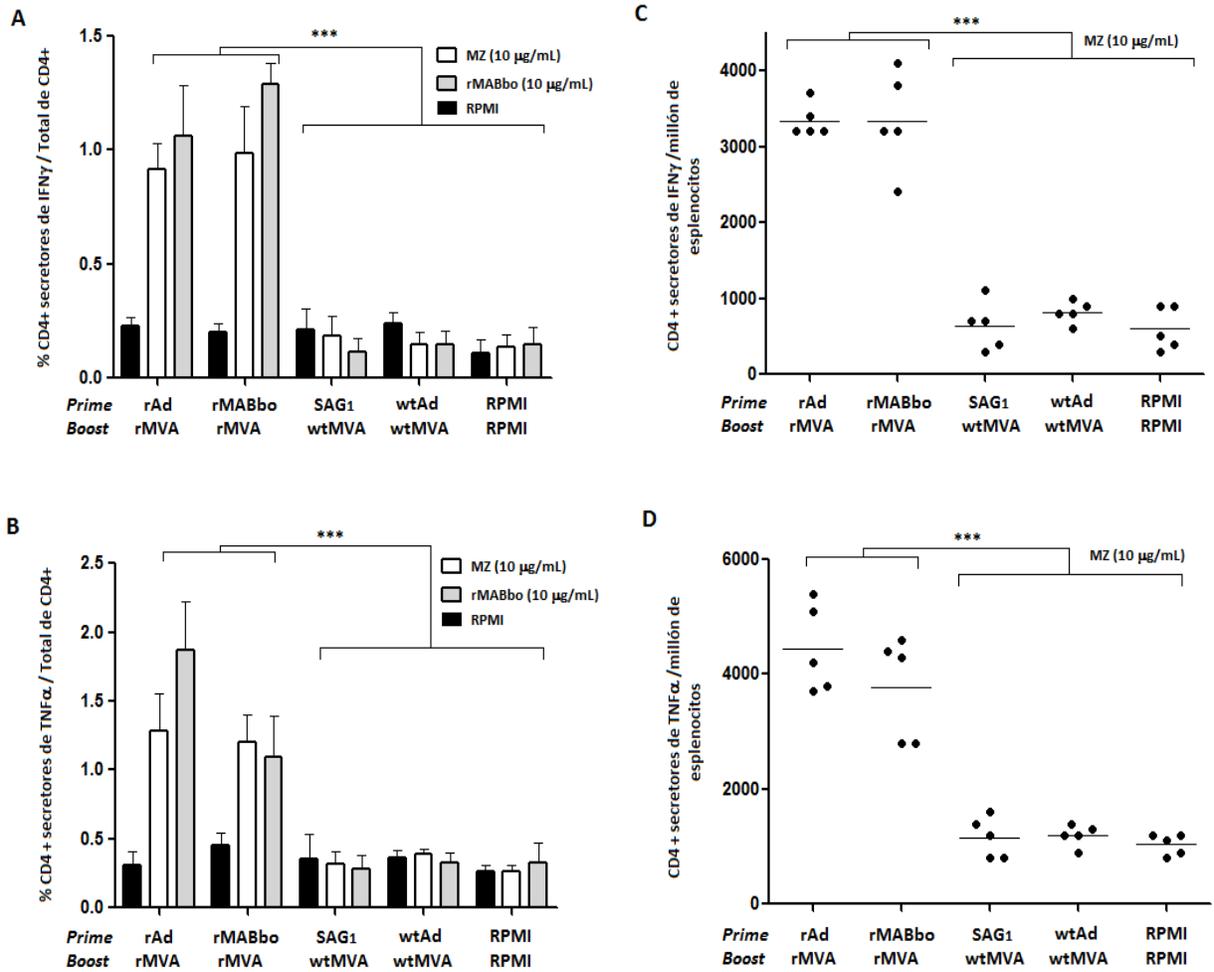


Figura 13. Evaluación de la respuesta T CD4⁺ en los esquemas “prime – boost” heterólogos. A y B. Frecuencia de células productoras de IFN γ o TNF α . Las células fueron marcadas con anticuerpo anti CD4 – FITC y luego marcadas intracelularmente con anti IFN γ – APC o TNF α – PerCyP 5. 5 (ambos Pharmigen). En todos los casos, se tomaron hasta un total de 350000 eventos. Los resultados están expresados como el promedio \pm el desvió estándar. *** $p < 0,001$, con ANOVA de una vía y post – test de Bonferroni. **C y D.** Número de linfocitos CD4⁺ antígeno específico expresados por millón de esplenocitos. El número fue calculado teniendo en cuenta el total de linfocitos viables obtenidos del gráfico de ejes de FSC y SSC del citómetro y los porcentajes de las frecuencias mostradas en A y B.

La marcación intracitoplasmática permitió además identificar aquellos linfocitos CD4⁺ secretores de ambas citoquinas (**Figura 14A**).

Ambos grupos rAd – rMVA y rMABbo – rMVA mostraron frecuencias estadísticamente significativas de CD4⁺ antígeno – específicos en comparación con los grupos control. En la **Figura 14B** se muestra el número de CD4⁺ - IFN γ ⁺ y TNF α ⁺/ millón de esplenocitos.

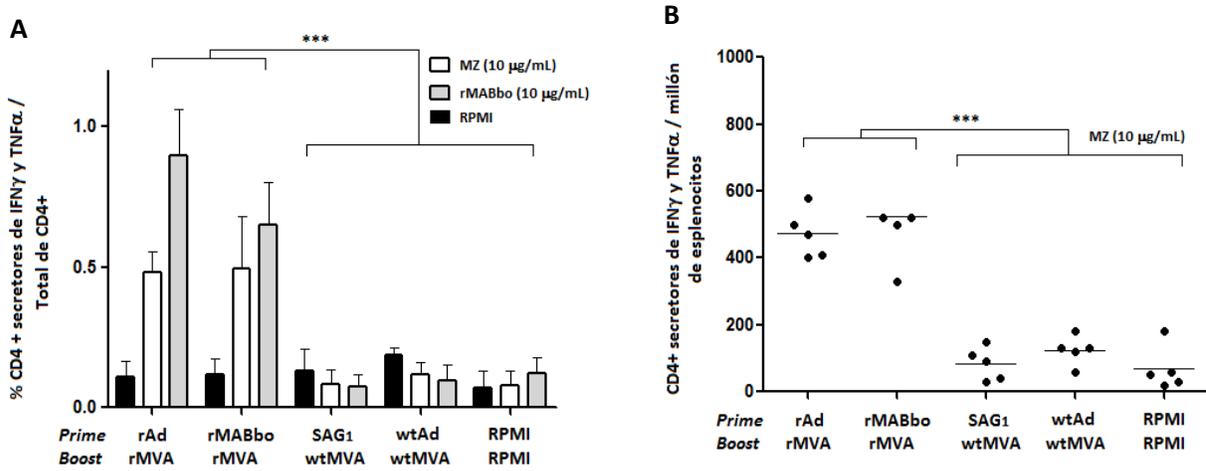


Figura 14. Células T CD4⁺ productoras de ambas citoquinas. A. Frecuencias de CD4⁺ positivas para IFN γ y TNF α a los 60 días después de la primera inmunización. **B.** Número de CD4⁺ antígeno específico secretores de ambas citoquinas por millón de esplenocitos.

De igual manera que para la respuesta CD4⁺, el análisis de la citometría de flujo permitió observar altas frecuencias de linfocitos CD8⁺ productores de IFN γ o de TNF α para ambos grupos (**Figura 15 A y C**, $p < 0.001$) pudiéndose observar además altos números de CD8⁺ productores de estas citoquinas, con valores por encima de las 1100 células CD8⁺ productores de IFN γ o 2000 de TNF α /millón de esplenocitos (**Figura 15 B y D**).

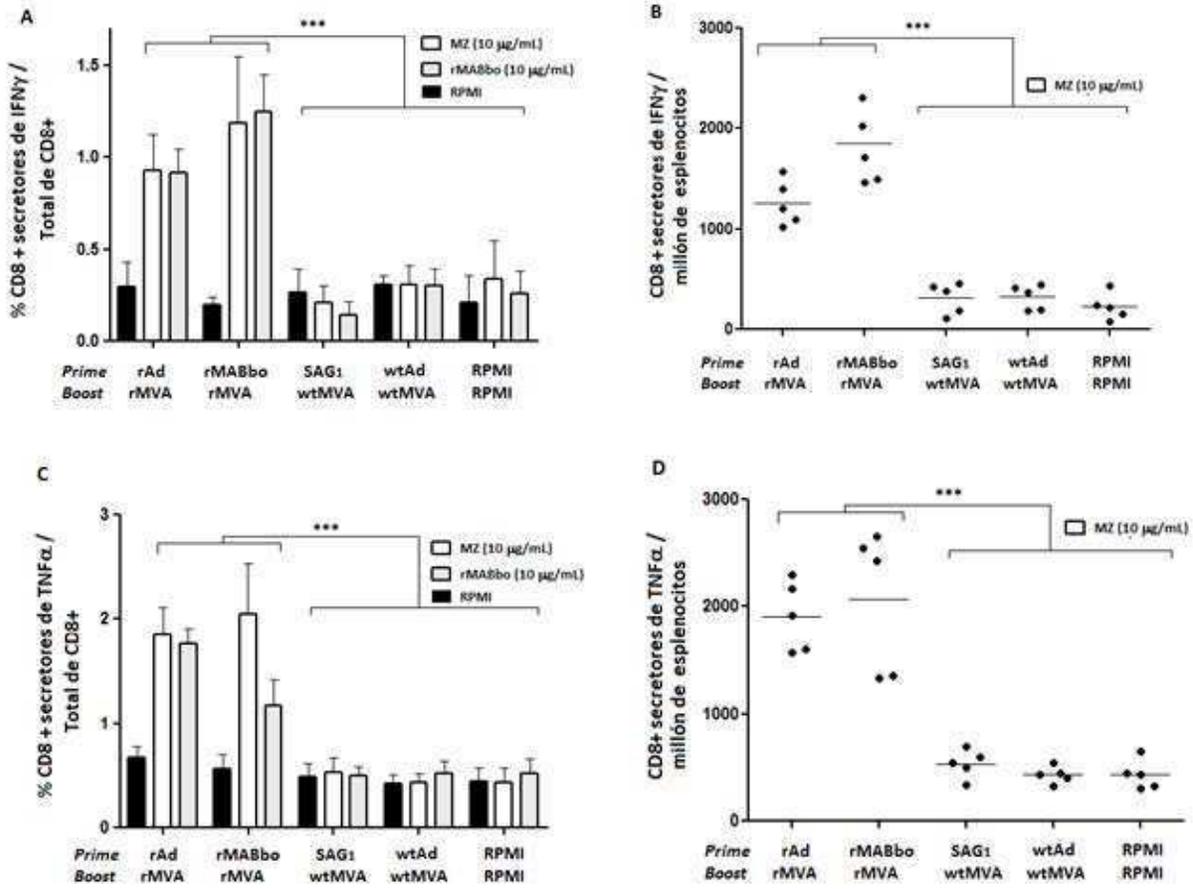


Figura 15. Evaluación de la respuesta T CD8⁺ en los esquemas “prime – boost” heterólogos. A y B. Frecuencia de células productoras de IFN γ o TNF α . Las células fueron marcadas con anticuerpo anti CD8 - PE y luego marcadas intracelularmente con anti IFN γ – APC o TNF α – PerCp 5. 5 (ambos Pharmigen). En todos los casos, se tomaron hasta un total de 350000 eventos. Los resultados están expresados como el promedio \pm el desvío estándar. *** $p < 0,001$, con ANOVA de una vía y post – test de Bonferroni. **C y D.** Número de linfocitos CD8⁺ antígeno específico expresados por millón de esplenocitos, calculados de la misma manera que para CD4⁺.

También se observó un número elevado de estos linfocitos productores de ambas citoquinas (**Figura 16 A y B**), en comparación con los grupos control.

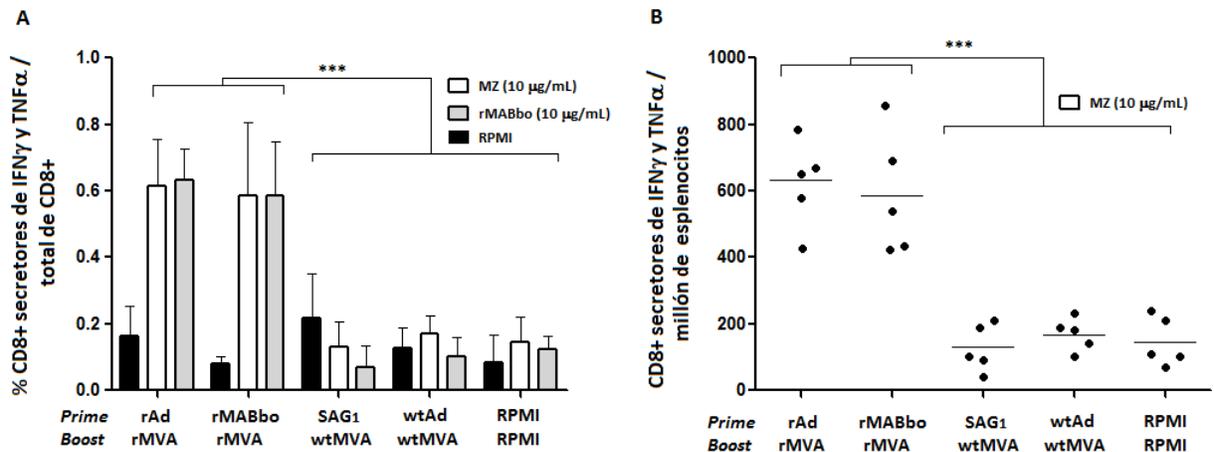


Figura 16. Células CD8⁺ productoras de ambas citoquinas IFN γ y TNF α . **A.** Frecuencia de células productoras de ambas citoquinas a los 60 días de la primera inmunización. **B.** Número de CD8⁺ polifuncionales por millón de esplenocitos calculado tomando las frecuencias obtenidas en A. *** $p < 0.001$, con ANOVA de una vía, post test de Bonferroni.

Por último, utilizando estos mismos inmunógenos se analizó la respuesta inmune inducida por estos esquemas, considerando intervalos más prolongados aún que los 30 días entre una dosis y otra. De esta manera, estos ensayos permiten evaluar la persistencia de la respuesta inmune inducida luego de 120 días de la primera inmunización, y por ende arrojarían información interesante sobre la potencia de una vacuna en animales de experimentación.

A los 120 días de la primera inmunización, ambos grupos rAd – rMVA y rMABbo - rMVA mantienen títulos de IgG específicos similares a los observados en el esquema “*prime*” día 0 – “*boost*” día 30, indicando la persistencia de esta respuesta a lo largo del tiempo (**Tabla 1**). De manera análoga, se detectaron proporciones similares de IgG2a e IgG1, indicando una respuesta más balanceada de isotipos. En la misma tendencia, los niveles de IFN γ secretados por los esplenocitos re – estimulados con merozoítos disminuyeron drásticamente en comparación con el día 60 en los esquemas anteriores. Aún así, se pudieron detectar niveles de IFN γ secretados, mientras que los niveles de esta citoquina para el re – estímulo con rMABbo dieron valores basales comparables al control (re – estímulo solo con RPMI incompleto).

Esto mismo ocurrió con las frecuencias de CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN γ , donde los valores decayeron drásticamente y no presentaron diferencias significativas en comparación con los grupos controles.

Intervalo entre el <i>prime</i> y el <i>boost</i>	rAd - rMVA				
	Título IgG Log 10	IgG2a/IgG1	IFN γ (ng/mL)	% CD4 +	% CD8 +
30 días	3.5	3	(8 \pm 1.7)***	(1 \pm 0.13)	(0.9 \pm 0.1)
60 días	4	1.5	(2.5 \pm 0.4)	0.0020	0.0017
Intervalo entre el <i>prime</i> y el <i>boost</i>	rMABbo - rMVA				
	Título IgG Log 10	IgG2a/IgG1	IFN γ (ng/mL)	% CD4 +	% CD8 +
30 días	3.5	1	(2 \pm 0.16)	(0.9 \pm 0,1)	(1.2 \pm 0.1)
60 días	3.5	1	(2.1 \pm 0.23)	0.0017	0.0019

Tabla 1. Un grupo de animales fue sacrificado a los 60 días de la primera inmunización y otro grupo de animales a los 120 días. La tabla muestra la comparación de la respuesta humoral y celular entre ambos intervalos. La cuantificación de IFN γ secretado en el sobrenadante de los esplenocitos re – estimulados con merozoítos mostró solo diferencias significativas para el grupo rAd – rMVA entre un intervalo de inmunización más largo (“*prime*” día 0, “*boost*” día 60) y el otro (“*prime*” día 0, “*boost*” día 30). Se muestra el promedio \pm el desvío estándar *** $p < 0.001$ para el ANOVA de una vía con post – test de Bonferroni.

4.5 Evaluación del rMABbo como antígeno de diagnóstico.

Un resultado que nos llevó a pensar en la potencialidad del multiantígeno recombinante expresado en *E. coli* para su uso diagnóstico fue el hecho de que los sueros de bovinos infectados experimental y naturalmente con *B. bovis* eran capaces de reaccionar positivamente en ensayos de WB cuando el rMABbo expresado en bacterias era fijado a la membrana de nitrocelulosa (**Figura 8C**). Este resultado también se evidenció para los sueros bovinos utilizados en los WBs de FEPs infectados con el rMVA (**Figura 2C**). Como se vio anteriormente, todos estos sueros provenientes de diferentes individuos revelaron una misma banda reactiva del tamaño esperado del rMABbo.

En base a estas observaciones, decidimos evaluar la capacidad de detección del rMABbo en un formato ampliamente difundido en el laboratorio de diagnóstico como es un ELISA indirecto. Para estos estudios decidimos utilizar un mayor número de sueros de animales infectados de diferentes regiones geográficas donde las condiciones ecológicas son propicias para que la garrapata vector pueda desarrollarse y, eventualmente transmitir babesiosis bovina.

Para llevar adelante esta evaluación, se pusieron a punto diferentes condiciones del ELISA. Primeramente se tituló el antígeno para optimizar la cantidad necesaria de uso.

Simplemente se realizó dilución seriada del antígeno y en forma perpendicular una dilución única, en este caso de un pool de sueros positivos al ELISA de referencia que utiliza lisado de merozoítos como antígeno de pegado a la placa. La concentración óptima de pegado a la placa en la que la absorbancia medida a 450 nm es máxima, se estableció en 20 ng/well.

También se probaron diferentes soluciones de bloqueo, resultando adecuada la solución de bloqueo compuesta por PBS 1X – 0.05% Tween, 5% de leche descremada – 10% de extracto bacteriano de un cultivo toda la noche de *E. coli*. En todos nuestros ensayos se utilizó una dilución 1/50 de los sueros bovinos, que es la misma dilución utilizada para el ELISA de merozoítos. Con estas condiciones se sensibilizaron varias placas con el rMABbo y se realizaron los ELISAs correspondientes.

Los sueros evaluados fueron en total 343, de los cuales 268 provenían de una zona libre de garrapatas (sueros serológicamente negativos) y 75 sueros fueron de animales vacunados con la vacuna viva contra *B. bovis* que resultaron además, positivos además al ELISA de merozoítos. Como control positivo del ELISA, se utilizó un pool de sueros de animales experimentalmente infectados con *B. bovis* y que además resultaron positivos al ELISA de merozoítos.

Con la información proveniente del ELISA de estos sueros se realizó el análisis estadístico de la curva *ROC*. Brevemente, se trata de un modelo clasificador que permite decidir cuáles de un conjunto de instancias están relacionadas o no por pertenecer a un mismo tipo o clase.

En el contexto de una prueba serológica como es el ELISA, este modelo clasificador es un sistema binario, en la que los resultados se etiquetan como sueros positivos o sueros negativos, a partir de un valor umbral o punto de corte que está determinado por los valores de sensibilidad y especificidad. Cuando estos valores son máximos, el punto de corte representa el mayor índice de Youden. Gráficamente, éste corresponde al punto de la curva *ROC* más cercano al ángulo superior-izquierdo del gráfico. Para el análisis de la curva *ROC*, se utilizó este criterio aquí mencionado. La construcción del gráfico de la curva *ROC* se realizó con el programa *MedCalc*. En la **Figura 17A** se muestra la curva obtenida luego de este análisis. El área bajo la curva, resultó ser de 0.982, (valor máximo: 1) lo que indica una excelente capacidad de discriminar entre sueros de animales verdaderamente infectados, de sueros de animales verdaderamente no infectados.

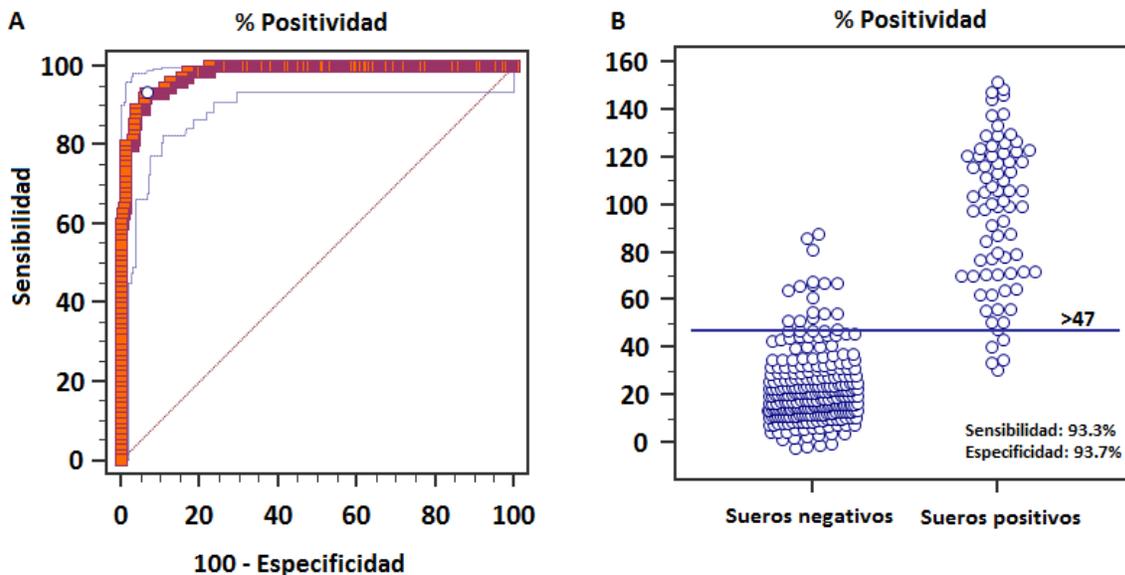


Figura 17. A. Análisis de la curva ROC para el ELISA indirecto con rMABbo como antígeno. Se grafican los valores de sensibilidad en el eje de las ordenadas y los de especificidad ($100 - E$) en el eje de las abscisas. El punto blanco en el extremo superior izquierdo (sobre la línea roja) indica el mayor índice de Youden **B.** Diagrama interactivo del análisis ROC en el que se grafican los % alcanzados para los sueros negativos ($n= 268$) y los sueros positivos ($n= 75$). La línea azul horizontal indica el punto de corte seleccionado con una valor máximo de sensibilidad y especificidad de 93.3% y 93.7% respectivamente.

El programa posibilita graficar además un diagrama interactivo en el que el operador puede mover la línea horizontal que indica el punto de corte y de esa manera establecer valores de sensibilidad y especificidad que se ajusten a la necesidad específica del laboratorio que realiza el diagnóstico (**Figura 17B**). Considerando los mayores valores de especificidad y sensibilidad encontrados (de 93.7% y 93.3% respectivamente, con un intervalo de confianza del 95%), se estableció un punto de corte de 47% de positividad. Con este valor umbral sólo 5 sueros resultaron ser falsos negativos y 16 falsos positivos del total de 343 sueros de bovinos.

Una vez establecido el punto de corte, se evaluaron sueros de campo de diferentes regiones enzoóticas, es decir provenientes de bovinos que habitan en regiones donde la transmisión vectorial es activa. En este grupo de sueros se incluyeron muestras tanto de Argentina como de la Guyana Francesa, dado que tuvimos acceso a las mismas a través de una colaboración de nuestro laboratorio con el CIRAD de la isla Guadalupe. Los resultados se resumen en la **Tabla 2**.

De un total de 89 sueros provenientes de la Provincia de Corrientes, 33 de ellos (37%) resultaron positivos. Por otro lado, de un total de 46 sueros provenientes de Misiones, 26 de ellos (56.5%) resultaron positivos al ELISA – rMABbo. Por otra parte, de un total de 317 sueros provenientes de la Guyana Francesa, 173 (54.5%) resultaron ser positivos.

Origen de los sueros	Positivos	Negativos	Total
Corrientes, Argentina	56	33	89
Misiones, Argentina	26	20	46
Guyana Francesa	173	144	317

Tabla 2. Resultado serológicos de los sueros analizados provenientes de regiones enzoóticas para *B. bovis*.

Estos resultados muestran que si bien ambas regiones son muy distantes geográficamente, la seroprevalencia es similar en ambos países con características ecoepidemiológicas comunes para la presencia de la garrapata vector.

Dado que *B. bovis* y *B. bigemina* son protozoarios transmitidos por la misma garrapata vector y que pertenecen al mismo género, podrían compartir varios antígenos. En este sentido, es necesario probar la reacción cruzada entre ambos cuando se quiera desarrollar una prueba diagnóstica que sea especie específica.

Para ello, se evaluó la existencia de reacción cruzada con sueros de animales que resultaron positivos a *B. bigemina* y también a *A. marginale*, una rickettsia intraeritrocitaria transmitida también por la misma garrapata vector.

Estos sueros fueron cedidos por el laboratorio de Inmunología de la EEA – INTA Rafaela y fueron previamente analizados por los ELISAs específicos de cada especie en donde se determinó que son positivos a sólo uno de los patógenos.

De los 22 animales positivos solamente a *B. bigemina*, 12 de ellos mostraron un porcentaje de positividad por encima del 47%, mostrando una reacción cruzada con el ELISA indirecto de rMABbo. De los 6 sueros de animales infectados con *A. marginale*, ninguno de ellos reaccionó contra el antígeno rMABbo.

A fin de evaluar el grado de acuerdo entre el método de rutina utilizado por el laboratorio especializado en babesiosis bovina y el ELISA indirecto basado en el rMABbo aquí desarrollado, se realizó un test de concordancia utilizando el Índice *Kappa de Cohen*, el cual es una medida de la concordancia entre dos evaluadores para determinar un mismo valor. Si el valor de *Kappa* es 1, esto significa que hay total concordancia en lo que observan ambos evaluadores.

En nuestro caso, el índice resultó ser de $k: 0,821$, mostrando un alto nivel de concordancia entre una técnica y otra ($0.8 < k \leq 1$; *muy buen acuerdo*).

Esto significa que de un total de 343 sueros, solo 22 mostraron discrepancia entre ambos ELISAs, dado que 16 de ellos resultaron positivos para el ELISA – rMABbo pero negativos para el ELISA de y 6 de los 22 discrepantes resultaron negativos para el ELISA – rMABbo pero positivos para el ELISA de referencia. (**Tabla 3**).

ELISAI - MZ	ELISAI - rMABbo		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	69	6	75
Negativos	16	252	268
Total	85	258	343

Tabla 3. Tabla de concordancia entre los resultados serológicos del ELISA indirecto con el rMABbo y el ELISA indirecto de merozoítos, de uso actual en la serología para babesiosis.

5 Discusión.

La vacunación con cepas vivas atenuadas de los parásitos protozoarios *Babesia bovis* y *B. bigemina* sigue siendo el método de prevención más eficaz para conferir protección contra la babesiosis bovina. Si bien una sola dosis es capaz de conferir protección durante toda la vida útil del bovino, estas vacunas presentan los inconvenientes y desventajas propias de las vacunas vivas. Una de las desventajas que por el momento ha sido sorteada, es mantener en nitrógeno líquido la vacuna viva. Si bien esta mejora tecnológica supone un avance en cuanto al mayor tiempo de conservación, la preparación implica utilizar el triple de eritrocitos infectados a fin de conferir la misma eficacia de protección que la versión refrigerada. Por tanto, el costo en la elaboración y el riesgo de contaminación son aún inconvenientes que resaltan la necesidad de generar nuevas plataformas vacunales seguras y efectivas que reemplacen el uso de parásitos atenuados para la vacunación contra la babesiosis bovina.

Desde finales de la década de los '80 hasta comienzos de los '90 se publicaron diferentes trabajos utilizando formulaciones vacunales contra *B. bovis* y *B. bigemina* incluyendo antígenos purificados de (Echaide et al., 1993) exoantígenos obtenidos de cultivos parasitarios (Smith et al., 1981; Montenegro-James et al., 1987) y finalmente vacunas a subunidades. Estos últimos desarrollos aprovecharon en su momento la creciente disponibilidad de las técnicas de ingeniería genética en *E. coli* para obtener antígenos recombinantes de *B. bovis* y para los cuales pudieron ser caracterizados sus epitopes de tipo B y T/CD4⁺.

Cuando estas estrategias de inmunización con proteínas recombinantes fueron evaluadas, las mismas no resultaron eficaces ya que si bien indujeron una respuesta inmune específica, las vacunas no fueron capaces de conferir protección cuando los bovinos fueron desafiados con cepas virulentas del parásito (**Hines *et al.*, 1995b; Hope *et al.*, 2005; Fish *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2010**).

La tendencia actual en el campo de la vacunología está orientada a la sustitución de vacunas vivas por vacunas de nueva generación. Este avance no solo radica en reemplazar los inmunógenos sino también en desarrollar las estrategias racionales de vacunación que resulten más eficaces. Es así que durante las últimas décadas los vectores virales no replicativos han sido postulados como excelentes candidatos vacunales frente a diversas enfermedades infecciosas, especialmente por su gran capacidad de expresar *in vivo* antígenos heterólogos y por su probada seguridad.

En este trabajo de Tesis se han desarrollado tres plataformas vacunales basadas en un multiantígeno de *Babesia bovis* y se ha evaluado su inmunogenicidad en animales de experimentación. El diseño y desarrollo de estos inmunógenos, en particular los dos inmunógenos que incluyen los vectores virales, constituyen el primer reporte sobre vacunas virales de nueva generación aplicables al control de la babesiosis bovina.

El diseño racional de una vacuna está orientado al desarrollo de inmunógenos que sean capaces de despertar una respuesta inmune efectora y de memoria, y por tanto de conferir protección frente a la exposición del patógeno.

Este diseño no solo radica en la correcta elección de los vehículos, sino en seleccionar los antígenos adecuados que despierten la protección deseada. Para dicha selección, es necesario tener presente varios aspectos de la biología del patógeno: los antígenos involucrados en el proceso de invasión a la/las células huésped/es, la diversidad antigénica de los diferentes estadios infectivos y el grado de conservación de antígenos entre la diversidad de cepas virulentas presentes en la naturaleza.

En este trabajo, se construyó un multiantígeno basado en las porciones antigénicas de tres proteínas de *B. bovis* (MABbo) en las cuales habían sido previamente caracterizados sus epitopes a nivel inmunológico. Se eligió la porción central del antígeno MSA-2c, porque su inmunodominancia fue previamente estudiada y además presenta epitopes de tipo B reconocidos en el bovino los cuales se encuentran conservados entre diferentes cepas del parásito (**Wilkowsky et al., 2003**). En nuestro caso hemos elegido un fragmento central que excluye las secuencias hidrofóbicas de anclaje a la membrana del parásito, optimizando su expresión y purificación.

También se seleccionó para la construcción del multiantígeno la proteína RAP-1, una proteína de las roptrias fundamental en el proceso de invasión al eritrocito. Esta proteína presenta un alto grado de conservación aminoacídica entre cepas geográficamente distantes de *B. bovis* (**Brown et al., 1996**) y su uso vacuna a subunidad ha mostrado reducir significativamente la parasitemia en bovinos (**Wright et al., 1992**).

En particular en nuestra construcción, se seleccionó la región N – terminal de la proteína dado que es en esta región que se ha reportado en bovinos, la presencia de epitopes de tipo *Th1* CD4⁺ (**Norimine et al., 2002**).

Es interesante destacar en estos trabajos mencionados, que tanto RAP-1 como MSA-2c han demostrado *in vitro*, la capacidad de inhibir la invasión de *B. bovis* al merozoíto, lo que indicaría que estos antígenos producen anticuerpos seroneutralizantes. También consideramos a la proteína HSP20 en el diseño del MABbo por su alto grado de conservación entre especies del género *Babesia*, y por presentar epitopes B y T previamente caracterizados (**Brown et al., 2001**).

En una primera etapa del trabajo de tesis doctoral se diseñaron los cebadores necesarios y el clonado sucesivo de los 3 fragmentos, el cual se realizó de acuerdo a técnicas estándar de ingeniería genética. También se logró clonar, expresar y purificar por separado cada proteína que conforma el MABbo en vectores de expresión procariotas de uso común. El sistema bacteriano permitió obtener altos niveles de expresión en *E. coli* de cada una de ellas con un alto grado de pureza. Esta característica resultó de vital importancia en los estudios inmunológicos posteriores tanto en su uso como inmunógeno en los distintos esquemas de vacunación ensayados como así también como sustrato para la detección de una respuesta específica a cada una de las 3 proteínas. Este resultado concuerda con trabajos previos de estos mismos antígenos los cuales habían sido obtenidos en forma recombinante con alto grado de pureza (**Brown et al., 1996; Brown et al., 2001; Wilkowsky et al., 2003**).

Por otro lado, se logró clonar, expresar y purificar el rMABbo completo en un sistema de expresión procariota. En un primer intento, se intentó subclonar la secuencia del multiantígeno en el plásmido de expresión pRSET™, pero dado que el tamaño del inserto era muy grande para este vector, resultaba difícil su clonado. Luego se intentó el clonado y expresión en el sistema Topo –Gateway™ - pDEST17™, el cual presenta varias ventajas: es un vector de mayor tamaño lo cual permite el clonado de insertos grandes, la inserción del gen de interés ocurre por una doble recombinación altamente eficiente y se usa Arabinosa al 0,2% para la inducción de la proteína recombinante, lo cual abarataría los costos del escalado en comparación con otros inductores como el IPTG. De manera similar a lo que ocurrió con las 3 proteínas individuales que componen la quimera, el rMABbo se expresó en muy buenas cantidades (> 1 mg/mL) en el sistema procariota utilizado, con alto rendimiento en la purificación a baja escala en cultivos de 100 mL, lo que permitió un grado adecuado de pureza para los experimentos realizados en este trabajo de Tesis.

Si bien el nivel de expresión y purificación fue altamente satisfactorio para las necesidades del trabajo, resultaba crucial determinar la conservación de los epitopes B de los 3 fragmentos de las proteínas que conforman el rMABbo, ya que en la conformación final de la poliproteína quimérica, los mismos pudieron haber sido alterados, dificultando su reconocimiento por el sistema inmune del mamífero. Este resultado se confirmó en nuestra construcción cuando los anticuerpos obtenidos experimentalmente contra las proteínas recombinantes MSA-2c, RAP-1 o HSP20 reconocieron en WBs una banda reactiva del tamaño teórico esperado de 72 kDa.

Este resultado demuestra que los epitopes B inmunodominantes de cada antígeno seleccionado permanecen expuestos incluso después de que los 3 fragmentos de genes se fusionaron para codificar una única poliproteína. Para confirmar aún más este resultado, los anticuerpos presentes en los sueros de bovinos infectados natural y experimentalmente con *B. bovis* reconocieron una misma banda reactiva de 72 kDa correspondiente al tamaño esperado del rMABbo, indicando que además se conserva la inmunodominancia de epitopes B presentes en el parásito en la construcción quimérica recombinante.

En el primer objetivo de este trabajo también se propuso la obtención de vectores virales que expresen *in vivo* el MABbo. A través de técnicas habituales de ingeniería genética y virología, se logró subclonar el gen quimérico MABbo en el vector viral de transferencia para MVA y realizar las transfecciones en células permisivas infectadas a su vez con el MVA *wild type*. Luego de 9 pasajes se obtuvieron *stocks* virales homogéneos en donde se confirmó la identidad y la correcta expresión de esta proteína quimérica por secuenciación y por pruebas inmunológicas específicas. Pudimos obtener además rendimientos aceptables en la purificación por ultra centrifugación en colchón de sacarosa de virus MVA, tanto *wild type* como recombinante.

Una de las ventajas de proponer una vacuna basada en un poxvirus, es que la misma usa la maquinaria celular eucariota para expresar los antígenos con una conformación similar a la encontrada en el parásito. En este trabajo se muestra que el MABbo se expresa adecuadamente en las células infectadas con el rMVA.

Se confirma nuevamente que los epitopes de las células B están conservados, ya que en los ensayos de *WBs*, los anticuerpos contra los antígenos MSA-2c, RAP-1 y HSP20 expresados en *Escherichia coli* pueden reconocer al MABbo expresado en células eucariotas.

Este mismo resultado se confirma además cuando los anticuerpos contra HSP20 (el último fragmento expresado en la quimera) reconocen al MABbo en el citoplasma de células PK15 infectadas con rMVA, lo que indirectamente demuestra que los otros dos fragmentos antigénicos ubicados río arriba de la construcción quimérica (MSA2-c y RAP-1) también se expresan.

Los anticuerpos pueden reconocer epitopes lineales o epitopes conformacionales. Si bien está ampliamente aceptado que, en una corrida electroforética desnaturizante como es el SDS – PAGE, los epitopes conformacionales pierden su estructura tridimensional y por tanto solo los epitopes lineales son reconocidos, existe evidencia que demuestra que no necesariamente esto ocurre así. Zhou y colaboradores (2007), lograron demostrar que anticuerpos monoclonales que reconocen epitopes inicialmente conformacionales, son capaces de reaccionar en un *WB* contra sus antígenos separados por SDS –PAGE en condiciones desnaturizantes (**Zhou et al., 2007**). Sobre la base de estos antecedentes, nuestros resultados de *WB* no nos permiten inferir que se estén reconociendo solo los epitopes lineales de cada fragmento del MABbo.

Sin embargo los epitopes conformacionales del multiantígeno se mantienen conservados y esto se evidencia en la inmunofluorescencia de las células infectadas por el rMVA (células PK -15) y en las infectadas por el rAd (células HEK 293A).

Asimismo, la inmunodominancia de los epitopes B incluidos en el MABbo pudo ser confirmada cuando los anticuerpos presentes, tanto en los animales infectados de manera natural como los infectados experimentalmente con *B. bovis*, reconocieron una banda única de 72kDa correspondiente al tamaño esperado del polipéptido quimérico expresado por las células infectadas por el MVA.

Estos resultados confirman que efectivamente diseñamos el MABbo con antígenos conservados entre cepas ya que no solo los animales vacunados con la vacuna para *B. bovis* basada en la cepa R1A atenuada (animales experimentales) reconocieron la proteína quimérica sino que los bovinos de campo infectados con otras cepas virulentas circulantes también poseen anticuerpos que reconocen la quimera. Como se mencionó anteriormente, está bien documentada la conservación de epitopes B en las 3 proteínas que conforman el MABbo entre cepas distantes geográficamente de *B. bovis* por lo que el MABbo aquí diseñado tiene el potencial de ser utilizado no solo localmente sino también en otras regiones geográficas donde la problemática de la babesiosis bovina por *B. bovis* se encuentre presente.

De igual manera que para el rMVA, se obtuvieron *stocks* homogéneos del rAd y se confirmó la correcta identidad y expresión de esta proteína quimérica en las células infectadas por este virus utilizando anticuerpos contra la última porción de la quimera indicando nuevamente su completa expresión.

El rendimiento de purificación por ultra centrifugación en colchón de sacarosa resultó adecuado, obteniendo títulos similares - del orden de 1×10^9 UFP/mL - a los esperados según el manual *Virapower™ Adenoviral expression System* y a otros trabajos que usaron protocolos similares (**He et al., 1998**).

En la siguiente etapa de este trabajo se evaluaron en paralelo esquemas homólogos y heterólogos de inmunización utilizando el rMVA y las 3 proteínas con intervalos de 14 días entre una dosis y otra.

Cabe destacar que estos dos inmunógenos fueron obtenidos en una etapa previa al rAd y el rMABbo, de manera que al momento de realizar los ensayos en ratones solo contábamos con el rMVA y las 3 proteínas.

Los resultados de los primeros ensayos de inmunización homólogos mostraron que dos dosis del virus rMVA son capaces de inducir niveles significativos de la citoquina IFN γ en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos re-estimulados.

Este resultado coincide con otras publicaciones que muestran que los poxvirus son capaces de inducir una respuesta mayormente celular contra antígenos de *P. falciparum* sintetizados *de novo* en el citoplasma de las células infectadas (**Webster et al., 2005**). En

particular, el laboratorio de Virus Animales de nuestro Instituto ha diseñado diferentes vectores MVA recombinantes que codifican para antígenos virales, obteniendo resultados similares a los mostrados aquí (**Ferrer et al., 2011; Zanetti et al., 2012**). En resumen, los resultados aquí mostrados se suman a la evidencia previa que demuestra que el efecto estimulador de la respuesta inmune celular es provisto no sólo por el antígeno heterólogo sino además por la capacidad adyuvante del propio MVA.

La marcación intracelular de citoquinas y el análisis por citometría de flujo permitió identificar la fuente celular de esta citoquina, pudiendo identificar que ambos tipos de LT la secretaban y que el porcentaje de células CD8⁺ resultó ser el doble que el de CD4⁺. Los primeros trabajos sobre el uso de MVA recombinantes como vacunas reportaban la inducción de una respuesta principalmente citotóxica debido al mecanismo de inmunidad antiviral despertado por el huésped en la que se encuentran involucradas la vía endógena de procesamiento antigénico y la presentación de los péptidos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Sin embargo, nuevas evidencias demuestran la capacidad de estos virus de despertar también una respuesta T de tipo CD4⁺ siendo esto consistente con trabajos previamente comentados en esta Tesis (**Thiele et al., 2015**).

Como se mencionó anteriormente, el grado de pureza de los inmunógenos a evaluar en experimentos de inmunización es importante ya que en estos ensayos se evalúa una respuesta antígeno-específica y las trazas de impurezas pueden alterar la medición de la respuesta.

El método de purificación por ultra centrifugación en colchón de sacarosa empleado en este trabajo para la purificación de los virus recombinantes es el método habitual y adaptable a las condiciones de laboratorio con las que contamos.

Es importante destacar que el virus MVA no expresa *per se* el multiantígeno quimérico pero sin embargo dado la capacidad de los poxvirus de inducir la expresión de proteínas propias y heterólogas en los FEPs o las células BHK-21 utilizadas, pueden prevalecer trazas del multiantígeno expresado como proteína celular en la fracción del *pellet* final de virus purificado.

Para ello se determinó por *WB* la presencia de estas trazas de rMABbo expresado celularmente en los *stocks* de partículas virales purificadas. En los resultados observamos que los anticuerpos contra HSP20 reconocían en la fracción del *pellet* de virus rMVA purificado una banda reactiva del peso esperado al rMABbo. Esta misma banda no estaba presente en un *WB* revelado contra una fracción de virus MVA *wild type* purificado. Este resultado indicaba que si bien ultra centrifugación en colchón de sacarosa es una metodología de rutina disponible para obtener partículas virales purificadas, aún así hay presencia de trazas de proteínas en el *pellet* final. En base a este resultado y para confirmar o descartar que la respuesta inmune específica despertada en los ratones sea resultado de la inmunización con rMVA y no como consecuencia de la estimulación antigénica con estas trazas de proteína celular del MABbo, se realizó en paralelo al grupo inmunizado con rMVA – rMVA el mismo esquema de inmunización pero con virus rMVA inactivado por calor. Este tratamiento logra inactivar la capacidad infectiva del virus y por

lo tanto impide la expresión por parte de las células de las proteínas codificadas en el genoma viral.

Los resultados mostraron solo una respuesta específica únicamente en los ratones inmunizados con rMVA biológicamente activos lo que demuestra que es el virus infectivo y viable el que tiene la capacidad de despertar la respuesta inmune específica y que la misma no corresponde a las trazas de la proteína recombinante que pueden co-purificar con el virus.

Es ampliamente conocido que el MVA es capaz de despertar mayormente una respuesta de tipo celular (**Smith and Kotwal, 2002**). Sin embargo, Wyatt y colaboradores (2004) han reportado que el virus MVA es capaz de despertar una respuesta humoral contra proteínas propias o heterólogas si la vacunación ocurre con altas dosis de estos virus, por lo menos 10 veces más a las utilizadas por nosotros (**Wyatt *et al.*, 2004**).

Nuestros ensayos muestran que en los animales inmunizados con el rMVA también se despierta una respuesta humoral específica contra las 3 proteínas aunque con títulos significativamente menores a los obtenidos cuando se utiliza el esquema homólogo con las proteínas recombinantes. El hallazgo de anticuerpos séricos a muy bajos títulos (<1:10) en el grupo inmunizado con wtMVA solamente puede deberse a la reacción inespecífica en la técnica del ELISA, dado que las células infectadas por este virus no expresan el MABbo.

En relación al esquema de dos inmunizaciones del cóctel de proteínas (P), se indujeron en los ratones altos títulos de IgG específica contra cada proteína del MABbo. La disponibilidad de las proteínas por separado permitió analizar la respuesta individual y comparar su inmunogenicidad, dado que se inmunizaron con fracciones equimolares.

En particular, tanto MSA-2c como HSP20 indujeron títulos de hasta 10 veces superiores a RAP-1. Esta diferencia puede atribuirse al hecho de que para RAP-1 solo se incluyó la región N - terminal de esta proteína para la construcción del multiantígeno, donde están presentes 10 epitopes de tipo T que han sido mapeados y caracterizados a nivel inmunológico (**Norimine et al., 2002**), mientras que los epitopes de tipo B se han encontrado en la región C- terminal de esta proteína (**Suarez et al., 1993**).

Los resultados de respuesta humoral específica observados con el esquema homólogo a subunidades concuerdan con el conocimiento ampliamente aceptado en cuanto a que la vacunación con proteínas recombinantes despierta mayormente una respuesta productora de anticuerpos aunque esta respuesta está también influenciada por el/los adyuvantes que se utilicen para co-administrar las proteínas (**Vandepapelière et al., 2005**).

Cabe recordar que la respuesta humoral en bovinos es necesaria para resolver la infección contra *B. bovis*, aunque no resulta suficiente y también es necesaria la activación del perfil celular Th1 (**Brown et al., 2006**). Es por ello que incluimos a este esquema de inmunización un adyuvante que facilite la vía de activación de dicho perfil. Se encuentra

reportado que el adyuvante completo de Freund aquí utilizado es un potente inductor de la respuesta Th1 (Coffman *et al.*, 2010).

En nuestros resultados, si bien no se detectaron niveles significativos de IFN γ secretado en esplenocitos de ratón restimulados para este grupo P - P ni tampoco diferencias en la frecuencias de linfocitos CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ productores de esta citoquina frente al control con los ratones inmunizados solo con RPMI, las cantidades detectadas podrían deberse al efecto de este adyuvante. Otros autores han observado niveles de linfocitos CD8 $^{+}$ de ratón productores de IFN γ similares a los observados aquí para un esquema homólogo P – P contra *P. falciparum* (Douglas *et al.*, 2010).

En conclusión, esquema P – P es un fuerte inductor de anticuerpos específicos pero no mostró niveles significativos de IFN γ secretados. Contrariamente, el esquema rMVA – rMVA mostró mayores niveles de IFN γ secretados y una mayor frecuencia de linfocitos CD8 $^{+}$ productores de esta citoquina pero bajos títulos de anticuerpos específicos. En efecto, estos resultados nos permiten descartar los esquemas homólogos, dado que no resultarían óptimos para conferir protección en bovinos frente *B. bovis*.

En cuanto a los esquemas de “*prime – boost*” heterólogos los resultados arrojaron datos interesantes. La combinación del rMVA y de P en ambas combinaciones (“*prime*” o “*boost*”) indujo una respuesta inmune humoral específica con altos títulos de IgG total, comparables al esquema homólogo de P – P. Los dos esquemas heterólogos además mostraron niveles estadísticamente significativos de IFN γ secretado, comparables al esquema homólogo rMVA - rMVA. En particular, el *prime* con P y el *boost* con rMVA a los

14 días de la primer inmunización, fue el esquema que además mostró una mayor proporción de IgG2a para cada proteína del MABbo y elevados porcentajes de linfocitos LT CD4⁺ y CD8⁺ secretores de IFN γ .

Existen numerosos trabajos publicados en especial en protozoarios como *Leishmania infantum* y *Plasmodium falciparum* - que al igual que *Babesia bovis* son patógenos intracelulares - en los que las estrategias de inmunización heteróloga en ratones resulta mejor que los esquemas homólogos no solo en términos de una mejor inmunogenicidad sino en cuanto a la eficacia de protección frente al desafío en este modelo experimental **(Woodland, 2004; Pérez-Jiménez *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2010)**.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos aquí en términos de optimización de la inmunogenicidad específica.

Es necesario considerar que hasta la fecha no se sabe ciertamente el mecanismo por el cual la inmunización heteróloga resulta más inmunogénica, y en algunos casos más eficaz en términos de protección, que la inmunización homóloga.

Algunas evidencias sugieren que el “boost” con un inmunógeno homólogo al “prime” desencadenaría una respuesta menos eficaz de la expansión de células T de memoria debido a la rápida eliminación del inmunógeno con el que se vacunó primero **(Lu, 2013)**.

Por el contrario, la estrategia heteróloga busca inducir el otro brazo de la respuesta adaptativa evitando esa rápida eliminación del inmunógeno e impulsando una mayor expansión de células activadas con la primera dosis **(Rollier *et al.*, 2011)**.

Una manera de abordar este desafío es determinar la importancia del orden de administración de los inmunógenos.

De ahí la importancia del modelo ratón para *B. bovis* que aunque no constituye un modelo biológico de la babesiosis, posee una serie de ventajas como por ejemplo el bajo costo respecto del uso de bovinos, la homogeneidad genética de las cepas, sumado a la gran disponibilidad de anticuerpos y la disponibilidad de *kits* de detección de citoquinas de varias compañías comerciales.

Es interesante destacar que en nuestros experimentos el uso del rMVA como “*boost*” pareciera potenciar la respuesta generada por las proteínas recombinantes demostrando que no resulta lo mismo administrar el rMVA en la primer dosis que en la segunda. Estos resultados son similares a los datos obtenidos en ensayos de inmunización en ratones contra *P. falciparum* en donde se observa que el “*boost*” con MVA potencia la respuesta (Douglas *et al.*, 2010) por lo que el efecto estaría relacionado con el sistema de expresión utilizado.

Dado que *Babesia bovis* es un parásito intraeritrocítico obligado incapaz de infectar ninguna otra célula en el mamífero, la presentación antigénica en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I - y como consiguiente la participación de la respuesta CD8⁺ - no estaría involucrada.

Este hecho pudo demostrarse para el parásito *B. microti*, otra especie de *Babesia* que infecta roedores. Igarashi y colaboradores (1999) observaron que, a ratones a los que

previamente se los había depletado de CD4⁺ o CD8⁺, y luego se los desafió con una cepa virulenta de *B. microti*, aquellos depletados con CD8⁺ (y que por tanto tenían linfocitos CD4⁺) fueron los únicos capaces de resolver la infección, indicando que la población de CD8⁺ no estaría involucrada en el control inmune contra *B. microti*. Por el contrario, aquellos ratones depletados de CD4⁺, presentaron un alto grado de parasitemia (**Igarashi et al., 1999**). De manera indirecta, estos resultados sugerirían que el rol de los LT CD8⁺ en *B. bovis* no sería relevante para el control de la infección.

Por el contrario, la respuesta mediada por linfocitos CD4⁺ con la concomitante liberación de INF γ es necesaria para la activación de macrófagos que fagociten los eritrocitos infectados y esto ha sido previamente descrito (**Brown et al., 1993**). En nuestros experimentos, observamos para el grupo P – rMVA una frecuencia mayor a 2400 células CD4⁺ - INF γ ⁺ antígeno-específicas por millón de esplenocitos luego del estímulo con el extracto de merozoítos. Este valor es estadísticamente significativo en comparación con el esquema heterólogo rMVA – P y con los esquemas homólogos e indica que el tipo y la magnitud de respuesta despertada por el esquema P - MVA sería uno de los mejores candidatos para su evaluación a futuro en el modelo bovino.

Con la caracterización y evaluación de la respuesta inmune inducida por el virus y las proteínas recombinantes, se cumplió con el primer objetivo de este trabajo pudiendo determinar la mejor combinación de estos inmunógenos que sea capaz de optimizar la respuesta inmune específica.

Aunque estos experimentos en ratones no nos permitan establecer conclusiones sobre el carácter protector del esquema vacunal, es importante mencionar que estos resultados son promisorios y ameritan una caracterización en profundidad en bovinos, único modelo biológico contra la babesiosis.

Durante la última década, ha habido un creciente interés en los adenovirus como vectores de expresión de proteínas heterólogas para terapia génica y cáncer (**Majhen et al., 2014**).

Más recientemente, el uso de adenovirus en ensayos de inmunización heterólogos, en especial para patógenos intracelulares como *T. gondii* (**Mendes et al., 2013**) *P. Falciparum* y *M. tuberculosis*, (**Draper et al., 2010**) ha mostrado que estos virus son potentes inductores de la respuesta inmune humoral.

Geiben – Lynn y colaboradores (2008) han determinado, mediante ensayos de cinética de expresión de antígenos heterólogos (luciferasa), que los ratones que recibieron un “prime” con adenovirus expresan mayor cantidad de luciferasa que los ratones inoculados con DNA o MVA expresando el mismo antígeno. Pudieron observar, además, que estos ratones inmunizados con adenovirus recombinantes presentaban una respuesta específica más elevada frente al re-estímulo con péptidos específicos de luciferasa.

Una mayor producción de antígeno en el “prime” parecería activar una respuesta B mucho mas exacerbada en comparación con dar una primera dosis con otros inmunógenos como el MVA en donde la producción del antígeno resulta menor (**Geiben - Lynn et al., 2008**).

En esta segunda etapa del trabajo, avanzamos en la obtención de un nuevo inmunógeno, el adenovirus recombinante que expresa el MABbo y la versión completa de este multiantígeno expresado en un sistema procariota.

Nuestros objetivos se focalizaron en comparar la respuesta inmune solamente en esquemas heterólogos, hipotetizando que el adenovirus administrado como “*prime*” sería capaz de inducir una mejor respuesta humoral que la vacuna a subunidades.

Además, hemos analizado ambos esquemas con intervalos más largos entre el “*prime*” y el “*boost*” a fin de estudiar la persistencia en la respuesta efectora a lo largo del tiempo.

Estos nuevos esquemas heterólogos basados en los dos tipos de virus también arrojaron resultados interesantes. Pudimos observar que en ambos grupos se indujeron altos títulos de anticuerpos IgG específicos contra el rMABbo luego de 60 días de la primera inmunización.

La única diferencia hallada fue en la respuesta inmune humoral para el grupo rAd – rMVA cuando detectamos una mayor proporción del isotipo IgG2a. En cuanto a los niveles de IFN γ secretados, también se observaron diferencias al cuantificar los niveles de esta citoquina en sobrenadantes de esplenocitos de ratón re-estimulados, observando mayores niveles para el grupo rAd – rMVA.

En este sentido, existe un amplio consenso de autores cuyos resultados respaldan el hecho de que la producción del isotipo IgG2a y de la citoquina IFN γ se encuentran estrechamente relacionadas (**Bossie & Vitteta, 1991; Huang *et al.*, 1991; Waki *et al.*,**

1995) aunque otros autores han reportado que la producción de este isotipo de inmunoglobulina es independiente de esta citoquina (**Markine-goriaynoff et al., 2000**).

Más recientemente a estos trabajos de la década del 90' Peng y colaboradores (2002) observaron que en los ratones *knock out* para el factor de transcripción TBX21 (del inglés *Tata Box transcription factor - 21*, también conocido como *T-bet*) la producción de IgG2a y de IFN γ era significativamente menor que los ratones *wild type* (**Peng et al., 2002**).

Investigaciones posteriores reforzaron el hecho de que este factor de transcripción es clave en la polarización de linfocitos hacia el perfil *Th1* (**Mullen et al., 2001; Szabo et al., 2000, 2002**). En nuestros ensayos hemos observado un aumento de IgG2a y al mismo tiempo una cantidad estadísticamente significativa de IFN γ secretada.

Este hecho es consistente con lo reportado por el consenso que ha aportado evidencias sobre la participación de esta citoquina y del isotipo IgG2a en la respuesta *Th1*.

La frecuencia de linfocitos CD4⁺ productores de IFN γ para el grupo rMABbo – rMVA (> 3000 CD4⁺/millón de esplenocitos) es similar a lo observado para el esquema análogo P – rMVA (**Figura 11 vs Figura 13**). En efecto, la población de CD4⁺ parecería mantenerse por lo menos 60 días después de la primera inmunización, indicando la persistencia de la respuesta. Similarmente, la población de CD8⁺ parecería tener el mismo perfil, dado que se observaron valores > 1900 CD8⁺/millón de esplenocitos para el grupo rMABbo – rMVA respecto del grupo P – rMVA (>2100 CD8⁺/millón de esplenocitos).

Para el grupo rMABbo – rMVA pudimos caracterizar además la fuente de TNF α con valores cercanos a los 4000 CD4⁺/millón de esplenocitos y valores cercanos a 2000 CD8⁺/millón de esplenocitos antígeno-específicos productores de TNF α . Si bien esta citoquina no se había cuantificado en los primeros ensayos, resultó importante incluirla en estos últimos experimentos, dado que el TNF α es junto con el IFN γ una de las principales citoquinas del perfil de respuesta *Th1*, al cual se le atribuye parte de la protección hacia *Babesia*.

Resultados similares a los descriptos arriba para las frecuencias de poblaciones T CD4⁺ y CD8⁺, se observaron en el esquema vacunación rAd – rMVA. La única diferencia que observamos entre el grupo rAd – rMVA y el vacunado con rMABbo – rMVA fue en las frecuencias de linfocitos CD4⁺ productores de TNF α , cuando se re – estimuló con proteína rMABbo purificada.

En general, las frecuencias de linfocitos se mantuvieron levemente por encima cuando re - estimulábamos con la proteína purificada, en comparación con el re-estimulo de . Cabe destacar que el rMABbo purificado fue tratado con Polimixina B para la remoción de endotoxinas, precisamente para evitar una re-estimulación inespecífica.

Lo cierto es que al re-estimular con 10 μ g/mL por pocillo de extracto de y 10 μ g/mL de proteína recombinante, la masa de antígeno específico en este último re- estímulo es superior al del lisado de , donde están presentes muchas otras proteínas del parásito. Esta sobreestimación puede explicar, en parte, la diferencia en las frecuencias cuando se re – estimula con rMABbo.

Un dato que merece la atención discutir son los valores de linfocitos polifuncionales, productores de $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$, para ambos grupos de vacunación: rMABbo – rMVA y rAd - rMVA. Ha sido demostrado que la inmunización heteróloga con vacunas utilizando proteínas recombinantes, vacunas a DNA y vectores virales inducen una respuesta T polifuncional, con más de una citoquina secretada por el mismo linfocito. Estos estudios de polifuncionalidad de células T han demostrado además una clara correlación entre la cantidad de estos linfocitos T polifuncionales y cierto grado de protección contra enfermedades como el HIV, el virus de la Hepatitis C (**Corey et al., 2015; De Rosa et al., 2004; Lindenstrøm et al., 2009**) e inclusive las causadas por los protozoarios intracelulares *Leishmania major* (**Darrah et al., 2007**) y *P. falciparum* (**Draper et al., 2010**).

Si bien estos trabajos muestran una frecuencia de células T polifuncionales variable según el esquema de inmunización utilizado, en nuestro trabajo pudimos detectar un número estadísticamente significativo de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ productores de ambas citoquinas para estos grupos de inmunización.

Este dato nos resulta especialmente relevante ya que arroja valores similares por los reportados en los trabajos arriba mencionados y nos permite hipotetizar sobre el grado de protección que podrían generar estos inmunógenos por lo que deberá ser tenido en cuenta al momento de evaluar la eficacia de la protección en el modelo bovino.

En síntesis, los resultados aquí discutidos nos muestran que ambos esquemas heterólogos rAd - rMVA y rMABbo - rMVA despiertan una respuesta inmune efectora productora de anticuerpos y de citoquinas específicas de la respuesta *Th1* que perdura aún 60 días después de la primera inmunización.

Continuando con la evaluación de distintos intervalos de inmunización para estos esquemas heterólogos, se analizó la respuesta inmune inducida a los 120 días de la primera inmunización. En relación a la respuesta humoral, los títulos de IgG específica contra el rMABbo se mantuvieron altos para ambos grupos, luego de los 120 días de la primera inmunización.

Sin embargo, la relación IgG2a/IgG1 se muestra más balanceada para este tiempo. En el caso del grupo rMABbo – rMVA, la relación de isotipos es apenas menor a 1, lo que indica una proporción levemente mayor de IgG1 respecto de IgG2a. Estos resultados son consistentes con trabajos previos donde titulan inmunoglobulinas IgG y sus isotipos a tiempos similares y con los mismos esquemas de vacunación, adyuvante y vías de inmunización en ratones para el protozooario *P. falciparum* y observan una respuesta más balanceada a medida que la medición de isotipos se hace a tiempos más prolongados (**Douglas *et al.*, 2010**).

Otros autores habían observado previamente, que la relación de IgG2a/IgG1 se encuentra influenciada por el tipo de adyuvante y la vía de inmunización pero dicha influencia es más pronunciada a tiempos más tempranos que a tiempos más prolongados lo que explicaría en parte que el perfil de respuesta humoral *Th1* decae con el tiempo disminuyendo los

niveles de IgG2a y mostrando valores de relación de isotipos más balanceados (**Comoy et al., 1998**). Estos resultados también son consistentes con los observados en nuestros esquemas rAd – rMVA y rMABbo – rMVA para tiempos más prolongados.

En cuanto a la respuesta celular, no fue posible detectar linfocitos T productores de las citoquinas IFN γ y TNF α a los 120 días de la primera inmunización. Para conseguirlo, hubiera sido deseable cuantificar marcadores asociados a células de memoria central como las moléculas de superficie CD62L, CCR7 y CD44 (**Jackson et al., 2005; Prisco & De Berardinis, 2012; Thakur et al., 2012**) insumos que no estuvieron disponibles al momento de realizar los respectivos experimentos de medición de respuesta inmune.

Los análisis aquí realizados se concentraron en identificar la respuesta efectora y esta respuesta decae con el tiempo y por tanto resulta difícil detectarla con la sensibilidad de las técnicas utilizadas. A pesar de esta dificultad, nos interesó medir la respuesta inmune a tiempos más largos. Este hecho radica en la necesidad de ajustar los intervalos entre el “*prime*” y el “*boost*” a fin de obtener una respuesta inmune óptima.

Si bien todavía no hay un consenso en cual es el mejor intervalo, varias investigaciones sugieren un tiempo óptimo de 2 – 3 meses entre las dos dosis (**Castiglione et al., 2012**), tiempo en cual las células T de memoria logran proliferar luego de la primera

inmunización y las células B de memoria terminan de desarrollarse en el centro germinal (Sallusto *et al.*, 2010).

Con la caracterización y evaluación de la inmunogenicidad del rAd y del rMABbo en el modelo murino, se cumplió con el segundo objetivo de este trabajo de Tesis. Ambos esquemas de inmunización rAd – rMVA y rMABbo – rMVA fueron capaces de inducir una respuesta específica tanto humoral como celular.

Salvo las diferencias mencionadas anteriormente en los niveles de IFN γ secretados y en las proporciones de IgG2a para el grupo rAd – rMVA en el intervalo “Prime”: día 0 – “Boost”: día 30, los resultados obtenidos con estos inmunógenos como potenciales candidatos vacunales son promisorios y nos alientan a realizar los correspondientes ensayos a fin de probar la eficacia en bovinos frente al desafío con cepas patógenas de *Babesia bovis*.

Los métodos actuales de diagnóstico serológico para *B. bovis* son la Inmunofluorescencia indirecta - IFI - y el ELISA. Como se mencionó en la Introducción de esta Tesis, cuando se deben analizar un gran número de muestras, la IFI no solo insume una cantidad de tiempo importante por parte del operador entrenado sino que además el resultado puede verse afectado por la subjetividad del mismo (Mosqueda and Cantó, 2012).

Por el contrario, el ELISA es una técnica mucho más eficaz porque logra analizar al mismo tiempo un gran número de muestras, presenta mayor especificidad que la IFI y permite independizarse del operador.

En particular para *B. bovis*, el único ELISA diagnóstico validado en el país se realiza en la EEA INTA – Rafaela y está basado en un lisado de como antígeno de pegado a la placa.

Si bien esta técnica posee una alta especificidad y sensibilidad con valores del 97% y 98% respectivamente, la forma de obtener los parásitos es relativamente cara y además muy laboriosa porque requiere del mantenimiento *in vitro* de eritrocitos bovinos, los cuales son luego infectados para la producción de los parásitos (Echaide, 2008).

Por este motivo se han buscado alternativas al uso de lisados parasitarios como antígenos de detección. Los reportes sobre ELISAs indirectos basados en proteínas recombinantes que se han desarrollado para *B. bovis*, incluyen un solo antígeno y aún presentan algunas limitaciones de especificidad y sensibilidad (Bono *et al.*, 2008; Boonchit *et al.*, 2002) por lo que al momento no se dispone de un sistema comercial de ELISA para el diagnóstico de *B. bovis*.

La propuesta de este trabajo de utilizar una poliproteína posee la ventaja de que incluye las regiones inmunodominantes de 3 antígenos de *B. bovis*, lo cual significa una optimización en el uso de antígeno en comparación con realizar un ELISA con cada antígeno por separado o un ELISA en el que debieran pegarse en la placa la mezcla de estas 3 proteínas. En este aspecto, la propuesta posee características novedosas que además permitirían su implementación a nivel comercial.

Cuando se analizaron sueros bovinos de diferentes características con el ELISA basado en el rMABbo obtuvimos altos porcentajes de especificidad y sensibilidad que si bien no alcanzan los valores del ELISA de cercanos al 97-98% (**de Echaide et al., 1995**) para ambos parámetros, los valores aquí obtenidos de especificidad y sensibilidad (93.7% y 93.3% respectivamente) son muy buenos, con valores de sensibilidad comparables a los obtenidos por otros autores (**Bono et al., 2008**) habiendo logrado además un muy buen nivel de concordancia entre ambas técnicas.

Una perspectiva es continuar trabajando en nuestro laboratorio con este ELISA indirecto, con el objetivo de mejorar estos valores de especificidad y sensibilidad aquí mostrados.

Cuando realizamos este mismo ensayo de ELISA con sueros de animales infectados con *B. bigemina* (previamente confirmados mediante el ELISA específico para este parásito que también se lleva a cabo en la EEA – INTA Rafaela) observamos que de un total de 22 sueros, 12 de ellos mostraron reacción cruzada. Dado que el MABbo incluye la región N – terminal de RAP -1, podemos inferir que esta reacción se debe en parte al alto grado de identidad que existe en esta porción de RAP-1 entre *B. bigemina* y *B. bovis* (**Suarez et al., 1991**).

Posteriormente este autor y sus colaboradores, obtuvieron resultados similares a los obtenidos aquí, al observar reacción cruzada con sueros de animales positivos solo a *B. bigemina* para un fragmento truncado de RAP-1 comprendido entre los aminoácidos 1 – 235, (**Suarez et al., 1993**) que es la misma región de aminoácidos (1 – 236) que la evaluada en este trabajo.

Asimismo, existe una alta homología de secuencia entre la proteína HSP20 de ambas especies de *Babesia*, lo cual explicaría en parte la reacción cruzada observada en los sueros evaluados (**Brown et al., 2001**).

En conclusión, el ELISA aquí desarrollado requerirá del análisis de un número mayor de sueros serológicamente positivos a *B. bigemina* para terminar de confirmar la tendencia observada.

Este trabajo está actualmente en desarrollo por lo que en un lapso no mayor podríamos determinar fehacientemente si el *test* desarrollado permitiría solamente estudiar el *status* epidemiológico de los rodeos de campo frente a los parásitos del género *Babesia* ya que no se podría discriminar entre una especie de *Babesia* y la otra.

Sin embargo, el *test* no permitiría su uso como control luego de la aplicación de las vacunas vivas para *B. bigemina* y *B. bovis* ya que sería imposible determinar si los anticuerpos detectados son contra una de las dos cepas vacunales.

Si bien esto representa una limitación, cabe señalar que el objetivo inicial del diseño del MABbo utilizado en la validación de este ELISA estuvo orientado principalmente a ser usado como candidato vacunal y la respuesta cruzada hacia *B. bigemina* constituiría más una ventaja para su uso como antígeno vacunal que una dificultad.

No obstante, nos pareció interesante avanzar en su evaluación como método diagnóstico, cuando observamos que los sueros de los animales infectados natural y experimentalmente reaccionaban positivamente en los ensayos de WBs.

El desafío por delante será entonces seleccionar correctamente los antígenos que permitan el diseño de métodos de diagnóstico especie – específicos. La disponibilidad actual de los genomas de ambas especies de *Babesia* que afectan a los bovinos abre un camino de posibilidades en la búsqueda de candidatos para desarrollar nuevos *tests* diagnósticos que superen en costos, practicidad, especificidad y sensibilidad a las pruebas actualmente en uso.

6 Conclusiones.

- Se diseñó y construyó un gen quimérico denominado MABbo que incluye en un único marco de lectura las regiones inmunodominantes de los antígenos MSA-2c, RAP – 1 y HSP20 del hemoparásito *Babesia bovis*.
- Se obtuvieron y caracterizaron a nivel molecular e inmunológico dos vectores virales basados en MVA y Adenovirus que permiten expresar adecuadamente el rMABbo en el citosol de las células infectadas. El multiantígeno quimérico se obtuvo también en forma recombinante en un sistema procarionta.
- Se demostró que el multiantígeno MABbo conserva los epitopes B de los tres antígenos que lo conforman y que estos epitopes son reconocidos por los sueros de bovinos infectados con distintas cepas de *Babesia bovis*.
- La evaluación en el modelo murino de los esquemas de inmunización “prime-boost” homólogos y heterólogos utilizando proteínas y MVA recombinantes demostró que el esquema heterólogo **P – rMVA** resultó en la mejor combinación que indujo a los 28 días una mayor proporción de anticuerpos IgG2a para cada antígeno de la quimera y la liberación de IFN γ por parte de las células T CD4 $^+$ y CD8 $^+$.
- Los esquemas de “prime – boost” heterólogos rAd – rMVA y rMABbo – rMVA indujeron altos títulos de IgG específicas que se mantuvieron en el tiempo incluso 120 días luego de la primer inmunización. Solo el esquema rAd – rMVA indujo una mayor proporción de IgG2a y altos niveles de IFN γ a los 60 días de la primer inmunización.
- Ambos esquemas rAd – rMVA y rMABbo – rMVA mostraron a los 60 días de la primer inmunización altas frecuencias de linfocitos T CD4 $^+$ y CD8 $^+$ antígeno específicos, mono y polifuncionales para las citoquinas propias del perfil Th1 IFN γ y TNF α .

- Las evaluaciones en el modelo murino permitieron determinar que los esquemas “prime-boost” heterólogos rMABbo-rMVA y rAd-rMVA serían los mejores candidatos a ser evaluados en el modelo bovino frente al desafío con cepas patógenas de *B. bovis*.
- Se logró expresar y purificar con muy buen rendimiento la poliproteína rMABbo para su evaluación como antígeno de diagnóstico. El ELISA indirecto desarrollado mostró una sensibilidad del 93.3% con un muy buen grado de concordancia con el ELISA de referencia basado en lisado de . Sin embargo, una proporción importante de los sueros provenientes de bovinos infectados con *Babesia bigemina* reaccionaron positivamente al ELISA-rMABBo debido a la presencia de epitopes B compartidos en el multiantígeno quimérico.
- La prueba de ELISA-rMABbo resultaría una herramienta válida para relevamientos epidemiológicos en rodeos donde se sospecha la transmisión de parásitos del género *Babesia* pero no sería útil para la evaluación serológica específica como la que se realiza para evaluar la respuesta post-vacunal frente a las inmunizaciones con cepas vivas de cada una de las especies de este parásito.

7 Referencias.

- Alcami A, S.G., 1995. Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J Virol* 69, 4633–9.
- Allred, D.R., Hines, S.A., Ahrens, K.P., 1993. Isolate-specific parasite antigens of *Babesia bovis*-infected erythrocyte surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60, 121–132.
- Altman, D., 1991. *Practical statistics for medical research*. Chapman and Hall, London, England 404.
- Andrew, M.E., Coupar, B.E.H., Boyle, D.B., 1989. Humoral and cell-mediated immune responses to recombinant vaccinia viruses in mice. *Immunol. Cell Biol* 6, 331–338.
- Antoine, G., Scheiflinger, F., Dorner, F., Falkner, F.G., 1998. The Complete Genomic Sequence of the Modified Vaccinia Ankara Strain: Comparison with Other Orthopoxviruses. *Virology* 396.
- Antoine, G., Scheiflinger, F., Dorner, F. y Falkner, F.G., 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244(2), 365 – 396.
- Antoine, G., Scheiflinger, F., Holzer, G., Langmann, T., Falkner, F.G. y Dorner, F., 1996. Characterization of the vaccinia MVA hemagglutinin gene locus and its evaluation as an insertion site for foreign genes. *Gene* 177(1-2), 43–6.
- Barry, D.N., Rodwell, B.J., Timms, P., McGregor, W., 1982. A microplate enzyme immunoassay for detecting and measuring antibodies to *Babesia bovis* in cattle serum 59.
- Belsham, G.J., Brangwyn, J.K., Ryan, M.D., Abrams, C.C. y King, A.M., 1990. Intracellular expression and processing of foot-and-mouth disease virus capsid precursors using vaccinia virus vectors: influence of the L protease. *Virology* 176(2), 524–30.
- Benitez, D., Florin-Christensen, M., Cetra, B., 2007. Bovine ticks (*Rhipicephalus microplus*) in water buffalos (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *Parassitologia* 49, 77.
- Bennink J.R, Y.J.W., 1990. Recombinant vaccinia viruses as vectors for studying T lymphocyte specificity and function. *Curr Top Microbiol Immunol* 163, 153–84.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W., 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275,, 1320 – 1323.

- Berkner, K.L. y Sharp, P.A., 1992. Preparation of adenovirus recombinants using plasmids of viral DNA. En Eukariotic viral vectors. Cold Spring Harbor Lab, NY, USA 193 – 198.
- Birnboim HC., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research. 7, 1513–1523.
- Blanchard TJ, Alcamí A, Andrea P, S.G., 1998. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. J Gen Virol 79(5), 1159–67.
- Bock R, Jackson L, de Vos A, J.W., 2004. Babesiosis of cattle. Parasitology 129, Suppl:S247–69.
- Bock, R.E., Wos, A.J. De, Kingston, T.G., Shiels, I.A., Dalgliesh, R.J., 1992. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine 43, 45–56.
- Bono, M.F., Mangold, A.J., Baravalle, M.E., Valentini, B.S., Thompson, C.S., Wilkowsky, S.E., Echaide, I.E., Farber, M.D., Torioni de Echaide, S.M., 2008. Efficiency of a recombinant MSA-2c-based ELISA to establish the persistence of antibodies in cattle vaccinated with *Babesia bovis*. Veterinary parasitology 157, 203–10. doi:10.1016/j.vetpar.2008.07.025
- Boonchit, S., Xuan, X., Yokoyama, N., Goff, W.L., Wagner, G., Igarashi, I., 2002. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Recombinant Rho-1 Associated Protein 1 Antigen against *Babesia bovis* for the Detection of Specific Antibodies in Cattle. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 40, 3771–3775. doi:10.1128/JCM.40.10.3771
- Boonchit, S., Xuan X., Yokoyama, N., Goff, W.L., Wagner, G., Igarashi, I., 2002. Evaluation of an enzyme - linked immunosorbent assay with recombinant rho-1 associated protein 1 antigen against *Babesia bovis* for the detection of specific antibodies in cattle. J. Clin. Microbiol. 40, 3371 – 3775.
- Bossie A and Vitteta ES, 1991. IFN- γ Enhances Secretion of IgG2a from IgG2a-Committed LPS-Stimulated Murine B Cells : Implications for the Role of IFN- γ in Class Switching. 104, 95–104.
- Brockmeier, S.L., Lager, K.M., Tartaglia, J., Riviere, M., Paoletti, E. y Mengeling, W.L., 1993. Vaccination of pigs against pseudorabies with highly attenuated vaccinia (NYVAC) recombinant viruses. Vet Microbiol 38(1-2), 41–58.

- Brown, W.C., Logan, K.S., Wagner, G.G., Tetzlaff, C.L., 1991. Cell-Mediated Immune Responses to Babesia bovis Merozoite Antigens in Cattle following Infection with Tick-Derived or Cultured Parasites 59, 2418–2426.
- Brown, W.C., McElwain, T.F., Ruef, B.J., Suarez, C.E., Shkap, V., Chitko-McKown, C.G., Tuo, W., Rice-Ficht, a C., Palmer, G.H., 1996. Babesia bovis rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle and contains T-cell epitopes conserved among geographically distant B. bovis strains. Infection and immunity 64, 3341–50.
- Brown, W.C., Norimine, J., Knowles, D.P., Goff, W.L., 2006. Immune control of Babesia bovis infection. Veterinary parasitology. 138, 75–87. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.041
- Brown, W.C., Palmer, G.H., 1999. Designing blood-stage vaccines against Babesia bovis and B. bigemina. Parasitology today (Personal ed.) 15, 275–81.
- Brown, W.C., Ruef, B.J., Norimine, J., Kegerreis, K.A., Suarez, C.E., Conley, P.G., Stich, R.W., Carson, K.H., Rice-ficht, A.C., 2001. A novel 20-kilodalton protein conserved in Babesia bo 6 is and B . bigemina stimulates memory CD4 + T lymphocyte responses in B . bo 6 is -immune cattle 118, 97–109.
- Brown WC, Ruef BJ, Norimine J, Kegerreis KA, Suarez CE, Conley PG, Stich RW, Carson KH, R.-F.A., 2001. A novel 20-kilodalton protein conserved in Babesia bovis and B. bigemina stimulates memory CD4(+) T lymphocyte responses in B. bovis-immune cattle. Mol Biochem Parasitol. 1, 97 – 109.
- Brown, W. C., Zhao, S., Woods, V.M., Dobbelaere, D. A. & Rice-Ficht, A.C., 1993. Babesia bovis-specific CD4+ T cell clones from immune cattle express either the Th0 or Th1 profile of cytokines. Revue D'Élevage et De Médecine Veterinaire Des Pays Tropicaux. 46, 65–69.
- Brown, W.C., McElwain, T.F., Hotzel, I., Ruef, B.J., Rice-Ficht, A.C., Stich, R.W., Suárez, C.E., Estes, D.M., Palmer, G.H., 1998. Immunodominant T-cell antigens and epitopes of Babesia bovis and Babesia bigemina. Ann. Trop. Med. Parasitol. 92, 473–482.
- Brown, W.C., Zhao, S., Woods, V.M., Tripp, C.A., Tetzlaff, C.L., Heussler, V.T., Dobbelaere, D.A., Rice-Ficht, A.C., 1993. Identification of two Th1 cell epitopes on the Babesia bovis encoded 77-kilodalton merozoite protein (Bv-I) by use of truncated recombinant fusion protein. Infect. Immun. 61.
- Broyles, S.S., 2003. Vaccinia virus transcription. J Gen Virol (Pt 9), 2293–303.

- Callow, L., 1979. Some aspects of the epidemiology and control of bovine babesiosis in Australia. *Journal of the South African Veterinary Association* 50, 353–356.
- Capone S, Reyes-Sandoval A, Naddeo M, Siani L, Ammendola V, Rollier CS, Nicosia A, Colloca S, Cortese R, Folgori A, H.A., 2010. Immune responses against a liver-stage malaria antigen induced by simian adenoviral vector AdCh63 and MVA prime-boost immunisation in non-human primates. *Vaccine* 2, 256 – 65. doi:doi:10.1016/j.vaccine.2010.10.041
- Carroll, M.W. y Moss, B., 1997. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology* 238(2), 198-211. *Virology* 238(2), 198–211.
- Carson CA, Timms P, Cowman AF, S.N., 1990. *Babesia bovis*: evidence for selection of subpopulations during attenuation. *Exp Parasitol* 70(4), 404 – 410.
- Castiglione, F., Mantile, F., De Berardinis, P., Prisco, a, 2012. How the interval between prime and boost injection affects the immune response in a computational model of the immune system. *Computational and mathematical methods in medicine* 2012, 842329. doi:10.1155/2012/842329
- Clesham, G. J., Adam, P. J., Proudfoot, D., Flynn, P. D., Efstathiou, S. & Weissberg, P.L., 1998. High adenoviral loads stimulate NF kappaB- dependent gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Gene Therapy* 5,, 174–180.
- Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R. a, 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33, 492–503. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002
- Comoy, E.E., Capron, A., Thyphronitis, G., Comoy, E., 1998. Adjuvant is the Major Parameter Influencing the Isotype Profiles Generated During Immunization with a Protein Antigen , the *Schistosoma mansoni* Sm28-GST 444–452.
- Corey, L., Gilbert, P.B., Tomaras, G.D., Haynes, B.F., Pantaleo, G., Fauci, A.S., 2015. Immune correlates of vaccine protection against HIV-1 acquisition 7, 1–9.
- Cowman AF, Bernard O, Stewart N, K.D., 1894. Genes of the protozoan parasite *Babesia bovis* that rearrange to produce RNA species with different sequences. *Cell* 37, 653–660.
- Cutullé, C., Lovis, L., D'Agostino, B.I., Balbiani, G.G., Morici, G., Citroni, D., Reggi, J., Caracostantogolo, J.L., 2013. In vitro diagnosis of the first case of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus* in Santo Tomé (Corrientes), Argentina. *Veterinary parasitology* 192, 296–300. doi:10.1016/j.vetpar.2012.10.014

- Dalrymple, B.P., Casu, R.E., Peters, J.M., Dimmock, C.M., Gale, K.R., Boese, R., Wright, I.G., 1993. Characterization of a family of multi-copy genes encoding rho-try protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis*, and *Babesia canis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 181–192.
- Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, Hoff ST, Andersen P, Reed SG, Morris SL, Roederer M, S.R., 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med.* 7, 843–50.
- Davinson , A.J., Moss, B., 1989. Structure of Vaccinia Virus Early Promoters enzymes. *J. M. Biol* 749–769.
- De Echaide ST., Echaide IE., Gaido AB., Mangold AJ., Lugaresi CI., Vanzini VR., G.A., 1995. Evaluation of an enzyme - linked immunosorbent assay kit to detect *Babesia bovis* in cattle. *Prev Vet Med* 24, 277 – 283.
- De Rosa, S.C., Lu, F.X., Yu, J., Perfetto, S.P., Falloon, J., Moser, S., Evans, T.G., Koup, R., Miller, C.J., Roederer, M., 2004. Vaccination in Humans Generates Broad T Cell Cytokine Responses. *The Journal of Immunology* 173, 5372–5380. doi:10.4049/jimmunol.173.9.5372
- Delaloye, J., Roger, T., Roy, D. Le, Reymond, M.K., Akira, S., Petrilli, V., Gomez, C.E., Perdiguero, B., 2009. Innate Immune Sensing of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) Is Mediated by TLR2-TLR6 , MDA-5 and the NALP3 Inflammasome 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000480
- Di Nicola, M., Siena, S., Bregni, M., Longoni, P., Magni, M., Milanesi, M., Matteucci, P., Mortarini, R., Anichini, A., Parmiani, G., Drexler, I., Erfle, V., Sutter, G., Gianni, A.M., 1998. Gene transfer into human dendritic antigen- presenting cells by vaccinia virus and adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther.* 5 (6), 350–356.
- Dominguez, M., Echaide, I., de Echaide, S.T., Wilkowsky, S., Zabal, O., Mosqueda, J.J., Schnittger, L., Florin-Christensen, M., 2012. Validation and field evaluation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Babesia bovis* infections in Argentina. *Clinical and vaccine immunology: CVI* 19, 924–8. doi:10.1128/CVI.00015-12
- Douglas, A.D., de Cassan, S.C., Dicks, M.D.J., Gilbert, S.C., Hill, A.V.S., Draper, S.J., 2010. Tailoring subunit vaccine immunogenicity: maximizing antibody and T cell responses by using combinations of adenovirus, poxvirus and protein-adjuvant vaccines against *Plasmodium falciparum* MSP1. *Vaccine* 28, 7167–78. doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.068

- Douglas, J.T., 2007. Adenoviral vectors for gene therapy. *Molecular Biotechnology* 36, 71–80. doi:10.1007/s12033-007-0021-5
- Dowling, S.C., Perryman, L.E., Jasmer, D.P., 1996. A *Babesia bovis* 225- kilodalton spherical body protein, localization to the cytoplasmic face of infected erythrocytes after merozoite invasion. *Infect Immun* 2618–2626.
- Draper, S.J., Heeney, J.L., 2010. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jan;8(1):62-73. *Nat Rev Microbiol.* 8(1), 62–73.
- Drexler, I., Antunes, E., Schmitz, M., Wolfel, T., Huber, C., Erfle, V., Rieber, P., Theobald, M., Sutter, G., 1999. Modified vaccinia virus Ankara for delivery of human tyrosinase as melanoma-associated antigen: induction of tyrosinase- and melanoma-specific human leukocyte antigen A*0201- restricted cytotoxic T cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 59 (19), 4955–4963.
- Echaide, I., 2008. Bovine babesiosis: Vaccines. Curitiba. Brasil. <http://cni.inta.gob.ar/helminto/index.htm>.
- Echaide, I. E., de Echaide, S. T. Mangold, A. J. and Guglielmone, A.A., 1993. Live and soluble antigens from in vitro culture to vaccinate cattle against *Babesia bovis*., in: IX International Veterinary Hemoparasite Disease Conference. p. 13.
- Edelhofer, R., Kanout, A., Schuh, M., Kutzer, E., 1998. Improved disease resistance after *Babesia divergens* vaccination 181–187.
- Elango, N., Prince, G.A., Murphy, B.R., Venkatesan, S., Chanock, R.M. y Moss, B., 1986. Resistance to human respiratory syncytial virus (RSV) infection induced by immunization of cotton rats with a recombinant vaccinia virus expressing the RSV G glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(6), 1906–10.
- Ewer, K.J., O'Hara, G. a, Duncan, C.J. a, Collins, K. a, Sheehy, S.H., Reyes-Sandoval, A., Goodman, A.L., Edwards, N.J., Elias, S.C., Halstead, F.D., Longley, R.J., Rowland, R., Poulton, I.D., Draper, S.J., Blagborough, A.M., Berrie, E., Moyle, S., Williams, N., Siani, L., Folgari, A., Colloca, S., Sinden, R.E., Lawrie, A.M., Cortese, R., Gilbert, S.C., Nicosia, A., Hill, A.V.S., 2013. Protective CD8+ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nature communications* 4, 2836. doi:10.1038/ncomms3836
- Ferreira, V., Sidenius, N., Tarantino, N., Hubert, P., Chatenoud, L., Blasi, F. & Korner, M., 1999. In vivo inhibition of NF-kapp B in T- lineage cells leads to a dramatic decrease in cell proliferation and cytokine production and to increased cell apoptosis in response to mitogenic stimuli, but not to abnormal thymopoiesis. *Journal of Immunology* 162,.

- Ferrer MF, Del Médico Zajac MP, Zanetti FA, Valera AR, Zabal O, C.G., 2011. Recombinant MVA expressing secreted glycoprotein D of BoHV-1 induces systemic and mucosal immunity in animal models. *Viral Immunol.* 4, 331 – 339. doi:10.1089/vim.2011.0018.
- Ferrer, M.F., Zanetti, F.A., Calamante, G., 2007. Design and construction of transfer vectors in order to obtain recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA)]. *Rev Argent Microbiol* 39, 138–142.
- Ferreri, L., Benitez, D., Dominguez, M., Rodriguez, A., Asenzo, G., Mesplet, M., Florin-Christensen, M., Schnittger, L., 2008. Water Buffalos as carriers of *Babesia bovis* in Argentina. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149, 149–51. doi:10.1196/annals.1428.036
- Figueroa Millán, J.V., Alvarez Martínez, J.A., 2003. Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. *Ciencia Veterinaria* 9(4), 75–104.
- Figueroa, J.V., Buening, G.M., 1991. In vitro inhibition of multiplication of *Babesia bigemina* by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol* 29, 997 – 1003.
- Fish, L., Leibovich, B., Krigel, Y., McElwain, T., Shkap, V., 2008. Vaccination of cattle against *B. bovis* infection with live attenuated parasites and non-viable immunogens. *Vaccine* 26 Suppl 6, G29–33. doi:10.1016/j.vaccine.2008.09.070
- Florin-christensen, M., Suarez, C.E., Rodriguez, A.E., Flores, D.A., Schnittger, L., 2014. Vaccines against bovine babesiosis : where we are now and possible roads ahead. *Parasitol Today* 1563–1592. doi:10.1017/S0031182014000961
- Friedhoff, K.T., 1988. Transmission of *Babesia*. *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida. 23 – 52.
- G. Uilenberg, 1995. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Veterinary parasitology* 1, 19 – 41.
- Gahery-Segard, H., Farace, F., Godfrin, D., Gaston, J., Lengagne, R., Tursz, T., Boulanger, P. & Guillet, J.G., 1998. Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti- penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. *Journal of Virology* 72,, 2388–2397.
- Gahery-Segard, H., Juillard, V., Gaston, J., Lengagne, R., Pavirani, A., Boulanger, P. & Guillet, J.G., 1997. Humoral immune response to the capsid components of recombinant adenoviruses: routes of immunization modulate virus-induced Ig subclass shifts. *European Journal of Immunology* 27,, 653–659.

- García-Arriaza, J., Esteban, M., 2014. Enhancing poxvirus vectors vaccine immunogenicity. *Human vaccines & immunotherapeutics* 10, 2235–44. doi:10.4161/hv.28974
- Geiben - Lynn, R., Greenland, J. R., Frimpong - Boateng, K. & Letvin, N.L., 2008. Kinetics of recombinant adenovirus type 5, vaccinia virus, modified vaccinia ankara virus, and DNA antigen expression in vivo and the induction of memory T - lymphocyte responses. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 691–696.
- Goebel, S.J., Jhonson, G.P., Perkus, M.E., Davis S.W., Winslow, J.P., Paoletti, E., 1990. *The Complete of Vaccinia Virus* 266, 247–266.
- Goff, W L., Jhonson W.C., Tuo W., Valdez R.A., Parsih S.M., B.G. and D.W., 2002. Age-related innate immune response in calves to *Babesia bovis* involves IL-12 induction and IL-10 modulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969, 164–168.
- Goff, W.L., Davis, W.C., Palmer, G.H., McElwain, T.F., Johnson, W.C., Bailey, J.F., McGuire, T., 1988. Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine serum and monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 56, 2363 – 2368.
- Goldsmith, K.T., Curiel, D.T., Engler, J.A. and Garver, R.I., Jr., 1994. Trans complementation of an EIA-deleted adenovirus with codelivered EIA sequences to make recombinant adenoviral producer cells. *Human Gene Ther.* 5., 1341–1348.
- Goodger, B.V., Waltisbuhl, D.J., Wright, I.G., White, M., 1992. *Babesia bovis*, analysis of and preliminary vaccination studies with a defined infected erythrocyte membrane binding antigen. *Int. J. Parasitol* 22, 533–535.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36,, 59–74.
- Hadj-Kaddour, K., Carcy, B., Vallet, A., Randazzo, S., Delbecq, S., Kleuskens, J., Schetters, T., Gorenflot, A., Precigout, E., 2007. Recombinant protein Bd37 protected gerbils against heterologous challenges with isolates of *Babesia divergens* polymorphic for the bd37 gene. *Parasitology* 134, 187–96.
- Hanahan D., 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En: *DNA Cloning: a Practical Approach* (ed. Glover, D.M.). Oxford. IRL Press. 1, 109–135.
- Harrop R, Connolly N, Redchenko I, Valle J, Saunders M, R.M., 2006. Vaccination of colorectal cancer patients with modified vaccinia Ankara delivering the tumor antigen 5T4 (TroVax) induces immune responses which correlate with disease control: a phase I/II trial. *Clin Cancer Res* 2006;12(June (11)): 3416–24. *Clin Cancer Res* 11,, 3416–24.

- Harrop R, John J, C.M., 2006. Recombinant viral vectors: cancer vaccines. *Advanced drug delivery reviews* 58,, 931–47.
- He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2509–14.
- Hill, A.V.S., Reyes-Sandoval, A., O’Hara, G., Ewer, K., Lawrie, A., Goodman, A., Nicosia, A., Folgori, A., Colloca, S., Cortese, R., Gilbert, S.C., Draper, S.J., 2010. Prime-boost vectored malaria vaccines: progress and prospects. *Human vaccines* 6, 78–83.
- Hines, S.A., Palmer, G.H., Brown, W.C., Mcelwain, T.F., Suarez, C.E., Vidotto, O., Rice-ficht, A.C., 1995. Genetic and antigenic characterization of *Babesia bovis* merozoite spherical body protein Bb-1. *Molecular and Biochemical Parasitology* 69, 149 – 159.
- Hines, S.A., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., Goff, W.L., Mcelwain, T.F., Hines, S.A., Palmer, G.U.Y.H., Jasmer, D.P., Goff, W.L., 1995. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1 . These include : Immunization of Cattle with Recombinant *Babesia bovis* Merozoite Surface Antigen-1 63.
- Hines, S.A., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., Mcguire, T.C., Mcelwain, T.F., 1992. Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family 55, 85–94.
- Homer, M.J., Aguilar-delfin, I., Iij, S.R.T., Krause, J., Persing, D.H., Iij, S.A.M.R.T., Krause, P.J., 2000. Babesiosis Babesiosis 13. doi:10.1128/CMR.13.3.451-469.2000.Updated
- Hope, M., Riding, G., Menzies, M., Colditz, I., Reverter, A., Willadsen, P., Precinct, Q.B., Lucia, S., 2005. Potential for recombinant *Babesia bovis* antigens to protect against a highly virulent isolate 439–445.
- Hoyte HM., 1961. Initial development of infectious *Babesia bigemina*. *Australian Veterinary Journal* 8, 462–466.
- Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilek, J., Zinkernagel, R.M., Aguett, M., 1991. Immune Response in Mice That Lack the Interferon- γ Receptor 991, 21–24.
- Hutchings CL, Gilbert SC, Hill AV, M.A., 2005. Novel protein and poxvirus-based vaccine combinations for simultaneous induction of humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol.* 1, 599 – 606.

- I.G. Wright, R. Casu, M.A. Commins, B.P. Dalrymple, K.R. Gale, B.V. Goodger, P.W. Riddles, D.J. Waltisbuhl, I. Abetz, D.A. Berrie, Y.B. C. Dimmock, T. Hayes, H. Kalnins, G. Leatch, R. McCrae, P.E. Montague, I.T. Nisbet, F. Parrodi, J.M. Peters, P.C. Scheiwe, W. Smith, K.R.-B. and M.A.W., 1992. The development of a recombinant Babesia vaccine 44, 3–13.
- Igarashi, I., 1988. Host Cell-Parasite Interactions in Babesiosis. In Ristic, M. (ed.), Babesiosis of domestic animals and man. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida 53 – 70.
- Igarashi, I., Suzuki, R., Waki, S., Tagawa, Y., Seng, S., Tum, S., Omata, Y., Saito, a, Nagasawa, H., Iwakura, Y., Suzuki, N., Mikami, T., Toyoda, Y., 1999. Roles of CD4(+) T cells and gamma interferon in protective immunity against Babesia microti infection in mice. Infection and immunity 67, 4143–8.
- Jackson, S.S., Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., McKay, P.F., Sumida, S.M., Martin, K.L., Yu, F., Lifton, M. a, Gorgone, D. a, Letvin, N.L., 2005. Evaluation of CD62L expression as a marker for vaccine-elicited memory cytotoxic T lymphocytes. Immunology 116, 443–53. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02243.x
- Jasmer, D.P., Reduker, D.W., Perryman, L.E., McGuire, T.C., 1991. A Babesia bovis 225-kilodalton protein located on the cytoplasmic side of the erythrocyte membrane has sequence similarity with a region of glycogen phosphorylase. Mol Biochem Parasitol 52, 263 – 269.
- Joffre OP, Segura E, Savina A, A.S., 2012. Cross-presentation by dendritic cells. Nat Rev Immunol 12:557-569. Nat Rev Immunol 12,, 557–569.
- Kastenmuller, W., Drexler, I., Ludwig, H., Erfle, V., Peschel, C., Bernhard, H., Sutter, G., 2006. Infection of human dendritic cells with recombinant vaccinia virus MVA reveals general persistence of viral early transcription but distinct maturation-dependent cytopathogenicity. Virology 350, 276–88. doi:10.1016/j.virol.2006.02.039
- Kuttler, K., 1988. World-wide impact of babesiosis. Babesiosis of domestic animals and man. CRC Press Inc., Boca Ratón Ristic, M. (ed). 1 – 22.
- Lieber, A., He, C. Y., Meuse, L., Himeda, C., Wilson, C. & Kay, M.A., 1998. Inhibition of NF- κ B activation in combination with bcl-2 expression allows for persistence of first-generation adenovirus vectors in the mouse liver. Journal of Virology 72,, 9267–9277.
- Lindenstrøm, T., Agger, E.M., Korsholm, K.S., Darrah, P. a, Aagaard, C., Seder, R. a, Rosenkrands, I., Andersen, P., 2009. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells.

Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 182, 8047–55.
doi:10.4049/jimmunol.0801592

Löschmuller, H., Jani, A., Huard, J., Prescott, S., S., M., Massie, B., Karpati, G. and Ascadi, G., 1994. Emergence of early region I-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants during multiple passages in 293 cells. *Human Gene Ther.* 5, 1485-1491. *Human Gene Ther.* 5, 1485–1491.

Lonzina L, Balbín G, C.G., 2014. Exitoso debut para el programa de prevención de la tristeza bovina. *Motivar* 5, 23 – 26.

Lorusso, V., Picozzi, K., Bronsvoort, B.M.C. De, Majekodunmi, A., Dongkum, C., 2013. Ixodid ticks of traditionally managed cattle in central Nigeria : where *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* does not dare (yet ?). *Parasites & Vectors* 6, 1. doi:10.1186/1756-3305-6-171

Lovis, A.L., Reggi, J., Berggoetz, M., Betschart, B., Sager, H., Lovis, L., 2013. Determination of Acaricide Resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari : Ixodidae)* Field Populations of Argentina , South Africa , and Australia with the Larval Tarsal Test Determination of Acaricide Resistance in *Rhipicephalus (Boophilu*.

Lu, S., 2013. Heterologous Prime-Boost Vaccination. *Curr Opin Immunol* 21, 346–351. doi:10.1016/j.coi.2009.05.016.Heterologous

Mackett, M., Smith, G.L. Moss, B., 1983. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(23), 7415–9.

Mackett, M., Smith, G.L. y Moss, B., 1984. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* 49(3), 857–64.

Mahnel, H. y Mayr, A., 1994. Experiences with immunization against orthopox viruses of humans and animals using vaccine strain MVA. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 107(8), 253–6.

Mahoney, D.F., 1986. Studies on the protection of cattle against *Babesia bovis* infection. *The Ruminant Immune System in Health and Disease.*, in: Cambridge University Press. pp. 539–545.

Majhen, D., Calderon, H., Chandra, N., Fajardo, C.A., Rajan, A., Alemany, R., Custers, J., 2014. Adenovirus-based vaccines for fighting infectious diseases and cancer: progress in the field. *Human gene therapy* 25, 301–17. doi:10.1089/hum.2013.235

- Markine-goriaynoff, D., Logt, J.T.M. Van Der, Truyens, C., Nguyen, T.D., Heessen, F.W.A., Bigaignon, G., Carlier, Y., Coutelier, J., 2000. IFN- γ -independent IgG2a production in mice infected with viruses and parasites 12, 223–230.
- Matsumiya, M., Stylianou, E., Griffiths, K., Lang, Z., Meyer, J., Harris, S. a, Rowland, R., Minassian, A.M., Pathan, A. a, Fletcher, H., McShane, H., 2013. Roles for Treg expansion and HMGB1 signaling through the TLR1-2-6 axis in determining the magnitude of the antigen-specific immune response to MVA85A. *PloS one* 8, e67922. doi:10.1371/journal.pone.0067922
- Mayr, A., Stickl, H., 1975. Abstammung , Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA 3.
- McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, Webster D, Dunachie S, Butcher G, Vuola JM, B., 2003. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med.* 6, 729 – 735.
- McCoy, K., Tatsis, N., Koriath-Schmitz, B., 2007. Effect of preexisting immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune responses of nonhuman primates to vaccine regimens based on human- or chimpanzee-derived adenovirus vectors. *J. Virol.* 81, 6594–6604.
- McElwain, T.F., Perryman, L.E., Musoke, A.J., McGuire, T.E., 1991. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47, 213 – 223.
- McGuire, T.C., Musoke, A.J. and Kurtti, T., 1979. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils, and skin. *Immunology* 38, 249–256.
- Mendes, É.A., Fonseca, F.G., Casério, B.M., Colina, J.P., Gazzinelli, R.T., Caetano, B.C., 2013. Recombinant vaccines against *T. gondii*: comparison between homologous and heterologous vaccination protocols using two viral vectors expressing SAG1. *PloS one* 8, e63201. doi:10.1371/journal.pone.0063201
- Minassian, AM, McShane, H., 2008. Tuberculosis vaccines: present and future. *Expert Rev. Respir. Med.* 2,, 721–738.
- Montenegro-James, S., Toro Benitez, M., León, E., López, R. and Ristic, M., 1987. Bovine babesiosis: induction of protective immunity with culture-derived *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* immunogens. *Parasitol. Res.* 74, 142–150.

- Mooij P, Balla-Jhagjhoorsingh SS, Beenhakker N, van Haften P, Baak I, Nieuwenhuis IG, Heidari S, Wolf H, Frachette MJ, Bieler K, Sheppard N, Harari A, Bart PA, Liljeström P, Wagner R, Pantaleo G, H.J., 2009. Comparison of human and rhesus macaque T-cell responses elicited by boosting with NYVAC encoding HIV-1 clade C immunogens. *J. Virol.* 83, 5881–5889. *J. Virol.* 83,, 5881–5889.
- Mosqueda, J., Cantó, G.J., 2012. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis 1504–1518.
- Mosqueda, J., McElwain, T.F., Stiller, D., Palmer, G.H., 2002. Babesia bovis merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect Immun* 70, 1599 – 1603.
- Moss, B., 2006. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* 344(1), 48–54.
- Moss, B., n.d. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(21), 11341-8. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(21), 11341–8.
- Mullen, a C., High, F. a, Hutchins, a S., Lee, H.W., Villarino, a V, Livingston, D.M., Kung, a L., Cereb, N., Yao, T.P., Yang, S.Y., Reiner, S.L., 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science (New York, N.Y.)* 292, 1907–10. doi:10.1126/science.1059835
- Musoke, A., Rowlands, J., Nene, V., Nyanjui, J., Katende, J., Spooner, P., Mwaura, S., Odongo. D., Nkonge, C., Mbogo, S., Bishop, R., Morzaria, S., 2005. Subunit vaccine based on the p67 major surface protein of Theileria parva sporozoites reduces severity of infection derived from field tick challenge. *Vaccine* 23(23), 3084–95.
- Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, K.L., 2008. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 455,, 396–400.
- Norimine, J., Mosqueda, J., Palmer, G.H., Lewin, H.A., Brown, W.C., 2004. Conservation of Babesia bovis Small Heat Shock Protein (Hsp20) among Strains and Definition of T Helper Cell Epitopes Recognized by Cattle with Diverse Major Histocompatibility Complex Class II Haplotypes. *Infection and immunity* 72, 1096–1106. doi:10.1128/IAI.72.2.1096
- Norimine, J., Mosqueda, J., Suarez, C., Palmer, G.H., McElwain, T.F., Mbassa, G., Brown, W.C., 2003. Stimulation of T-Helper Cell Gamma Interferon and Immunoglobulin G Responses Specific for Babesia bovis Rhoptry-Associated Protein 1 (RAP-1) or a RAP-

1 Protein Lacking the Carboxy-Terminal Repeat Region Is Insufficient To Provide Protective Immunity *aga* 71, 5021–5032. doi:10.1128/IAI.71.9.5021

Norimine, J., Suarez, C.E., McElwain, T.F., Florin-christensen, M., Brown, W.C., 2002. Immunodominant Epitopes in Babesia bovis Rhoptry-Associated Protein 1 That Elicit Memory CD4 α -T-Lymphocyte Responses in B . bovis -Immune Individuals Are Located in the Amino-Terminal Domain 70, 2039–2048. doi:10.1128/IAI.70.4.2039

O’connor, R.M., Lane, T.J., Stroup, S.E., Allred, D.R., 1997. Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA 1) expressed by Babesia bovis during antigenic variation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89, 259–270.

Palmer, G.H., McElwain, T.F., Perryman, L.E., Davis, W.C., Reduker, D.R., Jasmer, D.P., Shkap, V., Pipano, E., Goff, W.L., Maguire, T.C., 1991. Strain variation of Babesia bovis merozoite surface-exposed epitopes. *Infect Immun* 59, 3340 – 3342.

Panicali, D. y Paoletti, E., 1992. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex into the DNA of infectious vaccinia virus. *Biotechnology* 24, 503-7. 24, 503–7.

Paoletti E., 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(21), 11349–53.

Paoletti, E., Lipinskas, B.R., Samsonoff, C., Mercer, S. y Panicali, D., 1984. Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(1), 193–7.

Paoletti, E., Taylor, J., Meignier, B., MERIC, C. y Tartaglia, J., 1995. Highly attenuated poxvirus vectors: NYVAC, ALVAC and TROVAC. *Dev Biol Stand* 84, 159–63.

Pastoret PP, V.A., 2003. Poxviruses as vaccine vectors. *omp Immunol Microbiol Infect Dis* 26(5-6), 343–55.

Pena L, Moraes MP, Koster M, Burrage T, Pacheco JM, Segundo FD, G.M., 2008. Delivery of a foot – and - mouth disease virus empty capsid subunit antigen with nonstructural protein 2B improves protection of swine. *Vaccine* 26,, 5689–5699.

Peng, S.L., Szabo, S.J., Glimcher, L.H., 2002. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production 99, 5545–5550.

- Pérez-Jiménez, E., Kochan, G., Gherardi, M.M., Esteban, M., 2006. MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8, 810–22. doi:10.1016/j.micinf.2005.10.004
- Perkin ME., 1992. Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. *Parasitol. Today* 8,, 28–32.
- Post, L.E., Norrild, B., Simpson, T. y Roizman, B., 1982. Chicken ovalbumin gene fused to a herpes simplex virus alpha promoter and linked to a thymidine kinase gene is regulated like a viral gene. *Mol Cell Biol* 2(3), 233–40.
- Prisco, A., De Berardinis, P., 2012. Memory immune response: a major challenge in vaccination. *Biomolecular concepts* 3, 479–86. doi:10.1515/bmc-2012-0010
- Ramshaw, I.A., Ramsay, A.J., 2000. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Trends in immunology today*. 163–165.
- Riek F., 1963. *Immunity to protozoa*. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, England 160 – 179.
- Riek RF., 1966. The life cycle of *Babesia argentina* (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agricultural Research* 17, 247–254.
- Rocha, C.D., Caetano, B.C., Machado, A.V. y Bruna-Romero, O., 2004. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. *Int Microbiol* 7(2), 83–94.
- Rodriguez, S. D., Palmer G. H, McElwain T. F., McGuire T. C., Ruef B. J., C.-M.C., G., and B.W.C., 1996. CD4+ T-helper lymphocyte responses against *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein I. *Infect Immun* 64(6), 2079–87.
- Rollier, C.S., Reyes-Sandoval, A., Cottingham, M.G., Ewer, K., Hill, A.V.S., 2011. Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Current opinion in immunology* 23, 377–82. doi:10.1016/j.coi.2011.03.006
- Ruef, B.J., Dowling, S.C., Conley, P.G., Perryman, L.E., Brown, W.C., Jasmer, D.P., Rice-Ficht, A.C., 2000. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. *Mol Biochem Parasitol* 105, 1 – 12.
- Russell, W.C., 2000. Update on adenovirus and its vectors 81, 2573–2604.

- Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Araki, K., Ahmed, R., 2010. From vaccines to memory and back. *Immunity* 33, 451–63. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.008
- Sam - Yellowe TY., 1996. Rhoptry organelles of apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol. Today* 12,, 308–315.
- Sambrook J, Fritsch J, M.T., 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 1989. Cold Spring Harbor Press. Second edition.
- Sánchez-Sampedro, L., Gómez, C.E., Mejías-Pérez, E., Sorzano, C.O.S., Esteban, M., 2012. High quality long-term CD4+ and CD8+ effector memory populations stimulated by DNA-LACK/MVA-LACK regimen in *Leishmania major* BALB/c model of infection. *PLoS one* 7, e38859. doi:10.1371/journal.pone.0038859
- Sánchez-Sampedro, L., Perdiguero, B., Mejías-Pérez, E., García-Arriaza, J., Di Pilato, M., Esteban, M., 2015. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses* 7, 1726–803. doi:10.3390/v7041726
- Scheifflinger, F., Falkner, F.G. y Dorner, F., 1996. Evaluation of the thymidine kinase (tk) locus as an insertion site in the highly attenuated vaccinia MVA strain. *Arch Virol* 141(3-4), 663–9.
- Schliephake AW, R.A., 1994. Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J Virol* 68(8), 4946–54.
- Schneider, D. a, Yan, H., Bastos, R.G., Johnson, W.C., Gavin, P.R., Allen, a J., Barrington, G.M., Herrmann-Hoesing, L.M., Knowles, D.P., Goff, W.L., 2011. Dynamics of bovine spleen cell populations during the acute response to *Babesia bovis* infection: an immunohistological study. *Parasite immunology* 33, 34–44. doi:10.1111/j.1365-3024.2010.01249.x
- Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Morrison, D. a., 2012. *Babesia*: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 1788–1809. doi:10.1016/j.meegid.2012.07.004
- Sebastian, S., Gilbert, S.C., 2016. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based malaria vaccines. *Expert review of vaccines* 15, 91–103. doi:10.1586/14760584.2016.1106319
- Sharma, A., Tandon, M., Ahi, Y.S., 2010. Evaluation of cross-reactive cell-mediated immune responses among hu- man, bovine and porcine adenoviruses. *Gene Ther.* 17,, 634– 642.

- Shkap V, Leibovitz B, Krigel, Y, Hammerschlag J., Marcovics A., Fish L., Molad T., Savitsky I, M.M., 2005. Vaccination of older *Bos taurus* bulls against bovine babesiosis. *Veterinary Parasitology* 129, 235–242.
- Shoda, L.K.M., Palmer, G.U.Y.H., Florin-christensen, J., Florin-christensen, M., Godson, D.L., Brown, W.C., 2000. *Babesia bovis* -Stimulated Macrophages Express Interleukin-1B, Interleukin-12 , Tumor Necrosis Factor Alpha , and Nitric Oxide and Inhibit Parasite Replication In Vitro 68, 5139–5145.
- Skuce, P.J., Mallon, T.R., Taylor, S.M., 1996. Molecular cloning of a putative rhoptry associated protein homologue from *Babesia divergens*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 99 – 102.
- Smith, S. a, Kotwal, G.J., 2002. Immune response to poxvirus infections in various animals. *Critical reviews in microbiology* 28, 149–85. doi:10.1080/1040-840291046722
- Smith, RD., James, MA., Ristic, M., 1981. Bovine Babesiosis : Protection of Cattle with Culture-Derived Soluble *Babesia bovis* Antigen. *science* 212, 335–338.
- Späth EJA, Guglielmone AA, Signorini AR, M.A., 1994. Estimating of direct economic losses caused by the tick *Boophilus microplus* and associated diseases in Argentina. *Therios* 23, 116–119.
- Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V., Mayr, A., Huber, H.C., Schafer, H. y Holzner, A., 1974. MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA). *Dtsch Med Wochenschr* 99(47), 2386–92.
- Suarez, C.E., Palmer, G.H., Hines, S. a, McElwain, T.F., 1993. Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 are distinct from sequences conserved between species. *Infection and immunity* 61, 3511–7.
- Suarez, C. E., Palmer, G. H., Jasmer, D. P., Hines, S. A., Perryman, L. E. and McElwain, T. F., 1991. Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface-exposed epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46, 45 – 52.
- Suarez, C.E., Florin-Christensen, M., Hines, S.A., Palmer, G.H., Brown, W.C., McElwain, T., 2000. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1 (*msa-1*) locus and identification of a cross-reactive, inhibition-sensitive MSA-1 epitope. *Infect Immun* 68, 6865–6870.

- Sutter G, S.C., 2003. Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord* 3(3), 263–71.
- Symons, J.A., Alcami, A., Smith, G.L., 1995. Vaccinia Virus Encodes a Soluble Type I Interferon Receptor of Novel Structure and Broad Species Specificity 61, 551–560.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., Glimcher, L.H., Carolina, S., 2000. A Novel Transcription Factor , T-bet , Directs Th1 Lineage Commitment 100, 655–669.
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Stemmann, C., Satoskar, A.R., Sleckman, B.P., Glimcher, L.H., 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science (New York, N.Y.)* 295, 338–42. doi:10.1126/science.1065543
- Tartaglia, J., Perkus, M.E., Taylor, J., Norton, E.K., Audonnet, J.C., Cox, W.I., Davis, S.W., van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M. y col., 1992. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 188(1), 217–32.
- Tatsis N, Sinnathamby G, E.L., 2004. Vaccinia virus as a tool for immunologic studies. *Methods Mol Biol* 269, 267–88.
- Thakur, A., Pedersen, L.E., Jungersen, G., 2012. Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. *Vaccine* 30, 4907–20. doi:10.1016/j.vaccine.2012.05.049
- Thiele, F., Tao, S., Zhang, Y., Muschaweckh, A., Zollmann, T., Protzer, U., Abele, R., Drexler, I., 2015. Modified vaccinia virus Ankara-infected dendritic cells present CD4+ T-cell epitopes by endogenous major histocompatibility complex class II presentation pathways. *Journal of virology* 89, 2698–709. doi:10.1128/JVI.03244-14
- Timms, P., Stewart, N. P. & De vos, A.J. (1990)., 1990. Study of virulence and vector transmission of *Babesia bovis* by use of cloned parasite lines. *Infection and Immunity* 58, 2171–2176. *Infection and Immunity* 58, 2171–2176.
- Trombetta ES, M.I., 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23,, 975–1028.
- Ushe, T.C., Palmer, G.H., Sotomayor, L., Figueroa, J.V., Buening, G.M., Perryman, L.E., McElwain, T.F., 1994. Antibody response to a *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 surface-exposed and neutralization-sensitive epitope in immune cattle. *Infect. Immun.* 62, 5698–5701.

- Vandepapelière, P., Rehermann, B., Koutsoukos, M., Moris, P., Garçon, N., Wettendorff, M., Leroux-Roels, G., 2005. Potent enhancement of cellular and humoral immune responses against recombinant hepatitis B antigens using AS02A adjuvant in healthy adults. *Vaccine* 23, 2591–601. doi:10.1016/j.vaccine.2004.11.034
- Vargas P, F.J.A.A.J.L.U.R.C.B.V.S.V.C.R., 2010. Immunization of *Bos taurus* steers with *Babesia bovis* recombinant antigens MSA-1, MSA-2c and 12D3. *Transbound Emerg Dis.* 1, 87 – 90. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01117.x.
- Vordermeier, H.M., Villarreal-Ramos, B., Cockle, P.J., McAulay, M., Rhodes, S.G., Thacker, T., Gilbert, S.C., McShane, H., Hill, A.V.S., Xing, Z., Hewinson, R.G., 2009. Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against bovine tuberculosis. *Infection and immunity* 77, 3364–73. doi:10.1128/IAI.00287-09
- Vordermeier, H. M., Huygen, K., Singh, M., Hewinson, R. G. & Xing, Z., 2006. Immune responses induced in cattle by vaccination with a recombinant adenovirus expressing mycobacterial antigen 85A and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 74,, 1416–1418.
- Vos, A.J.D.E., Lew, A., Kingston, T.G., Eraser, R., Grey, M., 1995. Studies on failure of T strain live *Babesia bovis* vaccine 72.
- Vuola J, M, Keating S, Webster DP, Berthoud T, Dunachie S, Gilbert SC, H.A., 2005. Differential immunogenicity of various heterologous prime–boost vaccine regimens using DNA and viral vectors in healthy volunteers. *J. Immunol.* 174,, 449–455.
- Waki, S . Uehara , K . Kanbe, H.N. and M.S., 1995. Interferon-gamma and the induction of protective IgG2a anti bodies in non-lethal *Plasmodium berghei* infections of mice. *Parasite immunology* 503–508.
- Waltisbuhl, DJ., Goodger, BV., Wright, IG., Commings, MA., Mahoney, D., 1987. An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovia* infection in cattle. *Parasitol Res* 73, 126 –131.
- Webster, D.P., Dunachie, S., Vuola, J.M., Berthoud, T., Keating, S., Laidlaw, S.M., McConkey, S.J., Poulton, I., Andrews, L., Andersen, R.F., Bejon, P., Butcher, G., Sinden, R., Skinner, M. a, Gilbert, S.C., Hill, A.V.S., 2005. Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4836–41. doi:10.1073/pnas.0406381102

- Weil, C.M., Gibson, M., Spear, P.G. y Scolnick, E.M., 1981. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 39(3), 935–44.
- Welter, J., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E. y Stephensen, C.B., 2000. Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *J Virol* 74(14), 6358–67.
- Whitton, J. y Oldstone, M., 1996. Immune response to viruses. En *Fields Virology*, 3rd ed. Vol. 1, capítulo 12: 345- 374. Eds: Fields, B.; Knipe, D. y Howley, P. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA. En *Fields Virology*, 3rd ed. Vol. 1. Eds: Fields, B.; Knipe, D. y Howley, P. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.
- Wilkowsky, S., Farber, M., Echaide, I., Torioni de Echaide, S., Zamorano, P., Dominguez, M., Suarez, C., Florin-Christensen, M., 2003. Babesia bovis merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. *Molecular and Biochemical Parasitology* 127, 133–141. doi:10.1016/S0166-6851(02)00329-8
- Willcox, N. & Mautner, V., 1976. Antigenic determinants of adenovirus capsids. I. Measurement of antibody cross-reactivity. *Journal of Immunology* 116, 19–24. *Journal of Immunology* 116,, 19–24.
- Woodland, D.L., 2004. Jump-starting the immune system: prime–boosting comes of age. *Trends in Immunology* 25, 98–104. doi:10.1016/j.it.2003.11.009
- Worgall, S., Leopold, P.L., Wolff, G., Ferris, B., Roijen, N.V.A.N., Crystal, R.O.N.A.L.D.G., 1997. Role of Alveolar Macrophages in Rapid Elimination of Adenovirus Vectors Administered to the Epithelial Surface of the Respiratory Tract. *Human gene therapy* 1684, 1675–1684.
- Wyatt, L.S., Earl, P.L., Eller, L.A., Moss, B., 2004. Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4590–5. doi:10.1073/pnas.0401165101
- Yokoyama, N., Suthisak, B., Hirata, H., Matsuo, T., Inoue, N., Sugimoto, C., Igarashi, I., 2002. Cellular localization of Babesia bovis merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity. *Infect Immun* 70, 5822–5826.
- Zanetti, F.A., Del, M., Taboga, O.A., Calamante, G., 2012. Evaluation of modified vaccinia virus Ankara expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus as an immunogen in chickens. *J. Vet. Sci* 13, 199–201.

Zhou, Y.-H., Chen, Z., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2007. Positive reactions on Western blots do not necessarily indicate the epitopes on antigens are continuous. *Immunology and cell biology* 85, 73–8. doi:10.1038/sj.icb.7100004

Zwickey HL, Unternaehrer JJ, M.I., 2006. Presentation of self-antigens on MHC class II molecules during dendritic cell maturation. *Int Immunol* 18, 199–209.